



Universitat de Lleida

Identificació de la funció de les caspases executores en el desenvolupament cardíac, basada en l'estudi de la deleció de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits

Maria Cardona Colom

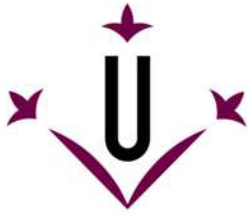
Dipòsit Legal: L.146-2015

<http://hdl.handle.net/10803/285433>



Identificació de la funció de les caspases executores en el desenvolupament cardíac, basada en l'estudi de la deleció de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

(c) 2014, Maria Cardona Colom



Universitat de Lleida



**Identificació de la funció de les caspases
executores en el desenvolupament cardíac,
basada en l'estudi de la delecio de les
caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits.**

Universitat de Lleida - Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Maria Cardona Colom

Director: Daniel Sanchis Morales

Setembre 2014



Universitat de Lleida

Daniel Sanchis Morales, Doctor en Ciències Biològiques, investigador i professor agregat del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida, com a director de la present tesi,

Faig constar que,

La llicenciada en Biotecnologia per la Universitat de Lleida **Maria Cardona Colom**, ha realitzat sota la meua direcció i supervisió dins del grup de Senyalització Cel·lular i Apoptosi del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, el treball experimental titulat “**Identificació de la funció de les caspases executores en el desenvolupament cardíac, basada en l’estudi de la deleció de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits**”.

El treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s’escau, obtenir el grau de **Doctor** per la Universitat de Lleida.

I perquè així consti i als efectes oportuns signo el present document a

Lleida, 15 de Juliol de 2014

Dr. Daniel Sanchis Morales

Resums

RESUM

Les caspases són les principals executores de l'apoptosi, a més, però, porten a terme altres funcions importants independents de l'apoptosi. Diversos estudis demostren com les caspases són silenciades durant el desenvolupament cardíac, de manera que la seva màxima expressió es produeix en els estadis embrionals i és pràcticament nul·la quan el cor és adult. Aquest fet indica que la funció que porten a terme les caspases en el cor té importància durant el desenvolupament cardíac.

En aquest treball hem generat una soca de ratolins amb una deleció cardíac-específica de les caspases executores 3 i 7 (DKO) per tal d'esbrinar quina és la funció d'aquestes caspases en el desenvolupament del cor. Mentre que la manca global de les caspases 3 i 7 comporta una mort prematura i un desenvolupament cardíac anormal, la seva manca específica en el miocardi no suposa problemes de supervivència i el cor té una morfologia normal, demostrant que el fenotip cardíac que presenta el KO global és un efecte secundari de la manca de les caspases en un altre teixit. Aquest estudi descriu com la manca d'aquestes caspases específicament en el miocardi suposa una disminució en la proliferació, que comporta un inferior nombre de cardiomiòcits, que acaba desenvolupant un cor més petit. A més, els nostres resultats demostren com els cors DKO compensen el dèficit de cardiomiòcits desenvolupant una hipertròfia lleu, que acaba donant lloc a un cor adult de les mateixes dimensions que el seu homòleg WT; el desenvolupament d'aquesta hipertròfia va associat a un canvi en la tendència de l'expressió dels gens de diversos grups funcionals, demostrant un canvi adaptatiu d'aquests cors amb l'edat. El fet desencadenant del problema proliferatiu en els DKO sembla tenir relació amb un augment en la resposta inflamatòria, que podria estar induint l'expressió de gens implicats en la desregulació de la proliferació, com *Serpina3*.

Mitjançant estudis *in vitro* amb cardiomiòcits neonatals hem validat la implicació de les caspases en la regulació de l'expressió de gens implicats en la replicació del DNA i divisió cel·lular; a més, mitjançant la sobre-expressió de les caspases amb el centre catalític mutat hem demostrat com aquesta funció no-apoptòtica de les caspases és independent de la seva activitat catalítica.

RESUMEN

Las caspasas son las principales ejecutoras de la apoptosis, además, llevan a cabo otras funciones importantes independientes de la apoptosis. Distintos estudios demuestran como las caspasas son silenciadas durante el desarrollo cardíaco, de forma que su máxima expresión se produce en los periodos embrionarios y es prácticamente nula cuando el corazón es adulto. Este hecho indica que la función que llevan a cabo las caspasas en el corazón tiene importancia durante el desarrollo cardíaco.

En este trabajo hemos generado una cepa de ratones con una delección cardíaco-específica de las caspasas ejecutoras 3 y 7 (DKO) con el fin de encontrar cuál es la función de dichas caspasas en el desarrollo del corazón. Mientras que la falta global de las caspasas conlleva una muerte prematura y un desarrollo cardíaco anormal, su manca específica en el miocardio no supone problemas de supervivencia y el corazón tiene una morfología normal, demostrando que el fenotipo cardíaco que presenta el KO global es un efecto secundario de la falta de las caspasas en otro tejido. Este estudio describe como la falta de estas caspasas específicamente en el miocardio supone una disminución en la proliferación, que conlleva un inferior número de cardiomiocitos, que acaba desarrollando un corazón más pequeño. Además, nuestros estudios demuestran como los corazones DKO compensan el déficit de cardiomiocitos desarrollando una hipertrofia leve que acaba dando lugar a un corazón adulto de las mismas dimensiones que su homólogo WT; el desarrollo de esta hipertrofia va asociado a un cambio en la tendencia de la expresión de los genes de distintos grupos funcionales, demostrando un cambio adaptativo de estos corazones con la edad. El hecho desencadenante del problema proliferativo en los DKO parece tener relación con un aumento en la respuesta inflamatoria, que podría estar induciendo la expresión de genes implicados en la desregulación de la proliferación, como *Serpina3*.

Mediante estudios *in vitro* con cardiomiocitos neonatos hemos validado la implicación de las caspasas en la regulación de la expresión de genes implicados en la replicación del ADN y división celular; además, mediante la sobre-expresión de las caspasas con el centro catalítico mutado hemos demostrado como esta función no-apoptótica de las caspasas es independiente de su actividad catalítica.

ABSTRACT

Caspases are the main executioners of apoptosis; besides, they carry out other important functions which are independent of apoptosis. Several studies demonstrate that caspases are silenced during cardiac development, and their expression is almost non-existent when the heart is adult. This fact indicates that the function that caspases carry out in the heart is important during heart development.

In the present work we generated a mice strain with a cardiac-specific deletion of the executioner caspases 3 and 7 (DKO) in order to investigate the function of these caspases during heart development. While the global lack of caspases 3 and 7 causes a premature death and an abnormal cardiac development, their specific lack in the myocardium does not cause survival problems and the heart has a normal morphology, demonstrating that the cardiac phenotype of the global KO is a secondary effect of the lack of caspases in another tissue. This study describes how the lack of caspases specifically in the myocardium supposes a reduction in proliferation, which implies an inferior number of cardiomyocytes, which finally forms a smaller heart. Moreover, our results demonstrate that DKO mice compensate the deficit of cardiomyocytes by developing a mild hypertrophy, which finally gives rise to an adult heart with the same size than its WT homolog; the development of this hypertrophy is accompanied by a change in gene expression tendency, showing an adaptive change of these hearts with age. It seems that the proliferative problem in the DKO hearts is related to an increase in the inflammatory response, which could be inducing the expression of genes implicated in the deregulation of proliferation, like *Serpina3*.

By means of *in vitro* studies we validated the implication of caspases in the regulation of genes implicated in DNA replication and cell division; moreover, with the over-expression of non-catalytic caspases we demonstrated that this non-apoptotic function of the caspases is independent of their catalytic activity.

Índex

ÍNDIX

Abreviatures	1
Introducció.....	7
1- Fisiologia i desenvolupament del cor.....	9
1.1- Arquitectura i funció del cor.	9
1.2- Estructura del múscul cardíac i el cardiomiòcit.....	11
1.3- Creixement dels cardiomiòcits en el període postnatal.....	13
1.4- Cardiogènesi.....	14
2- Apoptosi	20
2.1- Caspases.....	21
2.2- Vies d'inducció de la mort apoptòtica.....	24
3- Implicació de l'apoptosi en el desenvolupament.	31
3.1- Regulació dels gens apoptòtics durant el desenvolupament.....	31
3.2- Importància de l'apoptosi en el desenvolupament.	33
3.3- Importància de l'apoptosi en el desenvolupament cardíac.....	35
4- Funcions no apoptòtiques dels membres apoptòtics.....	36
4.1- Funcions en teixits no-cardíacs.	36
4.2- Funcions en el cor.....	42
5- La hipertròfia cardíaca i la cardiomiopatia isquèmica.	49
5.1- La hipertròfia cardíaca.....	49
5.2- La cardiomiopatia isquèmica.....	56
6- Cicle Cel·lular.	60
6.1- Introducció al cicle cel·lular, ciclins, CDKs i CKIs.....	60
6.2- Regulació del cicle cel·lular en els cardiomiòcits.	63
6.3- El metabolisme en la regulació del cicle cel·lular.....	67
Hipòtesi i Objectius	71
Materials i mètodes.....	75
1- Animals d'experimentació.....	77
1.1- Consideracions prèvies.....	77

1.2-Animals.....	77
2-Tècniques de Biologia Cel·lular.	80
2.1- Cultius cel·lulars.....	80
2.2-Producció de lentivirus.....	82
2.3- Recomptes cel·lulars.	83
2.4- Subfraccionaments cel·lulars.	85
2.5- Assaigs d'activitats enzimàtiques en extractes cel·lulars.....	87
3-Tècniques de Biologia Molecular i Bioquímica.....	89
3.1- Construccions plasmídiques.....	89
3.2- Amplificació en cadena de la polimerasa.....	91
3.3- Micro-arrays d'expressió gènica.	93
3.4- Immunodetecció de proteïnes.....	94
3.5- Electroforesi bidimensional.....	99
3.6- Anàlisis proteòmic mitjançant iTRAQ i LC-MS/MS (ESI).....	101
Resultats	103
1-Characterització de l'expressió de les caspases executores en el cor.	105
1.1- Silenciament de les caspases durant el desenvolupament en el teixit cardíac.	105
1.2- La Caspasa 7 és citosòlica, mentre que la Caspasa 3 és citosòlica i també mitocondrial.	105
2- Generació de ratolins Caspasa 3 i Caspasa 7 Doble <i>Knockout</i> específicament en el teixit cardíac.	108
3- Les caspases regulen PTB post-transcripcionalment en el cor.	111
4- Fenotip dels cors Caspasa 3 ^{-/-} Caspasa 7 ^{-/-}	113
4.1- Els cardiomiòcits Caspasa 3 ^{-/-} Caspasa 7 ^{-/-} proliferen menys que els <i>Wild-Type</i>	113
4.2- Amb l'edat, els cardiomiòcits dels DKO desenvolupen una hipertròfia lleu.....	115
4.3- Tot i la hipertròfia que desenvolupen, els animals Caspasa 3 ^{-/-} Caspasa 7 ^{-/-} adults no presenten alteracions en la funció cardíaca ni responen de manera diferent a l'estrès.	116
5- La comparació transcriptòmica dels cors WT i DKO revela canvis importants en l'expressió de gens implicats en el cicle cel·lular i en el desenvolupament.	121
5.1- Els canvis gènics que presenten els DKO no es deuen a la presència de Cre.....	130

6- Contribució de dues aproximacions proteòmiques a la comprensió dels canvis bioquímics observats en els cors deficientes en caspases executores.	131
6.1- L'estudi proteòmic mitjançant gels bidimensionals i MS/MS indica alteracions en les proteïnes de la via metabòlica de producció d'energia.	131
6.2- Anàlisi simultani del proteoma de cors neonatals, joves i adults de ratolins WT i deficientes en caspases 3 i 7 per marcatge isobàric per quantificació relativa i absoluta (iTRAQ).....	135
7- Estudi <i>in vitro</i> de les funcions no apoptòtiques de les caspases 3 i 7 en el miocardi.	140
7.1- La sobre-expressió de les caspases 3 i 7 en cardiomiòcits neonatals produeix un augment en l'expressió dels gens de cicle.	140
7.2- Ni la sobre-expressió ni la manca de caspases en els cardiomiòcits comporten canvis en els nivells d'activitat caspasa.	145
7.3- La funció de les caspases 3 i 7 és independent de la seva activitat catalítica.....	146
Discussió	149
1- El fenotip cardíac que suposa la manca global de les caspases 3 i 7 no està causat directament per la manca d'aquestes caspases en els cardiomiòcits.	151
2- Les caspases participen en la regulació post-transcripcional de PTB, i per tant, en la diferenciació del múscul cardíac.	152
3- Els cors sense Caspasa 3 i Caspasa 7 tenen menys cardiomiòcits i compensen aquest dèficit desenvolupant hipertròfia.....	154
4- Els estudis transcriptòmics i proteòmics evidencien alteracions en l'expressió de gens implicats en la proliferació cel·lular en neonatals, probablement degut a l'activació de processos inflamatoris en els cors deficientes en caspases executores.	157
5- La mort dels cardiomiòcits en processos d'Isquèmia / Reperfusió és independent de caspases.....	162
6- La diferència de pes entre els cors de diferent sexe es deu a un inferior nombre de cardiomiòcits en les femelles.	163
7- Comentaris finals.....	164
Conclusions	165
Bibliografia.....	169
Annex	185

Abreviatures

Acetil-CoA: Acetil-coenzim A

AIF: Apoptosis-inducing Factor

α 1-ACT: Alpha 1-antichymotrypsin

AMPK: AMP-activated protein kinase

Apaf-1: Apoptotic-Protease Activating Factor-1

ATP: Adenosine Tri-Phosphate

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BH: Benjamini-Hochberg

C5/C5a: Component 5 del Complement

CAD: Caspase-Dependent DNase

CARD: Caspase-Activation Recruitment Domain

Casp: Caspasa

Cdc: cell division cycle

cDNA: complementary DNA

CDK: Cyclin-dependent kinase

CKI: CDK inhibitor

Cyc: Cyclin

DED: Death Effector Domain

DLD: Dihidrolipoil Dehidrogenasa

Dmd: distrofina

DNA: Deoxyribonucleic acid

DKO: doble knock out

Endo G: Endonuclease G

ERK: extracellular-signal regulated kinase

FADD: Fas-Associated Death Domain Protein

Fam107a: family with sequence similarity 107 member

FBS: fetal bovine serum

FHF: First Heart Field

FLIP: FLICE-inhibitory protein

FlnC: Filamin C

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Glut4: glucose transporter 4

HDAC: Class II histone deacetylases

Hif3 α : hypoxia-inducible factor 3 α

HS: horse serum.

IAP: Inhibitor Apoptosis Protein

IEF: isoelectroenfoc

IL: interleuquina

I/R: Isquèmia/Reperfusió

ISO: isoproterenol

iTRAQ: Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation

JNK: c-Jun N-terminal kinase

KO: Knock Out

KOH: Hidròxid de potassi

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MEF2: Myocyte Enhancer Factor-2

MHC: Myosin Heavy Chain

MOMP: mitochondrial outer-membrane permeabilization

MS: espectrometria de masses

Myh: Myosin Heavy Chain

Ndr4: N-myc downstream-regulated gene 4

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Nkx2.5: Homeobox Protein NK2 Transcription Factor Related

Nppa: atrial natriuretic peptide precursor

Obscn: obscurin

OFT: Outflow tract

OSM: Oncostatina M

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pold1: DNA polymerase δ catalytic subunit

PR: Pricosirius Red

PTB: Polypyrimidine tract-binding protein

RNA: Ribonucleic Acid

ROS: Reactive Oxygen Species

STS: Staurosporina

Ttn: titina

Tmem100: transmembrane protein 100

TNF: Tumor Necrosis Factor

SHF: Secondary Heart Field

WT: Wild Type.

Introducció

1- Fisiologia i desenvolupament del cor.

1.1- Arquitectura i funció del cor.

El cor és l'òrgan encarregat de subministrar la sang i l'oxigen a totes les parts del cos. Està situat dins una cavitat plena de fluid anomenada cavitat pericardíaca. El pericardi és un tipus de membrana serosa que produeix el fluid necessari per a lubricar el cor i evitar la fricció entre el cor bombejant i els òrgans del voltant; a més de la lubricació, el pericardi serveix per a mantenir el cor en la posició correcta i permet que hi hagi prou espai per quan s'omple i s'expandeix. La paret del cor està formada de tres capes: l'epicardi (és la capa exterior i forma part del pericardi), el miocardi (forma el teixit cardíac muscular, és el que dóna la massa i gruixària al cor i el responsable de bombejar la sang), i l'endocardi (és una capa endotelial que està dins el cor, encarregada de protegir les cambres cardíques i amb una funció reguladora important).

El cor està format de diferents tipus cel·lulars, que contribueixen en les propietats estructural, bioquímica, mecànica i elèctrica del cor [1]. Els cardiomiòcits, ventriculars i auriculars, són la base de les parets musculars. Els fibroblasts cardíacs constitueixen més del 50% de les cèl·lules del cor. Les cèl·lules endotelials formen l'endocardi, les vàlvules cardíques i els conductes sanguinis. Les cèl·lules de múscul llis contribueixen al sistema vascular d'entrada i sortida i les artèries coronàries. L'epicardi dóna lloc als precursors de la vasculatura coronària i fibroblasts cardíacs. Finalment, les fibres *Purkinje* i les cèl·lules *pacemaker* són cardiomiòcits especialitzats que es troben en el sistema de conducció i generen i condueixen els impulsos elèctrics (figura 1). El node sinoatrial (SAN), format de cèl·lules pacemaker, es troba en l'aurícula dreta generant impulsos per iniciar la contracció del cor; el node atrioventricular (AVN) es troba entre les aurícules i ventricles i condueix l'impuls elèctric de les aurícules als ventricles [1].

El cor conté quatre cambres: aurícula dreta, aurícula esquerra, ventricle dret i ventricle esquerre (figura 1). Les aurícules són més petites que els ventricles i tenen una paret muscular més prima, són les encarregades de rebre la sang i per això estan connectades amb les venes, que porten la sang cap al cor. Els ventricles són les

cambres més grans i fortes del cor i són els encarregats d'enviar la sang cap a la resta d'òrgans i teixits, estan connectats a les artèries. La paret interna de teixit que divideix els costats dret i esquerre del cor s'anomena septa, aquest té la funció d'evitar que durant la contracció la sang vagi del cantó dret a l'esquerre i que es barregin la sang oxigenada i desoxigenada, també ajuda a mantenir la forma i rigidesa del cor i proporciona força a les parets cardíques.

El cor actua com a una doble bomba. L'aurícula dreta rep la sang desoxigenada a partir de les venes sistèmiques (vena cava superior i inferior) i circula a través de la vàlvula tricúspide cap al ventricle dret, on es bombeja via la vàlvula pulmonar semilunar i mitjançant l'artèria pulmonar cap als pulmons, on s'alliberarà el diòxid de carboni i es captarà l'oxigen. D'allà, la sang torna a través de la vena pulmonar cap a l'aurícula esquerra i circula a través de la vàlvula bicúspide o mitral cap al ventricle esquerre, on es bombejarà a través de la vàlvula aòrtica semilunar cap a l'aorta i la resta del cos. La sang desoxigenada finalment torna a l'aurícula dreta i el cicle torna a començar (figura 1).

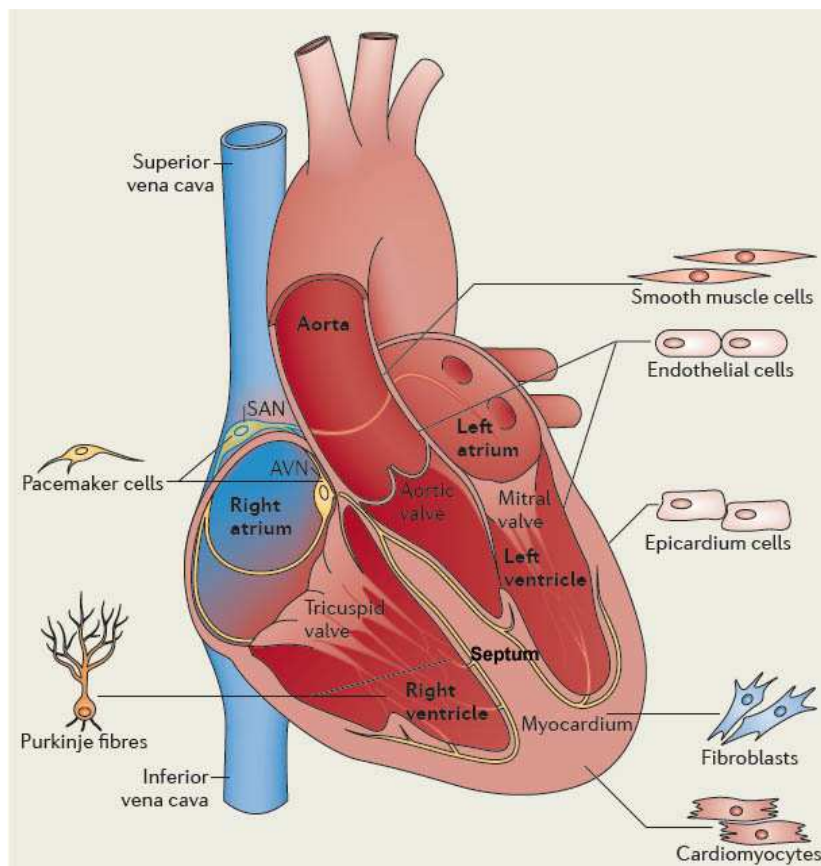


Figura 1: anatomia del cor. Tall transversal d'un cor. Mostra la part interna del cor formada de les quatre cambres, vàlvules i vasos associats; també es mostren les diferents cèl·lules que el formen [1].

1.2- Estructura del múscul cardíac i el cardiomiòcit.

A diferència del múscul esquelètic, el múscul cardíac és completament aeròbic i gairebé no té reserves energètiques en forma de lípids o glucogen. En conseqüència, l'aportació d'oxigen i nutrients a través de la sang ha de ser contínua per a poder satisfer la demanda energètica il·limitada del cor. El cor utilitza àcids grassos, glucosa, lactat i cossos cetònics per a obtenir energia.

Tant el múscul cardíac com el múscul esquelètic són músculs estriats. Les cèl·lules d'aquests músculs es caracteritzen per la peculiar organització del material contràctil en sarcòmers, que les distingeix d'altres cèl·lules, tot i que totes tenen petites quantitats de proteïna contràctil [2]. Una diferència morfològica important entre els músculs cardíac i esquelètic és que cadascuna de les cèl·lules que formen el múscul cardíac (cardiomiòcits) funciona de manera independent i el fet que totes les cèl·lules funcionin de manera coordinada s'explica per un seguit d'estímuls elèctrics que es transmeten de cèl·lula a cèl·lula gràcies a unes unions especialitzades. El múscul esquelètic, en canvi, està format per unes fibres llargues que resulten de la fusió de les diferents cèl·lules durant la embriogènesi, no hi ha punts d'unió [2].

Els cardiomiòcits adults són cèl·lules d'entre 100 i 150µm de llargada i d'entre 20 i 35µm d'amplada on el material contràctil ocupa el 50% del volum total de la cèl·lula i els mitocondris n'ocupen el 35%. El material contràctil està format per filaments gruixuts de miosina que formen les bandes A, i filaments prims d'actina que formen les bandes I, aquests filaments s'empaqueten formant les miofibril·les; donada la variació en la llargada de les miofibril·les, els diferents cardiomiòcits poden tenir morfologies diferents [3] (figura 2A).

Els cardiomiòcits adjacents s'uneixen per discs intercalars, connectant les cèl·lules veïnes mitjançant diferents tipus d'unió; els discs intercalars tenen tant la funció d'ancoratge del citoesquelet com la d'unió elèctrica dels cardiomiòcits adjacents (figura 2B); una de les principals proteïnes d'unió en els discs intercalars és la connexina43 [4]. Les miofibril·les es posicionen en forma de paret, on els punts d'ancoratge els proporcionen els costàmers, plaques de membrana orientades transversalment riques en vinculina, que encercla la superfície lateral dels cardiomiòcits (figura 2B). A més de mantenir l'organització espacial de l'aparell contràctil, els costàmers uneixen mecànicament les cèl·lules a la matriu extracel·lular.

La membrana esquelètica, on també s'uneixen els costàmers, proporciona i contribueix a la transmissió de la força de contracció. Els costàmers, la membrana esquelètica i el citoesquelet s'uneixen a la matriu extracel·lular a partir de proteïnes de membrana tals com les integrines i proteïnes del complex distrofina-glicoproteïna [3].

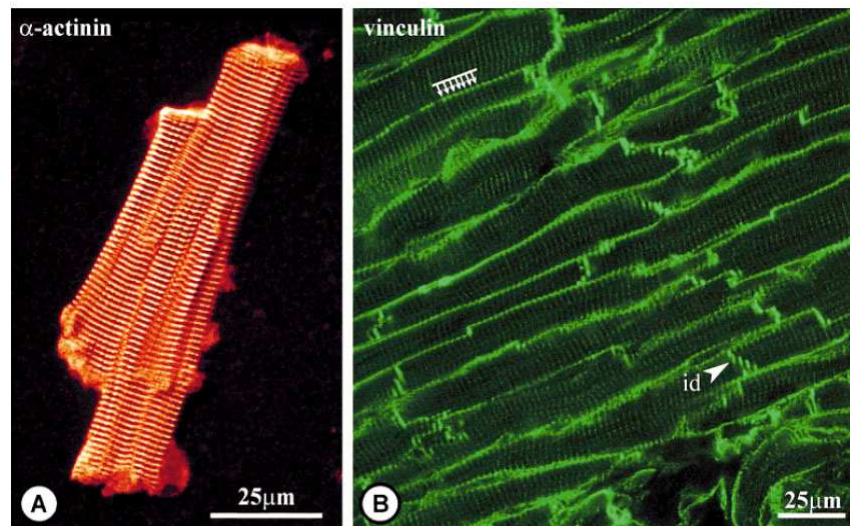


Figura 2: Microscopia confocal del múscul cardíac. A) Imatge d'un cardiomiòcit, les miofibril·les (estries) s'han tenyit amb α -actinina, un dels seus components. B) Distribució de la vinculina en una secció de múscul cardíac. Es mostren diverses cèl·lules com les de la imatge A unides pels discs intercalars (id). La vinculina s'estén en la superfície de la membrana plasmàtica de les cèl·lules (sèrie de fletxes) [3].

El reticle sarcoplàsmic (reticle endoplasmàtic en les altres cèl·lules) embolcalla les fibres contràctils de forma ordenada i direccional i participa en mantenir l'equilibri del Ca^{2+} durant la contracció [2]. El Ca^{2+} és el responsable d'activar el múscul per a la contracció, ja que interfereix amb la geometria de les proteïnes associades amb els filaments d'actina (tropomiosina i troponines) [5]. Els impulsos nerviosos despolaritzen la membrana del reticle sarcoplàsmic formant canals de Ca^{2+} , un cop alliberat, el Ca^{2+} entra en contacte amb el compartiment miofibril·lar per a iniciar la contracció, passat l'impuls nerviós, el Ca^{2+} és captat al reticle sarcoplàsmic una altra vegada per a completar la relaxació.

La maquinària de la membrana, doncs, és en gran part la que permet que les diferents cèl·lules funcionin com una única unitat contràctil per a poder produir un batec cardíac. Això requereix una correcta activació elèctrica i una transmissió efectiva de la força contràctil, de cèl·lula a cèl·lula, a través del cor.

1.3- Creixement dels cardiomiòcits en el període postnatal.

Com s'ha dit, el miocardi està compost de diferents tipus cel·lulars, essent els cardiomiòcits els que ocupen una fracció més gran, un 75% del volum total del miocardi. A més dels cardiomiòcits, en el miocardi s'hi poden trobar fibroblasts, cèl·lules endotelials i cèl·lules vasculares de múscul llis; el creixement d'aquestes cèl·lules no-miòcits pot resultar en una remodelació estructural del miocardi [6]. Tot i això, donat que el volum i la funció del miocardi depenen principalment dels cardiomiòcits, la proliferació i creixement d'aquests són els que bàsicament defineixen la mida del cor.

A diferència de les cèl·lules del múscul esquelètic, els cardiomiòcits embrionals segueixen replicant-se tot i expressar gens estructurals específics de teixit, això passa perquè el cor és el primer òrgan en diferenciar-se en l'embrió, i mentre ja realitza la seva funció (bombejar sang a la resta de cos en desenvolupament) ha de continuar creixent per a poder satisfer les demandes cada cop superiors en la seva funció [7]. Així doncs, el pes del cor augmenta un 306% del dia 1 al dia 12 de vida i el pes total de l'animal un 319% durant el mateix període [8].

La hiperplàsia (divisió cel·lular) i la hipertròfia (augment del volum) són dos aspectes diferents del creixement cel·lular, i són els que permeten assolir aquest creixement. Poc després del naixement, els cardiomiòcits deixen de proliferar i el continu augment del pes del cor es deu a un creixement individual dels cardiomiòcits ja existents. Així doncs, el creixement dels cardiomiòcits en el període postnatal es pot dividir en tres fases: fins a dia 6 hi ha hiperplàsia, és a dir, augment del nombre de cèl·lules; del dia 6 al 14 hi ha una fase de transició on té lloc simultàniament la hiperplàsia i la hipertròfia; i finalment després del dia 14 ja només es produeix una hipertròfia dels cardiomiòcits [8, 9]. No s'han trobat diferències en el pas de la hiperplàsia a la hipertròfia depenent de la regió del cor [8].

Un fenomen que té lloc en els cardiomiòcits és la binucleació, que consisteix en una síntesis de DNA amb la conseqüent divisió nuclear no acompanyada d'una divisió cel·lular (citoquinesi). Aquest fenomen comença a observar-se cap al dia 4 (figura 21), on el percentatge del nombre de cèl·lules binucleades passa del 4% al 17%. A dia 12, aquest percentatge ja ha augmentat fins al 90%. Això suggereix que els cardiomiòcits perden l'habilitat de portar a terme la citoquinesi abans de la sortida del cicle cel·lular,

comportant la formació de cardiomiòcits binucleats [9] (figura 3). La binucleació, de fet, es pot considerar un dels primers indicadors morfològics del pas a la hipertròfia dels cardiomiòcits.

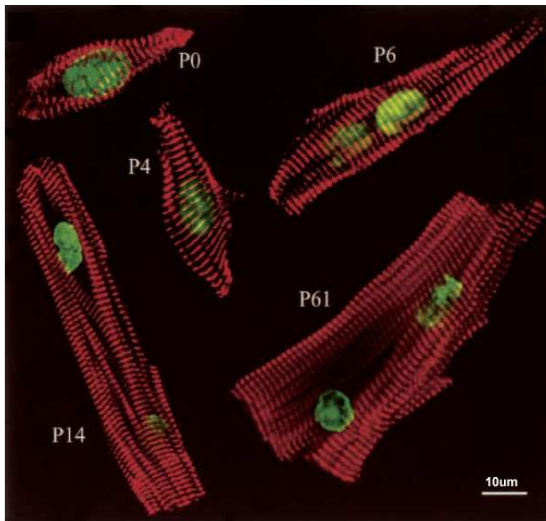


Figura 3: Cardiomiòcits a diferents edats. Imatge de cardiomiòcits a diferents edats, en vermell es marca la miomesina, i en verd els nuclis. Es mostra com a P0 i P4 són mononucleats i bastant petits i arrodonits, però com a partir de P6 comencen a tenir dos nuclis i créixer en mida, fins arribar a P61, on la cèl·lula és adulta i té la forma final del cardiomiòcit [9].

Durant el desenvolupament postnatal tenen lloc un seguit de canvis en l'expressió gènica de gens implicats en la progressió del cicle cel·lular, es tracta en el punt 6.2.

1.4- Cardiogènesi.

El cor és el primer òrgan en formar-se en un embrió i ha de funcionar per tal de suplir l'embrió, que està en ràpid i constant creixement, abans de tenir l'oportunitat de desenvolupar-se ell mateix en un òrgan de quatre cambres [10]. Tot i la gran diversitat de formes que adopten els cossos de les diferents espècies, existeix un programa genètic que es conserva en totes les espècies i que és de vital importància per a l'inici del desenvolupament del sistema circulatori, un exemple n'és el tinman/Nkx2.5/Csx homeobox gen, conservat en *Drosophila*, *Xenopus*, pollastre, peix zebra, ratolí i humà [11]. El sistema vascular d'aquests organismes ha evolucionat tot augmentant la seva complexitat per tal d'adaptar-se en els ambients específics; sembla doncs, que els organismes superiors mantenen els passos morfològics emprats pels organismes inferiors i després empen altres vies per tal d'aconseguir la complexitat en el cor, tot afegint noves estructures al cor primitiu dels invertebrats i embrions vertebrats, tals com les diferents cambres, vàlvules i el sistema de conducció [12].

Els cardiomiòcits s'organitzen en forma de tub cardíac linear, on té lloc una torsió en resposta a un sistema de senyalització axial que estableix una asimetria entre els axis esquerre i dret de l'embrió. A mesura que el tub cardíac creix, les cambres comencen a formar-se per una expansió del miocardi deguda a un creixement cel·lular diferencial a la curvatura del tub cardíac, a més, sembla important per a donar forma a les cambres que hi hagi un creixement cel·lular orientat (figura 4) [13].

A més del creixement de les cèl·lules miocàrdiques del tub cardíac, existeix una altra font de cèl·lules progenitores cardíques en els pols del tub, descrit com a regió iniciadora de cèl·lules (*heart field*): regió embriònica on es troben les cèl·lules amb potencial miocàrdic. S'ha descrit que existeixen dues regions iniciadores amb un origen comú i que aporten cèl·lules en el cor en desenvolupament d'una manera temporal i espacial específica. Així doncs, existeixen la regió primària (First Heart Field: FHF) i la regió secundària (Secondary Heart Field: SHF). Les cèl·lules del FHF contribueixen a formar els ventricles, aurícules i el canal atrio-ventricular; mentre que el SHF contribueix a formar el tracte de sortida i també està present en la resta de regions del cor, excepte el ventricle esquerre (figura 4) [14]. Es possible diferenciar les cèl·lules progenitores provinents de cadascuna de les dues regions perquè les del SHF expressen marcadors específics, essent el més conegut *Islet1 (Isl1)* [15].

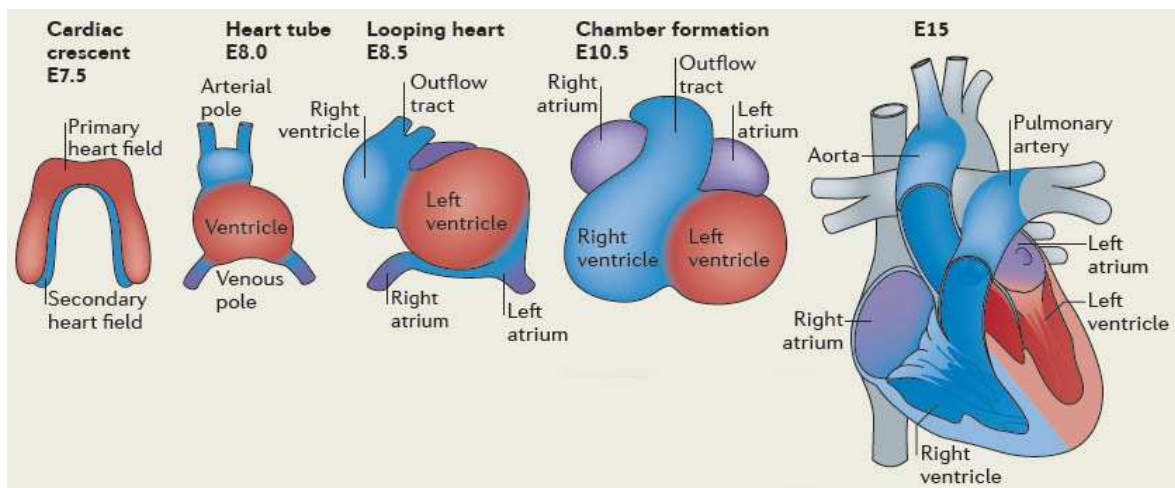


Figura 4: Procés de formació del cor en ratolí. Esquema del desenvolupament cardíac, els precursors cardíacs estructurats en forma de mitja lluna formen un tub cardíac linear que amb la torsió acabarà formant el cor madur amb les quatre cambres. En vermell es mostra la localització de les cèl·lules del FHF i en blau la de les cèl·lules del SHF [1].

Les cèl·lules del FHF composen una estructura en forma de mitja lluna cap a E7.5 en l'embrió de ratolí (corresponent a les 2 setmanes en l'humà), cap a E8.0 (o 3 setmanes en humà) aquestes cèl·lules formen el tub cardíac primitiu. A mesura que el tub cardíac es forma, les cèl·lules del SHF migren cap al tub i es posicionen per tal de poblar les diferents zones del cor un cop tingui lloc la torsió [16] (figura 4). Un cop en el cor, les cèl·lules del FHF i SHF proliferen en resposta a diferents senyals procedents de l'endocardi, però aquests mecanismes són poc coneguts [13]. El desenvolupament del tub cardíac en un cor madur amb diferents cambres requereix diversos passos dependents de programes genètics únics en vertebrats.

1.4.1- Factors de transcripció implicats en la cardiogènesi.

El desenvolupament cardíac està governat principalment per un grup de famílies de factors de transcripció conservats evolutivament, NK2, MEF2, GATA, Tbx i Hand, que controlen el destí cardíac de les cèl·lules, l'expressió de gens codificants per proteïnes contràctils i la morfogènesi de les estructures cardíques. Aquests factors de transcripció, a més, regulen uns als altres la seva expressió, estabilitzant i reforçant el programa genètic cardíac [17] (figura 5). L'estudi dels fenotips de les mutacions en diferents gens codificants de factors de transcripció miocàrdics mostra que no hi ha un únic factor responsable de la diferenciació dels cardiomiòcits. Aquests mutants desenvolupen un cor, però mostren importants defectes en la morfogènesi del tub cardíac, sovint caracteritzats per la pèrdua de cambres o l'aturada en el desenvolupament durant la fase de torsió [14].

El gen homeobox més important de la família NK2 és el factor de transcripció Nkx2.5, anomenat tinman en *Drosophila* [11]. És el primer marcador cardíac identificat en els embrions vertebrats, la seva expressió en ratolí es detecta a partir del dia E7.5 i es manté durant tot el desenvolupament i el cor adult [18]. La generació del ratolí deficient en Nkx2.5, letal en estadis embrionals, va mostrar que és necessari per a la diferenciació terminal dels cardiomiòcits, com ara l'expressió de gens ventriculars, i que el seu paper en la diferenciació cardíaca és crucial per al desenvolupament normal del miocardi embrional, evidenciat per la inhabilitat d'aquesta estructura cardíaca deficient en Nkx2.5 per a iniciar la torsió del tub cardíac [19].

S'han identificat altres membres de la família NK2 en els cors vertebrats, però la seva expressió és transitòria, no es conserva entre diferents espècies i no se n'ha estudiat la seva funció en detall [20].

Els factors de transcripció de la família GATA també intervenen en la diferenciació de les cèl·lules cardíques. Existeixen sis gens GATA en vertebrats, dels quals tres (Gata-4, Gata-5 i Gata-6) s'expressen en el cor en desenvolupament [21]. S'ha trobat que els membres GATA són reguladors de la cardiogènesi en diversos models, per exemple, les cèl·lules mare embrionals sense Gata-4 tenen una capacitat de diferenciació cardíaca molt reduïda [22] i en el peix zebra les mutacions a Gata-5 donen lloc a una incorrecta diferenciació cardíaca [23]. Més recentment s'ha trobat que els gens GATA regulen directament la transcripció dels gens de proteïnes contràctils i d'altres gens reguladors com Mef2 i Hand [17].

Els membres de la família de MEF2 (Myocyte-enhancer factor-2) són els factors de transcripció més antics, conservats en moltes espècies i específics de múscul [24]. S'expressen en precursors cardiogènics, cardiomiòcits i també en cèl·lules dels músculs esquelètic i llis. A mesura que les cèl·lules musculars s'han anat diversificant han esdevingut un component central de la regulació gènica muscular, i són l'única família de factors de transcripció coneguda associada amb la diferenciació de tots els tipus de cèl·lules musculars. En les cèl·lules musculars cardíques, cooperen amb els factors de transcripció centrals per tal de regular l'expressió dels gens de proteïnes contràctils [24], i es requereixen, en general, per a la transcripció de gens necessaris per a la diferenciació i creixement dels cardiomiòcits [25]. En el múscul cardíac, els gens Mef2 estan sota el control de les proteïnes NK2 [14]. En vertebrats s'han descrit quatre membres: Mef2-A, B, C, D. L'estudi del mutant de Mef2c ha evidenciat que és necessari per a l'activació de gens de proteïnes contràctils i la formació d'estructures cardíques derivades del SHF, com el ventricle dret [26], la seva funció, en canvi, no és essencial per al creixement postnatal i la funció del múscul estriat [27]. Per contra, Mef2a i Mef2d són importants per a la biologia postnatal del cor; els ratolins deficients en Mef2a (la variant més abundant en el cor adult [28]) tenen una desorganització important dels mitocondris, dilatació del ventricle dret i moren poc després del naixement [29]; mentre que Mef2d està implicat en la resposta del miocardi adult a l'estrès, sense cap contribució evident en el desenvolupament cardíac [30]. La

transcripció dels gens Mef2 és estimulada mitjançant la senyalització per Calci/Calmodulina, a través de l'activació de la fosfatasa Calcineurina [31]. Resultats previs del nostre grup mostren que la traducció de les proteïnes Mef2 és induïda per estímuls hipertròfics, mentre que la seva transcripció no es veu afectada. A més, mostren que això es porta a terme mitjançant la via de la Calcineurina i d'una manera dependent de Polypyrimidine Tract Binding Protein (PTB) [32].

Les PTB són una família de proteïnes que interaccionen amb el RNA, que tenen funcions importants en la maduració del RNA i traducció proteica i són conegudes pel seu rol en la regulació del *splicing* alternatiu en molts trànscrips [33], incloent els que codifiquen per proteïnes sarcomèriques tals com la β -tropomiosin o la α -actinina [34]. A més de la seva funció en les variants de *splicing*, resultats previs del nostre grup demostren la implicació de PTB en la traducció de les proteïnes apoptòtiques durant la diferenciació dels cardiomiòcits [35]. Tot això suggereix que PTB té una contribució important en el control post-transcripcional dels gens durant la diferenciació muscular. Un exemple d'aquesta funció en la diferenciació muscular és el paper que juga PTB en el *splicing* alternatiu dels gens Mef2. Resultats previs del nostre grup indiquen que PTB evita la inclusió d'un exó anomenat β en els trànscrips de Mef2 [36], aquest exó el converteix en una variant amb una activitat transcripcional més forta, i a més, la inclusió d'aquest exó augmenta durant la diferenciació [28]. Finalment, en el mateix treball del nostre grup [36] es mostra com l'expressió de PTB cau durant la diferenciació dels cardiomiòcits i ho fa d'una manera dependent de caspases i on hi està implicada l'activitat de cFLIP (FLICE-like inhibitory protein) i HDAC (Class II histone deacetylases).

Existeixen com a mínim set gens de la família Tbx amb expressió cardíaca en els amniotes. El més destacat és Tbx5, la manca del qual suposa problemes en la regió posterior del cor, d'on deriven les aurícules, i també en la formació del sistema de conducció cardíac [37]. També s'ha descrit que Tbx20 i Tbx2, i Tbx3 estan implicats en la correcta formació dels ventricles i el sistema de conducció respectivament [38].

La duplicació gènica durant l'evolució ha permès augmentar el nombre de gens codificants d'aquests factors de transcripció, aquestes duplicacions han fet possible la modificació o adquisició de noves estructures i funcions cardíques [17]. La correlació entre la duplicació gènica i la complexitat cardíaca es fa evident en els gens Hand, que

regulen el creixement ventricular [39]. Els amfibis i peixos, que tenen un únic ventricle, només expressen un gen Hand, en el peix zebra la manca de Hand impossibilita la formació del ventricle [40]. En ratolí, en canvi, s'expressen dos gens Hand: Hand1 i Hand2, en el FHF i SHF respectivament [14]. Els ratolins sense Hand2 no formen el ventricle dret [41] i les cèl·lules mare embrionals sense Hand1 són incapaces de contribuir a la curvatura del cor que forma el ventricle esquerre [42]; finalment, la deleció de Hand2 i Nkx2.5, que regula l'expressió de Hand1 en el FHF, elimina les dues cambres ventriculars produint un cor format únicament d'aurícula [43]. Així doncs, la duplicació de les cambres ventriculars durant l'evolució es correspon amb la duplicació dels gens Hand.

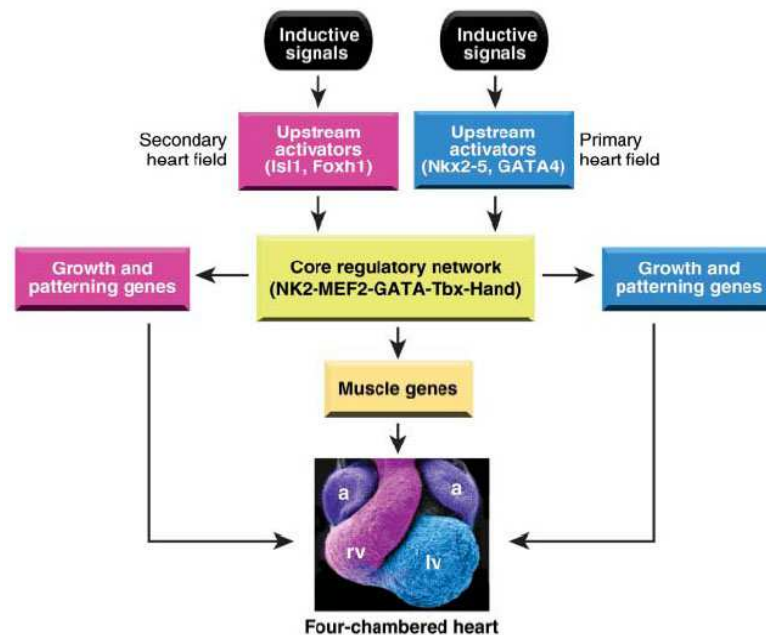


Figura 5: xarxa de factors de transcripció en el desenvolupament cardíac. Els senyals inductors activen factors de transcripció en el FHF i SHF, que al seu torn activen gens del grup central, aquests es regulen entre ells per tal d'activar gens específics de múscul i gens que controlen el creixement. En blau: FHF, en rosa:SHF [17].

Les cèl·lules musculars cardíacques dels ventricles dret i esquerre depenen del mateix grup de factors de transcripció per a la diferenciació dels cardiomiòcits i l'expressió de proteïnes contràctils, però els activadors d'aquesta xarxa genètica difereixen en les cèl·lules del FHF (dóna lloc al ventricle esquerre) i SHF (ventricle dret). L'adició del SHF ha requerit una nova senyalització per activar el mecanisme central de transcripció (figura 5). Isl1, que com abans s'ha dit s'expressa

específicament en el SHF, activa el gen Mef2c en el SHF [44]. Donat que Isl1 no és específic del teixit cardíac, la seva inicial activació requereix l'acció d'altres factors, aquests poden ser els factors GATA i Nkx2.5. Foxh1 (Forkhead box protein H1) és un altre factor de transcripció que pot activar Mef2c en el SHF, mitjançant una via independent a Isl1 [45]. Mutacions en Isl1, Mef2c o Foxh1, resulten en problemes cardíacs relacionats amb el SHF, demostrant la dependència entre aquests reguladors cardiogènics [15, 26, 45].

2- Apoptosi

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada conservat evolutivament, ordenat, ràpid i essencial per al desenvolupament embrionari i l'homeòstasi tissular dels organismes pluricel·lulars. Es desencadena en resposta a un estrès cel·lular que pot ser tant fisiològic com patològic, permetent l'eliminació de cèl·lules produïdes en excés, velles, mal formades o amb danys genètics. La primera definició de l'apoptosi va ser el 1972, quan Kerr et al. van descobrir un tipus de mort cel·lular diferent de la mort necròtica (causada principalment per estímuls nocius i que es caracteritza per la distorsió i degradació dels orgànuls que acaben induint una inflamació cel·lular) [46]. Durant l'apoptosi, la morfologia cel·lular s'altera: hi ha una reducció del volum de la cèl·lula, es condensa la cromatina, es fragmenta el nucli i es degrada el DNA, la funció mitocondrial es perd, i llavors es formen cossos apoptòtics i la cèl·lula és fagocitada i degradada; tot això, sense resposta inflamatòria [47].

El control del nombre correcte de cèl·lules està determinat per un balanç entre la proliferació cel·lular i la mort cel·lular, tan important i complexa és la regulació de la proliferació com de la mort cel·lular. Els defectes, tant per excés com per manca, en l'apoptosi, poden causar diferents tipus de patologies. Així doncs, la manca d'apoptosi contribueix a la progressió del càncer, malalties autoimmunes i infeccions virals, mentre que un excés d'apoptosi està implicat en les malalties neurodegeneratives, problemes de les cèl·lules sanguínies i VIH [48].

2.1- Caspases.

La majoria dels canvis morfològics que caracteritzen l'apoptosi estan causats per un grup de proteases, homòlogues les unes amb les altres i que s'han conservat evolutivament des dels nemàtodes, hidres i insectes fins als humans [49]. La participació en l'apoptosi d'una proteasa amb una cisteïna al centre catalític essencial per a la seva activitat, CED-3, es va descobrir en el nemàtode *C.elegans* [50], des de llavors s'ha demostrat que el mecanisme de l'apoptosi s'ha conservat evolutivament, i s'executa per una família de proteases que talla els seus substrats després dels residus Aspartat, d'aquí el seu nom: Cistein-dependent Aspartate-directed proteases o caspases [51]. S'han identificat 14 caspases en mamífers, 11 de les quals també en el genoma humà [52].

Les caspases es sintetitzen en forma de precursors inactius, anomenats zimògens. Aquests zimògens estan formats de tres dominis: el prodomini N-terminal i els dominis p20 i p10, que es troben en l'enzim madur i actiu. L'enzim madur és un heterotetràmer que conté 2 heterodímers p20/p10 i dos centres actius [52].

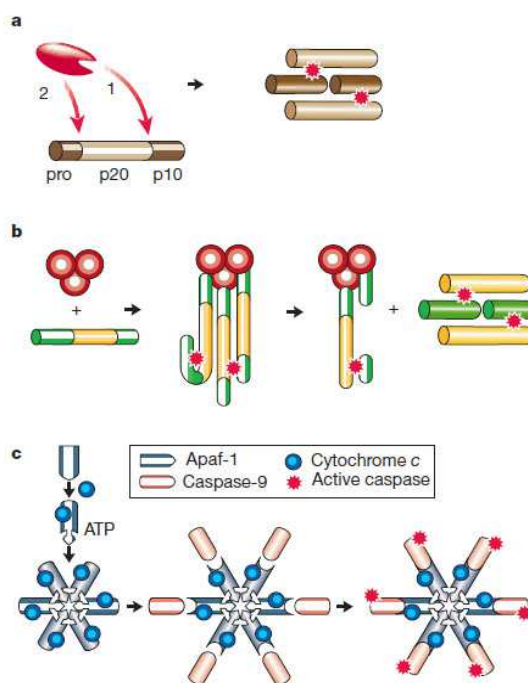


Figura 6: mecanismes d'activació de les caspases. A) Activació de la procaspasa mitjançant una caspasa ja activa. **B)** Activació per proximitat. **C)** Formació d'un holoenzim [49].

La majoria de caspases s'activen per un tall proteolític del zimògen entre els dominis p20 i p10, i sovint també entre el prodomini i el domini p20; cal destacar que tots aquests talls es produeixen en llocs Asp-X (llocs candidats a ser substrat de les caspases), per tant, és possible que hi hagi una activació autocatalítica [53]. S'han descrit bàsicament tres mecanismes d'activació de les caspases (figura 6). El primer mecanisme és el més simple i consisteix en l'activació d'una procaspasa per mitjà d'una caspasa ja activa. Un segon tipus d'activació és per mitjà de la proximitat, es produeix una agregació de múltiples molècules procaspasa que d'alguna manera, resulta en una cros-activació [49]. L'últim mecanisme descrit és el més complex, està descrit per la Caspasa 9 i consisteix en la formació d'un holoenzim; en aquesta activació no hi ha proteòlisi sinó un canvi conformacional: Apaf-1 (Apoptotic-Protease Activating Factor-1) recluta la procaspasa 9, i depenent de citocrom c i ATP formen un complex anomenat apoptosoma [54].

Les caspases es poden classificar segons la seva estructura en caspases de prodomini llarg (caspasa 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 i 12) i caspases de prodomini curt (caspasa 3, 6, 7 i 14). Els prodominis llargs tenen uns motius d'interacció proteïna-proteïna, necessaris i importants per a la seva activació, com són el domini CARD (caspase-activation recruitment domain) en les caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 i 12 i el domini DED (death effector domain) en les caspases 8 i 10 [55]. Els dominis DED i CARD sembla que tenen un mateix origen ancestral i la seva estructura s'adapta perfectament a la seva funció de facilitar les interaccions proteïna-proteïna [56] (figura 7). Les caspases de prodomini curt s'activen a partir d'una caspasa ja activa, mentre que les de prodomini llarg s'activen típicament pel mecanisme de la proximitat, descrit sobretot per la Caspasa 8 [57] (figura 6).

Les caspases també es poden classificar segons la seva funció, de les 14 caspases descrites en mamífers, s'ha trobat que 7 tenen importància durant l'apoptosi (figura 7). Les caspases apoptòtiques es poden dividir en dues classes: caspases iniciadores (caspasa 2, 8, 9 i 10), que són caspases de prodomini llarg i inicien el procés de mort; i caspases efectores o executores (caspasa 3, 6 i 7), de prodomini curt i que són els autèntics efectors apoptòtics, responsables de tallar i activar les molècules implicades en la mort cel·lular [58].

unió del lligand al seu receptor es forma un complex lligand-receptor que s'unirà a molècules adaptadores citosòliques com FADD (Fas-Associated Death Domain Protein), mitjançant els seus dominis de mort (DD), que permetrà reclutar diferents molècules de procaspasa 8. Aquesta unió forma un complex anomenat DISC (Death-Inducing Signalling Complex), la formació del qual activa la Caspasa 8 iniciadora mitjançant el model de proximitat (figura 6) [63].

Un cop activada la Caspasa 8, aquesta pot activar les caspases efectores 3 i 7, que al seu torn iniciaran els esdeveniments que portaran a la mort apoptòtica de la cèl·lula, com ara la degradació del DNA mitjançant CAD (Caspase-Dependent DNase), que és una endonucleasa activada per les caspases que degrada el DNA nuclear impedit la recuperació de la cèl·lula (figura 8) [64].

Un component adicional d'aquesta via apoptòtica és la proteïna anomenada FLIP (FLICE-inhibitory protein). Aquesta té dues formes: FLIPs, que conté dos dominis de mort, i la forma FLIP(L), que a més, conté un domini caspasa on el residu cisteïna del centre actiu s'ha substituït per una tirosina, és un homòleg de Caspasa 8 sense activitat proteolítica. FLIPs i FLIP(L) interaccionen amb FADD desplaçant la Caspasa 8 del complex DISC tot inhibint l'apoptosi en tots els tipus de receptors de mort [65].

2.2.2-Via intrínseca.

El rol dels mitocondris en l'apoptosi es va trobar gràcies a la identificació de diverses proteïnes mitocondrials capaces d'activar directament el programa apoptòtic. Normalment aquestes proteïnes es troben en l'espai intermembrana dels mitocondris, però en resposta a diferents estímuls apoptòtics són alliberades al citosol i promouen l'apoptosi, tot activant les caspases i nucleases [66]. Així doncs, a diferència de la via extrínseca, que es dona en resposta a un grup especialitzat de senyals de mort, la via intrínseca s'inicia degut a una àmplia varietat d'estímuls intracel·lulars i extracel·lulars, com són la pèrdua d'adhesió, la manca de factors tròfics o de supervivència, l'estrès oxidatiu i el dany al DNA.

En resposta a aquests estímuls de mort, la membrana externa mitocondrial esdevé permeable (MOMP: mitochondrial outer-membrane permeabilization) i s'allibera citocrom c, que iniciarà la cascada apoptòtica [67]. El citocrom c s'uneix a Apaf-1, una proteïna citosòlica que conté un domini d'unió amb caspasa anomenat

CARD; gràcies a la unió de citocrom c, Apaf-1 guanya afinitat per l'ATP i quan l'ATP s'uneix al complex citocrom c/Apaf-1 té lloc una oligomerització que forma l'apoptosoma [68]. Els dominis CARD de l'Apaf-1 són exposats en l'apoptosoma, i reclutaran molècules de procaspasa 9 en el complex, tot facilitant la seva activació [54] (figura 6). La Caspasa 9 activa és la responsable d'activar les caspases efectores 3 i 7, que processaran els substrats que donaran lloc als canvis morfològics que caracteritzen l'apoptosi. Les vies intrínseca i extrínseca convergeixen en aquest punt, en l'activació de les caspases efectores.

A més de citocrom c, durant l'apoptosi també s'allibera al citosol una altra proteïna anomenada Smac/Diablo (Second Mitochondrial-derived Activator of Caspases) [69]. Aquesta, a través del domini BIR3 s'uneix a XIAP (inhibidor de caspasa 9) tot inhibint-la i, per tant, reactivant l'apoptosi [70]. A més d'unir-se al domini BIR3, Smac també té cert efecte sobre BIR2 (motiu d'unió de XIAP a les caspases 3 i 7), per tant, també pot aturar la inhibició de les caspases efectores per XIAP, tot i que amb menys intensitat que per Caspasa 9 [59] (figura 9). Aquest sistema directe de competició i exclusió entre Smac i les caspases actives suggereix un interessant control del sistema, ja que alts nivells de IAP inhibiran les caspases actives de l'apoptosoma, però quan el dany al mitocondri sigui sever, s'alliberarà més Smac, juntament amb citocrom c, que eliminarà la inhibició per IAP i permetrà prosseguir amb l'apoptosi [66].

El punt d'integració entre la via de receptors de mort i la via mitocondrial es deu a BID, un membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2 (apartat 2.2.2.1). La caspasa 8 media el tall de BID, que augmenta la seva activitat pro-mort, i resulta en la seva translocació al mitocondri, on promou la sortida de citocrom c. [71]. Majoritàriament, però, les dues vies funcionen independentment una de l'altra.

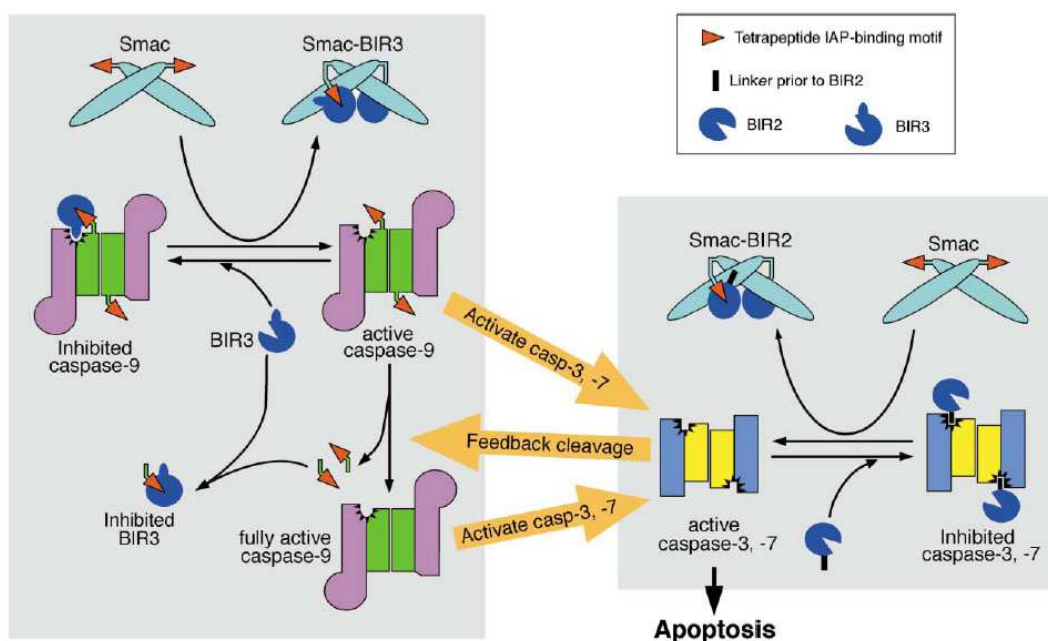


Figura 9: esquema dels mecanismes d'inhibició i activació per Smac de les caspases. A l'esquerra es mostra com Smac reactiva la caspasa 9 mitjançant la unió a BIR3. A la dreta es mostra com es reactiven les caspases efectores quan Smac s'uneix al domini BIR2 [59].

2.2.2.1. Família de proteïnes reguladores de l'apoptosi, Bcl2.

La família de proteïnes Bcl2 s'ha estudiat intensament degut a la seva importància en la regulació de l'apoptosi i la tumorigènesi, ja que controlen el punt de no-retorn per a la supervivència de la cèl·lula, la MOMP [72]. El gen Bcl-2 (cèl·lula B del limfoma-2) es va descobrir en els limfomes fol·liculars de les cèl·lules B, d'aquí el seu nom [73]. I poc després, es va introduir un nou concepte en la carcinogènesi, que és que la sobreexpressió de Bcl-2 no promou la proliferació cel·lular, tal com fan la majoria d'oncogens, sinó que la seva sobreexpressió inhibeix la mort cel·lular, identificant, doncs, el primer regulador apoptòtic [74].

En mamífers es coneixen una dotzena de proteïnes de la família Bcl2, incloent la proteïna Bcl-2 i altres proteïnes amb una estructura tridimensional o bé una estructura secundària similars. El primer homòleg pro-apoptòtic, BAX, es va identificar per la seva interacció amb Bcl-2 [75], i el ràtio entre molècules anti/pro-apoptòtiques, com Bcl-2/BAX constitueix un mecanisme de control de la susceptibilitat de l'apoptosis mediada per la via intrínseca, que utilitza els mitocondris per amplificar els senyals de mort [63]. La família Bcl2 es pot dividir en tres subclasses, definides en part pel grau

d'homologia en les quatre regions BH (Bcl-2 homology): BH1, BH2, BH3 i BH4. (figura 10).

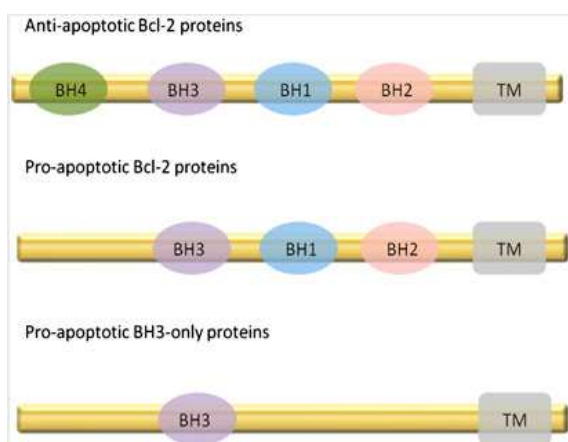


Figura 10: esquema dels membres de la família Bcl-2. La figura mostra el grau d'homologia entre els tres grups de la família Bcl-2, els membres anti-apoptòtics (com Bcl-2 i Bcl-X_L) tenen els quatre dominis BH, els pro-apoptòtics BAX i BAK tenen els dominis BH1-3 i les proteïnes del grup BH3-only (com BID i BIM) només tenen el domini BH3. TM=domini transmembrana [76].

- El primer grup el formen els membres anti-apoptòtics Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-B i Bcl-W; aquests conserven l'homologia en els quatre dominis i actuen segrestant molècules pro-apoptòtiques [77].
- El segon grup el formen els membres pro-apoptòtics BAX, BAK, BAD i BOK, aquests conserven els dominis BH1-3; en concret les proteïnes BAX i BAK són crucials per a induir la MOMP i el consegüent alliberament de molècules inductores de l'apoptosi [78]. Després d'un senyal de mort, BAX s'insereix en la membrana externa mitocondrial, BAK (que ja es troba a la membrana) també s'activa i s'indueix la seva oligomerització que resulta en la permeabilització de la membrana. El mecanisme precís de l'activació de la MOMP no es coneix, però està àmpliament acceptat que l'oligomerització de BAX i BAK pot originar els porus per on s'alliberaran el citocrom c i la resta de molècules inductores de l'apoptosi [79].
- L'últim grup el formen les proteïnes que només tenen el domini BH3 (BH3-only), i inclou: BID, BIM, BAD, BIK, NOXA, PUMA, HRK i BMF, són també pro-apoptòtiques i tenen un paper important en el desenvolupament, l'homeòstasi tissular, la immunitat i la supressió tumoral [80]. Hi ha estudis que indiquen que les proteïnes del grup BH3 s'uneixen a Bcl-2 i Bcl-X_L tot impedit que aquestes puguin unir-se a BAX i BAK i inactivar-les [81]. Per contra, un altre model postula que les proteïnes BAX i BAK són activades directament per les proteïnes

BH3-only BIM, BID i PUMA [82]. Així doncs, sigui directa o indirectament, l'activació d'aquestes molècules, resulta en l'activació de BAX i BAK, que són necessàries per a l'execució de l'apoptosi.

2.2.3- Via independent de caspases.

Tot i que no hi ha dubte que una activació massiva de les caspases és suficient per a la inducció de la mort cel·lular, estudis realitzats amb inhibidors indiquen que la inhibició de les caspases sovint no és suficient per a evitar la mort [83]. Quan això passa, té lloc una mort semblant a la mort apoptòtica clàssica però amb algun aspecte morfològic diferent, no hi ha una condensació total de la cromatina ni formació de cossos apoptòtics, però també hi ha una fragmentació total del DNA, tot i que la nucleasa CAD no sembla estar-hi implicada, com sí que ho està en la via caspasa-dependent [84]. Així doncs, es podria dir que la mort independent de caspases és una pèrdua de la viabilitat de la cèl·lula, induïda per condicions pro-apoptòtiques, que utilitza les mateixes molècules per a iniciar la mort que l'apoptosi i que té lloc tot i la inhibició o disrupció de la funció de les caspases [85].

Les partícules que s'alliberen dels mitocondris durant la MOMP tenen diferents efectes: activació de les caspases, condensació de la cromatina, fragmentació del DNA i generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) [86]. En condicions normals, l'activació de les caspases mitjançant l'alliberament de citocrom c i la formació de l'apoptosoma és suficient per a assegurar una mort cel·lular, però en contextos on no es poden activar les caspases, són altres constituents mitocondrials que s'han alliberat mitjançant la MOMP els que actuaran per a que tingui lloc la mort cel·lular, aquest és el cas de AIF (Apoptosis-inducing Factor), Endo G (Endonuclease G) i també HTRA2/OMI (High-temperature-requirement protein A2) [83]. La figura 11 mostra la convergència entre la via independent de caspases i la via intrínseca dependent de caspases.

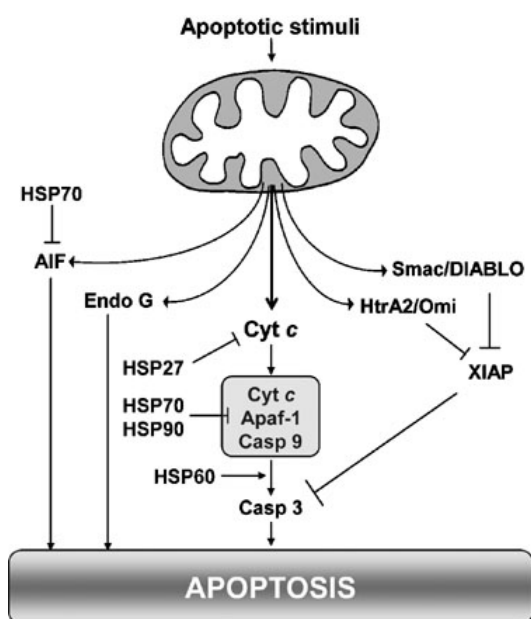


Figura 11: alliberament de molècules pro-apoptòtiques del mitocondri. Aquesta figura mostra com el mitocondri allibera tant molècules que activaran la via caspasa com molècules que activen la mort independentment de les caspases [87].

- AIF: AIF és una flavoproteïna que durant la mort cel·lular passa del mitocondri al nucli, on causa la condensació de la cromatina i la fragmentació del DNA [88], no obstant, no està clar si la fragmentació del DNA la porta a terme directament AIF o bé una altra proteïna amb la qual està associat, ja que AIF no té, per si mateix, activitat nucleasa. A més de la seva funció com a executor apoptòtic, AIF en la seva forma mitocondrial participa en la formació i correcta activitat del complex-I de la cadena respiratòria [89], per tant, en ser alliberat dels mitocondris, contribueix a la mort independent de caspases de dues formes: afectant la funció mitocondrial i induint la degradació de la cromatina.
- EndoG: EndoG és la principal endonucleasa de l'espai intermembrana mitocondrial, es creu que participa en la biogènesi mitocondrial mitjançant la regulació de la síntesi i reparació del DNA mitocondrial [90, 91]. Igual com passa amb AIF, EndoG s'activa específicament per estímuls apoptòtics, és alliberada del mitocondri al citosol i finalment es transloca al nucli, on tallarà el DNA en fragments nucleosomals independentment de les caspases [92].
- HTRA2/OMI: HTRA2/OMI és una serina proteasa que s'allibera al citosol juntament amb AIF i EndoG. Quan és sobre-expressada, s'indueix una mort cel·lular que no es pot inhibir amb inhibidors de caspases i on no s'hi troba activitat caspasa [93]. HTRA2/OMI actua unint-se i inhibint a XIAP i, per tant, reactivant la via caspasa; tot i això, quan s'ha estudiat la manca d'aquesta

proteïna el que s'ha vist és neurodegeneració, possiblement deguda a un estrès mitocondrial [94]. Això indica que possiblement la principal funció de HTRA2/OMI és mantenir la fisiologia mitocondrial més que no pas regular activament la mort cel·lular mitjançant la seva interacció amb XIAP.

3- Implicació de l'apoptosi en el desenvolupament.

3.1- Regulació dels gens apoptòtics durant el desenvolupament.

Diferents estudis demostren que en alguns òrgans els nivells d'expressió dels gens de la via apoptòtica varien en funció de l'estadi de desenvolupament. Entre aquests estudis hi ha un estudi del nostre grup que descriu l'expressió dels gens implicats en la senyalització dependent de caspases i mostra com durant el desenvolupament postnatal té lloc un silenciament d'aquests gens en el fetge i sobretot en el cervell i en el cor [95].

Doss et al. van fer un anàlisi global del transcriptoma de cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare embrionals [96]. L'estudi transcriptòmic portat a terme comparava les cèl·lules mare en procés de diferenciació amb els cardiomiòcits totalment diferenciats i caracteritzats, els resultats més destacats indiquen que en els cardiomiòcits hi ha un enriquiment en els gens del citoesquelet cardíac, gens del metabolisme d'àcids grassos, gens implicats en la respiració i obtenció d'ATP i gens de regulació de la mida cel·lular, tots ells necessaris per a portar a terme la seva funció fisiològica. Mentre que d'entre els gens sota-expressats en els cardiomiòcits destaquen els gens de cicle cel·lular i els gens apoptòtics. Això suporta el fet que els cardiomiòcits han desenvolupat mecanismes de citoprotecció i supervivència cel·lular, degut també a l'absència de divisió cel·lular [97].

Com s'ha explicat anteriorment, Apaf-1 i Bim són gens pro-apoptòtics importants en la via intrínseca regulant l'activació de les caspases executores. Diferents estudis demostren una important repressió de l'expressió d'aquests gens i de Caspasa 3 entre els dies 10 i 15 postnatsals en el cervell, cor i múscul esquelètic, teixits formats bàsicament de cèl·lules completament diferenciades on l'activitat dels gens apoptòtics per al desenvolupament ja no és necessària i on, a més, aquesta manca de

mediadors de l'apoptosi pot significar una mesura de protecció contra pèrdues cel·lulars irreversibles [98, 99]. Altres estudis demostren també la repressió d'aquests i altres gens apoptòtics en altres teixits, tals com la retina postnatal [100, 101]. Pel que fa al moment en que es produeix la repressió d'aquests gens, els estudis coincideixen en que té lloc a nivell de transcripció, ja que es troben reprimits tant els nivells de mRNA com de proteïna [95, 98]. Un teixit on no té lloc aquesta repressió gènica és el timus, on contínuament hi ha desenvolupament de cèl·lules T i la presència dels gens apoptòtics és necessària per a la selecció negativa i positiva dels timòcits en desenvolupament [98].

Yaklovev et al. varen suggerir que després del dany al cervell té lloc una activació de Caspasa 3 [102], els anàlisis de l'expressió de Caspasa 3 i Apaf-1 en el cervell danyat demostren que el dany al cervell comporta una reactivació d'aquests gens, ja que n'augmenta l'expressió quan es compara amb teixit sa [99]. Per contra, estudis del nostre grup demostren que després de sotmetre els cardiomiòcits a una font d'estrès, mitjançant inductors d'hipertrofia i mitjançant condicions d'isquèmia, no es pot reactivar la maquinària apoptòtica, no hi ha canvis en l'expressió de gens apoptòtics [95]. Això suggereix que els cardiomiòcits adults perden l'habilitat d'expressar gens que regulen la via apoptòtica dependent de caspases. Estudis complementaris demostren que el dany al DNA causat per les condicions d'isquèmia es deu a un dany mitocondrial, que permet l'alliberament EndoG i AIF, principals responsables d'aquesta degradació del DNA, i per tant, té lloc una activació de la via apoptòtica independent de caspases [103, 104], indicant doncs que després de la diferenciació, els mecanismes independents de caspases substitueixen les caspases en el dany cel·lular isquèmic dels cardiomiòcits.

En resum, en els teixits formats principalment de cèl·lules totalment diferenciades, el procés de diferenciació va acompanyat d'un silenciament dels gens apoptòtics, que en el cas de les cèl·lules del cervell són re-activats després del dany, però en els cardiomiòcits el que es produeix és una activació dels mecanismes independents de caspases.

3.2- Importància de l'apoptosi en el desenvolupament.

Glücksman va articular per primera vegada que l'apoptosi té un paper important en el desenvolupament dels animals [105]. Les funcions essencials de l'apoptosi en el desenvolupament són la formació i eliminació d'estructures, el control del nombre de cèl·lules i l'eliminació de les cèl·lules anormals [106]. A tall d'exemple, l'apoptosi és important per a la formació d'estructures tals com els dits de les mans i peus, per a eliminar estructures innecessàries com les cèl·lules mamàries en els mascles mamífers i per eliminar cèl·lules amb mutacions que poden donar lloc a creixements incontrolats [107]. El descobriment de les funcions dels diferents gens apoptòtics en el desenvolupament ha estat possible mitjançant l'estudi de models deficients en dits gens.

La mutació d'Apaf1 suposa greus problemes de desenvolupament, tal i com s'ha demostrat amb l'estudi de ratolins mutants per Apaf1 [108, 109]. La manca d'Apaf1 és letal en estadis embrionals, sobre E16,5; l'anàlisi dels embrions ha revelat que aquests ratolins tenen un defecte important en la fusió de les estructures cràneo-facials, a més, mantenen les cèl·lules interdigitals degut a un insuficient nivell d'apoptosi i la seva retina té hiperplàsia, ocupant gran part de la cavitat ocular. El principal problema, però, sembla ser la distorsió morfològica que presenten al cervell, causada per una hiperplàsia, formada d'un excés de cèl·lules neuronals en diferenciació que s'han acumulat per la manca d'apoptosi en el cervell. Per contra, no presenten problemes en altres òrgans com el cor, fetge i pulmó.

Caspasa 3 també s'ha demostrat que té importància en el desenvolupament [110]. Els animals deficients en aquest gen neixen amb una freqüència més baixa de l'esperada, i els que ho fan, moren entre una i tres setmanes després. Les principals anomalies que presenten aquests animals són, una altra vegada, en el cervell, que presenta masses protuberants degut a l'excés de cèl·lules que comporta la manca d'apoptosi. El fet que no hi hagi anomalies en el cor, pulmó, fetge, ronyó i melsa suggereix que altres proteases de la mateixa família que es troben co-expressades en aquests teixits o tipus cel·lulars puguin tenir un paper important durant l'apoptosi i aquesta redundància pugui compensar la manca de Caspasa 3. Un fenotip molt semblant és el que presenten els animals deficients en Caspasa 9 [111], la seva manca suposa la mort en estadis embrionals i la principal causa sembla una malformació en el

cervell deguda a una acumulació de cèl·lules supernumeràries. La similitud entre els fenotips dels mutants de Apaf1, Caspasa 3 i Caspasa 9 demostra que tots tres gens es troben en la mateixa via d'activació apoptòtica.

La manca del membre anti-apoptòtic Bcl-X_L també s'ha demostrat que suposa problemes en el desenvolupament [112]. Aquesta mutació és letal en estadis embrionals i està causada principalment per un excés d'apoptosi en les zones del cervell i la medulla espinal amb neurones en diferenciació, i també per un excés d'apoptosi en el sistema limfoide, amb un nombre insuficient de limfòcits i timòcits.

Els ratolins deficients en el membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2, Bax, són viables i no tenen un fenotip important [113], com tampoc el tenen els ratolins deficients en Bak [114]. En canvi, la mutació de tots dos gens, Bax i Bak, sí que el té [114]. La majoria d'aquests ratolins moren en estadis embrionals, i el 10% que sobreviuen presenten multitud d'anomalies. No són capaços d'eliminar el teixit interdigital, les femelles presenten una vagina imperforada i tenen una acumulació de cèl·lules limfoides degut a la manca d'apoptosi; a més, els anàlisis del cervell revelen que és més gran del compte degut a una acumulació de neurones en diferents regions i presenten anormalitats neurològiques, caracteritzades per comportaments estranys davant de situacions d'estrès.

Cal tenir en compte, però, que alguns dels estudis *in vivo* per a estudiar com afecta l'apoptosi en el desenvolupament han generat resultats artefactuals. Un exemple important n'és el KO per Caspasa 3, on s'ha trobat que el fenotip varia significativament segons el fons genètic del ratolí [115]. Així doncs, en l'estudi explicat de Kuida et al. els ratolins Caspasa 3^{-/-}, que tenen un fons genètic mixte de 129S1/svImJ(129) i C57BL16J (B6), moren durant les primeres setmanes de vida degut a un excés de cèl·lules en el cervell. Els ratolins de la soca 129, en canvi, són encara més sensibles a la deleció de Caspasa 3 ja que presenten defectes més severes en el cervell i molts dels Caspasa 3^{-/-} no arriben a néixer. Per contra, els ratolins B6 Caspasa 3^{-/-} neixen amb proporcions normals i la majoria arriben a l'estat adult [115]. L'explicació per això és que en ratolí, no en humà, la Caspasa 7 és tan eficient com la Caspasa 3 activant la DNAsa CAD, responsable de la fragmentació del DNA durant l'apoptosi; i quan varen analitzar els nivells d'aquesta caspasa en els embrions de les diferents soques varen trobar que la soca B6 expressa més Caspasa 7 en el cervell que

la soca 129 [115]. Per tant, en la soca B6 i en els teixits de la soca 129 diferents al cervell, la manca de Caspasa 3 està compensada per Caspasa 7, permetent que es porti a terme una apoptosi ben regulada i un desenvolupament normal, mentre que en el cervell dels ratolins de la soca 129, la baixa expressió de Caspasa 7 no permet compensar la manca de Caspasa 3, el cervell no es desenvolupa correctament i els ratolins tenen una mort prematura.

En resum, gràcies a l'estudi amb animals KO per gens apoptòtics s'ha pogut determinar que l'apoptosi participa activament durant el desenvolupament, però cal tenir present que alguns dels fenotips observats poden variar segons el fons genètic de l'animal o no ser deguts específica o directament a la manca del gen apoptòtic, sinó ser una conseqüència secundària de la manca del gen en un altre teixit, tal com passa amb la manca de Caspasa 8, on el fenotip cardíac observat es deu a la manca del gen a la placenta [116, 117], s'explica en detall en el punt 4.2.1.

3.3- Importància de l'apoptosi en el desenvolupament cardíac.

La correcta formació dels conductes de sortida del cor (OFT, *outflow tract*) que connecta el ventricle embrional amb l'aorta és essencial per al desenvolupament del sistema dual de circulació en el cor, ja que proveeix les estructures que formen les connexions entre els ventricles i les artèries. Les malformacions en el OFT són una de les principals causes de malalties cardíques congènites. La característica fonamental de la correcta morfologia del OFT és el seu escurçament i la seva rotació, ja que durant el desenvolupament, el OFT passa de ser una estructura allargada a ser una petita estructura en forma d'anell [118]. El principal mecanisme cel·lular que podria explicar aquesta reducció en la llargada del OFT és l'apoptosi [119].

El grup de Watanabe et al. han fet diferents estudis que han corroborat que l'apoptosi és la responsable d'aquest escurçament i que, per tant, és necessària per a la correcta formació del OFT cardíac. En un primer estudi [120], mitjançant un marcatge específic dels cardiomiòcits del OFT amb β -galactosidasa es va determinar que durant el procés de desenvolupament té lloc una reducció del nombre de cèl·lules β -gal-positives, per tant, hi ha una eliminació de cardiomiòcits del OFT; a més, aquest pic de reducció del marcatge coincideix amb el pic d'abundància d'apoptosi i amb el moment del desenvolupament quan té lloc el canvi morfològic en el OFT, indicant que

és necessària una eliminació per apoptosi de miòcits per al correcte desenvolupament del OFT.

En un altre estudi van treballar amb inhibidors químics d'apoptosi per a observar quines conseqüències té la manca d'apoptosi en el desenvolupament del OFT [121]. El que es va observar és que els inhibidors d'apoptosi comporten un desenvolupament anormal del OFT, amb masses de teixit miocàrdic que excedeix per sobre els ventricles, i sense l'escurçament i la rotació necessaris en el OFT. Una altra conseqüència de la inhibició de l'apoptosi és la incorrecta formació i posició de les vàlvules del cor (figura 12). La conclusió d'aquests estudis és que l'apoptosi és important per a eliminar estructures residuals i esculpir el OFT cardíac per tal de poder establir les connexions entre els ventricles i les artèries.

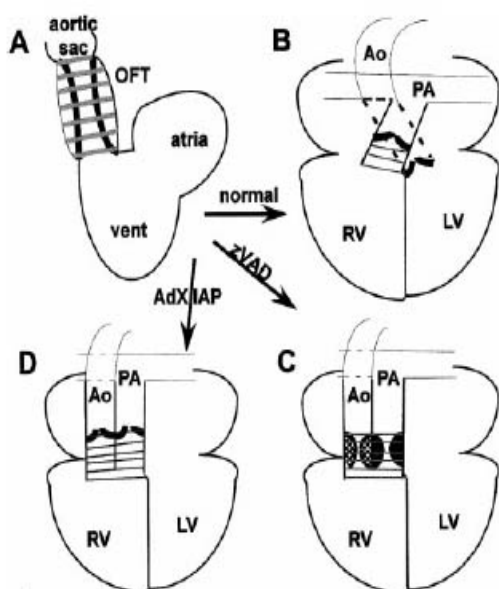


Figura 12: Diagrama del desenvolupament del OFI i efecte dels inhibidors d'apoptosi. A) Circulació única que existeix en el cor abans del remodelatge del OFI. **B)** Escurçament del OFI, rotació de les artèries (Ao=aorta, PA=artèria pulmonar) i formació de les vàlvules cardíacques durant el desenvolupament normal. **C)** Efecte de l'inhibidor de caspases d'ampli espectre zVAD, on no hi ha escurçament ni rotació del OFI i no s'han format bé les vàlvules cardíacques. **D)** Efecte dels inhibidors de caspases XIAP, no es produeix l'escurçament ni la rotació però sí es formen les vàlvules [121].

4- Funcions no apoptòtiques dels membres apoptòtics.

4.1- Funcions en teixits no-cardíacs.

4.1.1-Caspases.

L'observació d'activació de les caspases i la identificació de substrats de caspasa en absència de mort cel·lular indiquen una funció de les caspases més enllà de

l'apoptosi. Les funcions no-apoptòtiques de les caspases poden ser mitjançant la proteòlisi portada a terme pel seu domini catalític o bé mitjançant els seus prodominis. Aquestes funcions demostren que les caspases es poden activar sense una inducció de la cascada apoptòtica i, per tant, tallant específicament un grup de substrats; aquests substrats inclouen membres de diverses famílies proteiques com les citoquines, quinases, factors de transcripció i polimerases [55]. Sembla que una activació completa de les cascades de caspases està associada amb la mort cel·lular, mentre que una activació localitzada o limitada pot ser necessària per a portar a terme les seves funcions no-apoptòtiques [122].

La primera funció no-apoptòtica de les caspases es va trobar amb la caracterització de Caspasa 1, essencial per al processament de la citoquina proinflamatòria proIL-1 β a la forma madura IL-1 β [123, 124], aquesta activació promou la secreció de IL-1 β pels macròfags en resposta a bacteris, infeccions virals i molècules endògenes alliberades per cèl·lules danyades [125, 126]. Caspasa 1 també processa la IL-18 i la IL-33, i és responsable, doncs, tant de la resposta inflamatòria com de la resposta immune innata. El complex activador de la Caspasa 1 s'anomena inflamasma [125]. A més d'en la maduració de IL-1 β , s'ha trobat que la Caspasa 1 està importantment implicada en la secreció de moltes proteïnes extracel·lulars, d'entre les que destaquen moltes citoquines [127].

A més de Caspasa 1, altres caspases també juguen un paper important en la regulació de la immunitat. La principal és Caspasa 8, que participa en l'activació de la via de NF- κ B, en la diferenciació dels monòcits i en la proliferació dels limfòcits T i B [122]. Així doncs, els ratolins deficients en Caspasa 8 són incapaços de mediar una resposta contra una infecció viral [128]. En les cèl·lules T, l'activitat del prodomini de la procaspasa 8 és necessària per a activar la via NF- κ B en resposta a diferents estímuls [129]. A més, la manca de Caspasa 8 causa una reducció en l'activació de les cèl·lules T, cèl·lules B i *natural killers* després d'una estimulació [130]. Finalment, Caspasa 3 també podria regular la proliferació de les cèl·lules B; els ratolins sense Caspasa 3 tenen una hiperproliferació dels limfòcits T i B, on l'excés de cèl·lules T és degut a un problema d'apoptosi, però l'excés de cèl·lules B sembla una alteració de la regulació del cicle cel·lular més que no un problema apoptòtic [131].

Un altra funció no-apoptòtica important en la que s'han vist involucrades les caspases és la proliferació cel·lular, en concret Caspasa 3 [132]. La localització subcel·lular i la proteòlisi de substrats associats amb el control del cicle cel·lular suggereixen una funció de Caspasa 3 en la modulació del creixement cel·lular [55]. Per exemple, els nuclis de les cèl·lules en divisió de les regions proliferatives de la regió anterior del cervell de rata presenten Caspasa 3 activa [133]. Un altre estudi demostra que en les cèl·lules limfoides en proliferació, Caspasa 3 media el tall de p27, un inhibidor de CDK (cyclin-dependent kinase), tot inactivant-lo, per tant, Caspasa 3 contribueix a la inducció de la progressió del cicle cel·lular [134]. Per contra, la hiperproliferació de les cèl·lules B observada en els ratolins deficients en Caspasa 3, indica que pot actuar com a un regulador negatiu del cicle de les cèl·lules B [131]; això s'explica perquè tot i que p21 és un inhibidor del cicle cel·lular, s'ha demostrat que quan s'associa a PCNA (proliferating cell nuclear antigen), cofactor per a la DNA polimerasa- δ , promou la proliferació [135]; en línia amb això, el tall que Caspasa 3 fa a l'extrem de p21 que s'uneix a PCNA aboleix la interacció i explica l'efecte anti-proliferatiu d'aquest tall en les cèl·lules B [131, 136].

La diferenciació cel·lular és una altra de les funcions on s'han vist involucrades les caspases. És el cas de les plaquetes, on s'ha trobat que la seva maduració coincideix amb una activació de Caspasa 3 i Caspasa 9 [137], i dels queratinòcits de l'epidermis, on la seva diferenciació terminal coincideix amb l'expressió i processament de la Caspasa 14 [138]. En aquests dos processos de diferenciació les caspases fan possible l'enucleació, eliminació de nucli, necessària per a la seva completa diferenciació. A més d'en processos d'enucleació, les caspases també tenen altres funcions en la diferenciació cel·lular; és el cas de Caspasa 8, que sembla necessària en la diferenciació de la placenta [139], i de Caspasa 3, que s'activa durant la diferenciació neuronal [140] i també s'ha vist involucrada en la diferenciació del múscul esquelètic i la diferenciació osteogènica [141]; els mecanismes, però, són desconeguts [122].

Les caspases també estan implicades en la correcta diferenciació i funció del sistema nerviós central mitjançant les seves funcions no-apoptòtiques. Per exemple, en *Drosophila* participen en la correcta formació dels circuits neuronals, on l'activitat caspasa dirigeix l'escurçament de les dendrites de les neurones: una supressió de l'activitat caspasa evita l'eliminació de les dendrites, mentre que una activació global

en una neurona causa la seva mort [142]. Un altre estudi demostra que Caspasa 6 és necessària per a l'escurçament dels axons sense causar una activació apoptòtica [143]; i un altre exemple és un estudi recent que demostra que el tall de Caspasa 3 sobre una proteïna anomenada Dishevelled (Dvl1) elimina els clústers dels receptors d'acetilcolina, i això permet l'eliminació de les estructures post-sinàptiques durant la sinapsi muscular, un fet necessari per al correcte desenvolupament neuromuscular [144].

Caspasa 3 també sembla estar implicada en el destí de les cèl·lules mare embrionals (ESC). L'estat de pluripotència de les ESC està controlat pels factors de transcripció Oct4, Sox2 i Nanog [145]; durant la diferenciació de les ESC hi ha un augment de l'activitat caspasa, que media el tall de Nanog; les cèl·lules sense Caspasa 3 o resistents al tall de Nanog per Caspasa 3 són incapaces de diferenciar-se, indicant la necessitat de Caspasa 3 per a la diferenciació de les ESC [146].

Finalment, el grup de Lynn Megeney ha portat a terme diferents estudis que demostren la implicació de les caspases en la diferenciació [147], la hipertròfia [148] i el desenvolupament [149] dels cardiomiòcits. Aquests estudis es tracten en detall en el punt 4.2.

El descobriment que les caspases també tenen funcions no-apoptòtiques, està canviant el paradigma que les caspases s'han conservat únicament per la seva funció en la mort cel·lular [55].

4.1.2- Altres membres apoptòtics.

Fas o CD95 és un dels principals receptors que indueixen l'activació de l'apoptosi mitjançant la via extrínseca. La lligació de CD95, però, desencadena, a més d'una activació apoptòtica, una gran varietat d'activitats no-apoptòtiques, que poden protegir les cèl·lules i regular la seva regeneració i proliferació [150]. És el cas de les cèl·lules T, on s'ha trobat que CD95 es troba importantment sobre-regulat just després de la seva activació [151], i on, a més, si se'ls elimina CD95 es produeix limfopènia [152]; aquests estudis suggereixen que l'expressió de CD95 en les cèl·lules T és necessària per a la seva supervivència, proliferació i/o activació. El fetge és un altre teixit on s'ha trobat una funció no-apoptòtica important de CD95, ja que està involucrat en la seva regeneració després d'una hepatectomia parcial [153]; això és així

perquè el dany al fetge està associat amb les vies d'activació anti-apoptòtiques que protegeixen contra la mort cel·lular iniciada per CD95, i per tant, poden ajudar a canviar les senyals de CD95 d'apoptòtiques a no-apoptòtiques.

Una altra funció no-apoptòtica important de Fas es troba lligada amb la via ERK. Fas és capaç d'activar la via ERK (extracellular-signal regulated kinase) [154], que al seu torn desencadena la resposta cel·lular a diferents factors de creixement i diferenciació. Se sap que l'activació de la via ERK inhibeix l'apoptosi induïda per Fas i que, per contra, la seva inhibició inhibeix la proliferació induïda per Fas, suggerint que la via ERK està involucrada en la transducció dels senyals de creixement de Fas [154]. Un exemple d'aquesta connexió es troba en el sistema nerviós, on Fas induïx el creixement de les neurites d'una manera dependent de l'activació d'ERK i p35, i on la manca de Fas retarda la recuperació dels nervis perifèrics després d'un dany. Per tant, Fas, mitjançant l'activació de ERK i p35, permet el creixement de les neurites i accelera la recuperació dels nervis danyats d'una manera independent de Caspasa 8 i de la funció pro-apoptòtica [155].

FADD és un altre membre apoptòtic de la via extrínseca amb funcions no-apoptòtiques. La manca de FADD és letal en el ratolí [156], indicant que és necessari per al desenvolupament embrional. El mateix estudi, focalitzat en els òrgans limfoides, ha trobat una de les seves funcions no-apoptòtiques concretes, i és que la manca de FADD suposa un defecte en l'activació i proliferació de les cèl·lules T [156].

4.1.3- Família Bcl2.

El fet que existeixen connexions entre el cicle cel·lular i la mort cel·lular és àmpliament conegut, a més, està generalment acceptat que les cèl·lules en cicle són més susceptibles a la mort cel·lular, mentre que les cèl·lules quiescents hi són relativament més resistents [157]. Una mostra d'aquestes interconnexions entre cicle i mort cel·lulars són les funcions no-apoptòtiques dels membres de la família Bcl2, relacionades amb l'activació o bé aturada del cicle cel·lular.

La primera observació va ser que cèl·lules dependents de IL-3 sobre-expressant el membre anti-apoptòtic Bcl-2, en condicions de privació són més petites que en presència de IL-3 i, a més, queden parades en la fase G0/G1, possiblement per tal de mantenir la viabilitat quan es troben privades del factor de creixement [74]. Altres

estudis treballant amb altres tipus cel·lulars han arribat a la mateixa conclusió, l'expressió de Bcl-2 facilita la sortida a G0 i un arrest en G0/G1 d'una manera independent a la seva funció anti-apoptòtica, a la vegada que l'expressió de Bcl-2 retarda l'entrada a la fase S, indicant una inhibició de la progressió de G0 a S [158-160]. L'expressió de Bcl-XL, un altre membre anti-apoptòtic de la família Bcl2, retarda també la progressió a la fase S, demostrant que aquest efecte en el cicle cel·lular es manifesta també amb l'expressió d'altres molècules anti-apoptòtiques de la família Bcl2 i no està restringit a un únic tipus cel·lular [158, 161]. L'inhibidor de CDK, p27, normalment té la seva màxima expressió en G0 i evita l'activació de les ciclins de la fase G1, diversos grups han trobat que en cèl·lules sobre-expressant Bcl-2 p27 es troba significativament més expressat durant l'arrest a G0 [162-165], a més, un estudi amb cèl·lules p27^{-/-} demostra que l'expressió del transgen Bcl-2 o Bcl-XL sense p27 és incapaç d'aturar el cicle de les cèl·lules a G0 [165, 166]. Així doncs, Bcl2 i Bcl-XL faciliten l'arrest a G0, i aquesta prolongació de G0 és la responsable del retràs en iniciar la fase S (figura 13A).

Mentre que Bcl-2 i Bcl-XL retarden l'entrada al cicle cel·lular, Bax, un membre pro-apoptòtic de la família Bcl2, té l'efecte contrari. Les cèl·lules sobreexpressant Bax entren a la fase S més ràpid, són més grans i tenen un increment en la degradació de p27 a la vegada que un augment en l'activació dels gens activadors del cicle [167-169]. Així doncs, Bcl-2 és anti-apoptòtic i anti-proliferatiu, mentre que Bax és pro-apoptòtic i proliferatiu, suggerint que les funcions del cicle cel·lular dels membres de la família Bcl2 estan estretament lligades a les decisions de vida o mort cel·lular.

La funció de Bid, un altre membre pro-apoptòtic, en el desenvolupament i l'homeòstasi cel·lular s'ha estudiat amb ratolins Bid deficients (Bid^{-/-}), que són viables i tenen una mort cel·lular normal [170]. Quan envelleixen, però, progressen cap a un problema semblant a la leucèmia mielomonocítica, indicant un rol de Bid en el manteniment de l'homeòstasi mieloide [171]. Les cèl·lules hematopoiètiques tenen tendència a iniciar el procés d'apoptosi en resposta al dany al DNA, en absència de Bid, però, aquestes cèl·lules acumulen mutacions i són resistents a l'apoptosi. Això suggereix que Bid té un paper en la reparació del DNA, ja sigui en el punt de control del cicle cel·lular o bé integrant la resposta apoptòtica i la reparació del DNA [172]. Consistent amb aquesta hipòtesi, les cèl·lules T i els progenitors mieloides Bid^{-/-}

presenten més dany als cromosomes com a resultat d'una incorrecta reparació del DNA danyat durant la fase S del cicle cel·lular, imitant el fenotip de les cèl·lules amb problemes en la reparació del DNA [172]. En conclusió, en resposta al dany al DNA, Bid es transloca al nucli on, un cop fosforilat, té un paper en la preservació de la integritat genòmica, ja sigui integrant la resposta apoptòtica i la de reparació del DNA o bé participant directament en la reparació del DNA [172] (figura 13B).

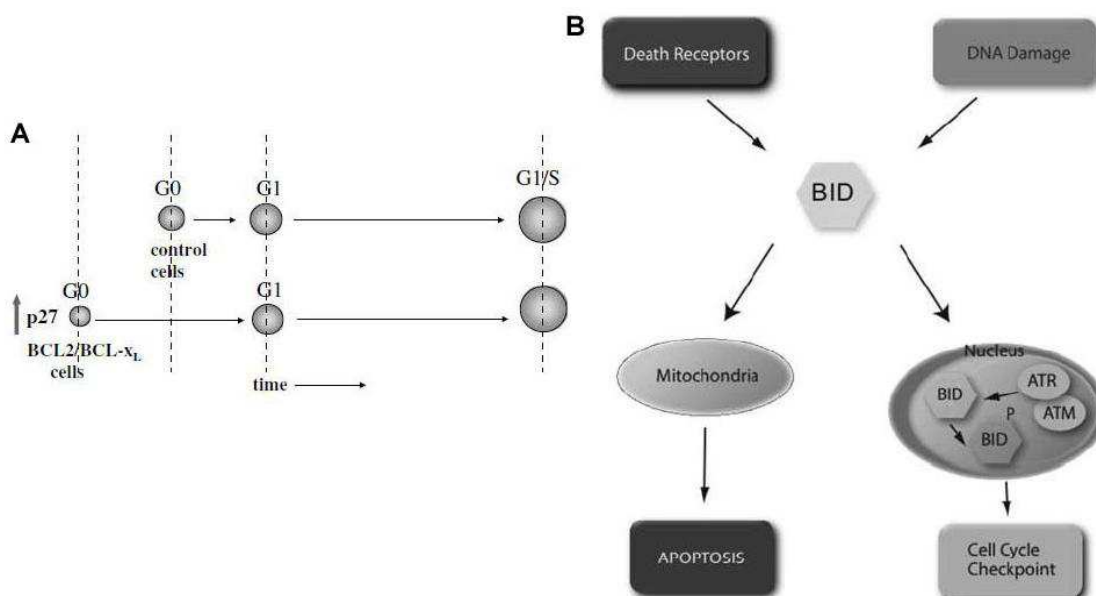


Figura 13: funcions no apoptòtiques dels membres de la família Bcl2. **A)** Habilitat de Bcl-2/Bcl-xL per a arrestar les cèl·lules en G0, suposant un retard en la progressió a G1 i la transició G1/S. **B)** Funció dual de Bid: en resposta a l'estimulació dels receptors de mort inicia el programa pro-apoptòtic al mitocondri, en resposta al dany al DNA es fosforila al nucli i participa en el control de qualitat del cicle cel·lular [157].

4.2- Funcions en el cor.

Megeney et al. han portat a terme diferents estudis que revelen noves funcions no-apoptòtiques de les caspases en el desenvolupament i diferenciació dels cardiomiòcits. Un dels estudis demostra la implicació de Caspasa 3 en la diferenciació dels miòcits mitjançant la inducció de talls al DNA [147]. D'una banda, durant el procés de diferenciació, els miòcits sofreixen talls a la cadena de DNA, uns talls qualitativament diferents a la fragmentació del DNA associada amb l'apoptosi; d'altra banda, l'activitat de Caspasa 3 s'ha demostrat ser necessària per a la diferenciació dels mioblasts [140]. Aquest estudi demostra que quan els mioblasts en diferenciació són tractats amb inhibidors de Caspasa 3, es produeix un bloqueig de la diferenciació

acompanyat d'una absència de talls al DNA [147]. Donat que Caspasa 3 activa la DNAsa CAD tot alliberant-la del seu inhibidor ICAD [173], varen analitzar si CAD podria ser el responsable d'aquests talls al DNA. La sobre-expressió de ICAD altera la diferenciació dels miòcits i la inhibició de CAD mitjançant shRNA inhibeix el programa de diferenciació. Tots aquests resultats junts indiquen que els talls al DNA induïts per Caspasa 3/CAD són necessaris per a la diferenciació dels miòcits [147].

El mateix grup presenta en un altre estudi com la via no-canònica de wingless (Wnt) (independent de β -catenina) promou el desenvolupament dels cardiomiòcits mitjançant la supressió, mediada per caspases, de la via canònica (dependent de β -catenina) [149]. Wnt11, un membre de la via no-canònica de Wnt, és un factor important per a la diferenciació cardíaca: la seva sobre-expressió causa un augment important en el nombre de cardiomiòcits mentre que la seva repressió mitjançant shRNA causa un alentiment en la diferenciació dels cardiomiòcits, demostrant la implicació d'aquesta via no-canònica en el desenvolupament dels cardiomiòcits. D'altra banda, la manca de senyalització canònica en el miocardi suggereix que aquesta branca de l'activitat Wnt no participa en el desenvolupament del múscul cardíac. La co-estimulació de Wnt11 i els components de la via canònica comporta una inhibició de l'activació canònica, suggerint que Wnt11 està implicat en la seva supressió. Donat que Caspasa 3 talla β -catenina durant l'apoptosi [174] varen estudiar si la senyalització per caspases podria ser la responsable de la supressió de la via canònica de Wnt durant el desenvolupament dels cardiomiòcits. La inhibició de Caspasa 3 o de Caspasa 8 comporta una restauració de l'activitat β -catenina en presència de Wnt11, a més, en presència d'un d'aquests inhibidors es produeix una disminució en el nombre de cardiomiòcits en el miocardi embrional; en cèl·lules P19, el pic de més activitat de les caspases 3 i 8 coincideix amb l'inici del programa de diferenciació dels cardiomiòcits, mantenint-se els mateixos nivells d'apoptosi; demostrant una funció no-apoptòtica de la via extrínseca de les caspases en el desenvolupament dels cardiomiòcits. La mostra que Wnt11 és el responsable de l'activació d'aquestes caspases durant la diferenciació, és que la seva sobre-expressió estimula l'activitat de les caspases 3 i 8 i la seva supressió en causa una disminució durant la maduració dels cardiomiòcits [149]. A més a més, el ratolí mutant per Wnt11 té una acumulació i una localització alterada de β -catenina que causa una disrupció en el desenvolupament del miocardi ventricular

[175]. Tots aquests resultats demostren que Wnt11 participa en la diferenciació dels cardiomiòcits, en part, activant la via de les caspases 8 i 3, que al seu torn inhibeixen la senyalització de la via canònica de Wnt [149].

Un darrer estudi recent del grup de Lynn Megeney demostra que l'activació de la via intrínseca de les caspases és necessària per a la hipertròfia dels cardiomiòcits [148]. El tractament de cardiomiòcits primaris amb l'agonista hipertròfic phenylephrine (PE) comporta l'activació de Caspasa 3 i Caspasa 9, sense comportar un augment de la mort apoptòtica; en les mateixes cèl·lules tractades amb PE, la inhibició de Caspasa 9 comporta una disminució en la mida dels cardiomiòcits i en l'expressió del marcador prohipertròfic NPPA o ANP (atrial natriuretic peptide); el mateix es produeix amb la inhibició de Caspasa 3 mitjançant p53, l'inhibidor més potent de les caspases, excepte de Caspasa 9 [176]. Estudis similars en cors sencers tractats amb PE van donar els mateixos resultats, una disminució en el pes del cor i la mida de les cèl·lules dels cors infectats amb p53, en comparació als cors control [148]. Per contra, el tractament dels cardiomiòcits amb Procaspase 3 activating compound 1 (PAC-1), un activador de Caspasa 3, indueix la seva hipertròfia, amb un augment de la mida de les cèl·lules i de l'expressió de NPPA. Totes aquestes proves són una clara evidència que la via intrínseca mediada per caspases és essencial per a la hipertròfia dels cardiomiòcits [148].

Com s'ha explicat en el punt 2.2.1, l'activació de Fas requereix la unió del lligand de Fas, FasL. En molts tipus cel·lulars, l'activació de Fas per la lligació de FasL comporta una activació de caspases i mort cel·lular, tot i això, la resposta a l'activació de Fas és específica de cada tipus cel·lular i en certes cèl·lules la resposta a la lligació de Fas és una inducció de factors transcripció més que no pas la mort cel·lular [177-179], aquest és el cas dels cardiomiòcits.

Un estudi amb rates mostra com en condicions d'hipertròfia hi ha un augment de l'expressió de Fas [180], aquest estudi també correlaciona la lligació de Fas amb un augment de la transcripció i l'activitat del factor de transcripció AP-1, un activador transcripcional que en els cardiomiòcits està implicat en la regulació transcripcional de gens associats a una resposta hipertròfica [181, 182]. D'altra banda, el mateix estudi demostra com l'augment d'expressió de Fas durant la hipertròfia no comporta un augment de l'apoptosi ni la fragmentació del DNA, indicant que és una funció de Fas-

FasL independent de la mort cel·lular [180]. El treball amb ratolins transgènics FasL ha arribat a unes conclusions semblants, els cors expressant alts nivells de FasL mostren una hipertròfia concèntrica en aurícules i ventricles, a més, l'anàlisi de l'expressió gènica d'aquests cors mostra que tenen un increment en els nivells de transcrit de gens característics de la hipertròfia [183]; tot i aquest fenotip, aquests cors no tenen signes d'apoptosi ni necrosi. Per tant, la sobreexpressió de FasL en el cor resulta en una dèbil resposta proinflamatòria caracteritzada per una lleu hipertròfia i canvis intersticials, i no comporta una destrucció del teixit miocàrdic [183]. Un darrer estudi [184] mostra com la resposta hipertròfica que tenen els cardiomiòcits en resposta a l'activació de Fas es deu a la fosforilació de GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), un regulador negatiu de la hipertròfia en els cardiomiòcits que en fosforilar-se queda inactiu i això és suficient per a desenvolupar una hipertròfia en cardiomiòcits *in vitro* [185, 186]. A més, aquest estudi mostra com Fas és necessari per al desenvolupament de la hipertròfia en resposta a l'estrès per un excés de pressió, ja que ratolins sense el receptor Fas són incapaços de desenvolupar-la [184].

4.2.1- En el desenvolupament cardíac.

Mitjançant l'estudi d'animals deficients en algun dels membres apoptòtics ha estat possible trobar que aquests tenen una funció important en el desenvolupament cardíac i que aquesta és independent de la seva funció en l'activació/inhibició de la mort cel·lular.

Durant el desenvolupament dels embrions, FADD, un membre de la via extrínseca d'apoptosi, s'expressa en tot l'embrió però l'expressió més elevada es concentra en el cervell, miocardi i columna vertebral en formació [187]. Els ratolins deficients en FADD, FADD^{-/-}, moren en estadis embrionals entre els dies E11,5-E12,5 [156, 187] i el seu fenotip està caracteritzat per hemorràgies abdominals i un desenvolupament cardíac anormal, amb un miocardi més prim del normal i mala traberculació [187] (figura 14 E,F). Pel que fa als nivells d'apoptosi, no hi ha diferències entre els animals control i els FADD^{-/-}. La letalitat d'aquesta mutació contrasta amb la viabilitat dels animals deficients en els receptors Fas o TNF [188, 189], que inicien la cascada apoptòtica extrínseca de la que FADD forma part, i fa pensar que durant

l'embriogènesi FADD podria transduir senyals provinents d'altres receptors implicats en la proliferació i supervivència, i no en la mort cel·lular.

Caspasa 8 és un altre membre de la via extrínseca de l'apoptosi. És tracta d'un gen bastant abundant en el cor en desenvolupament, sobretot en el ventricle [117]. Els ratolins Caspasa 8^{-/-} tenen també una mort prenatal cap a E11,5 i el fenotip afecta principalment el cor, que es caracteritza per una musculatura ventricular més prima i en alguns casos no diferent del teixit mesenquimal, també presenten una acumulació d'eritròcits en òrgans com el fetge i el pulmó; una possibilitat podria ser que aquest fenotip es degués a una angiogènesi anormal [117] (figura 14 A, B). El fenotip dels Caspasa 8^{-/-} és, com passa amb el dels FADD^{-/-}, diferent al dels ratolins deficientes en els receptors de la via extrínseca d'apoptosi, que són viables i presenten problemes immunològics però no en el desenvolupament; i per contra, és comparable al dels ratolins FADD^{-/-}, indicant que l'efecte letal de FADD o Caspasa 8 possiblement no prové de la manca de mort sinó d'algun altre efecte propagat a través d'aquesta via [117].

FLIP, un inhibidor de la via extrínseca per la seva homologia a Caspasa 8, és un altre dels gens la manca dels quals comporta un desenvolupament cardíac anormal. Els nivells més elevats d'expressió de FLIP es troben en el cor, on podria tenir una funció important protegint els cardiomiòcits de l'apoptosi [190]. Els ratolins FLIP^{-/-} moren també en estadis embrionals, i el fenotip que presenten es caracteritza per una dilatació de l'espai pericàrdic, indicant una insuficiència en la funció cardíaca, i un incorrecte desenvolupament del cor, amb un miocardi prim i defectes en la traberculació [191] (figura 14 C, D). Els nivells d'apoptosi dels ratolins FLIP^{-/-} són comparables als dels ratolins control, a més, no sembla haver-hi problemes en proliferació [191]; resultats pràcticament idèntics als observats en ratolins FADD^{-/-} i Caspasa 8^{-/-}.

Els estudis de diferents ratolins *knock out* mostren que moltes vegades la mort en estadis embrionals es deu a malformacions de la placenta [192], aquest, però, no és el cas dels ratolins FLIP^{-/-} i FADD^{-/-}, que no presenten cap anormalitat en la seva formació [187, 191]. El fenotip cardíac que presenten els ratolins Caspasa 8^{-/-}, per contra, sembla tractar-se d'una conseqüència secundària de defectes en la placenta [116]. Sakamaki et al. van crear un ratolí amb el centre actiu de la Caspasa 8 mutat que presenta un fenotip cardíac equivalent al del ratolí Caspasa 8^{-/-} [117]. El primer

problema que van observar en el desenvolupament d'aquests ratolins és una vasculatura de la placenta poc desenvolupada, amb unes venes amb una quantitat insuficient de sang, indicant, doncs, que la Caspasa 8 és necessària per al correcte desenvolupament de la placenta i la vascularització extra-embrionària [116]. En el mateix estudi mitjançant el cultiu dels embrions sencers, un sistema que imita la situació *in vivo* entre E8-E12 [193], varen observar com la malformació cardíaca no es produeix en aquests embrions i els estudis histològics demostren que presenten un desenvolupament cardíac normal. Aquests resultats indiquen que la Caspasa 8 no està directament involucrada en el desenvolupament cardíac per sí mateix, sinó que els problemes cardíacs són un efecte secundari de les malformacions placentàries que causa la manca d'aquesta caspasa [116].

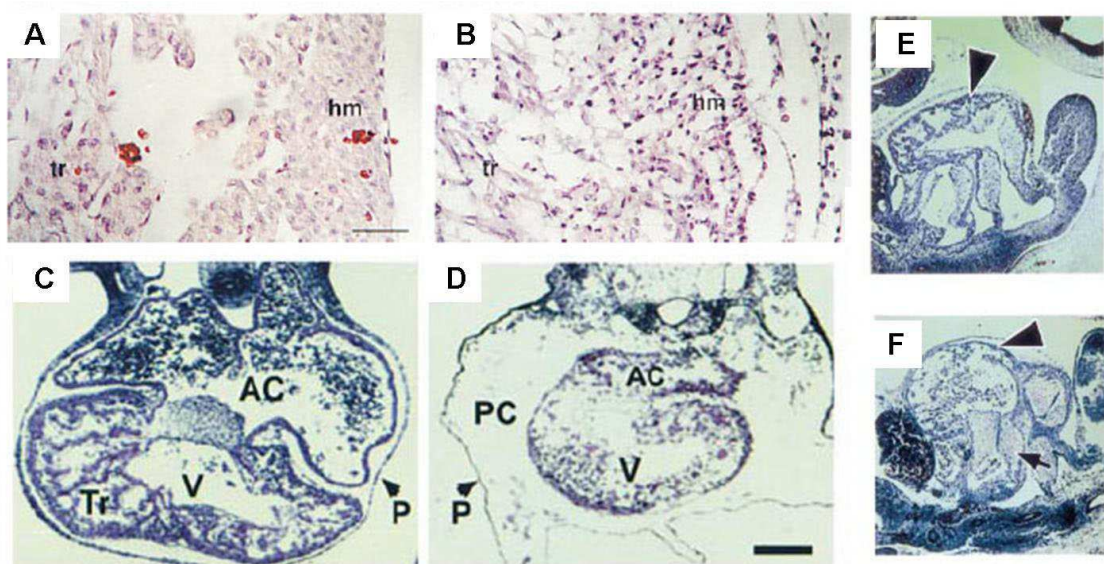


Figura 14: Histologia de cors embrionals WT i KO per diferents membres apoptòtics. A-B) Mala compactació de la musculatura cardíaca degut a la manca de caspasa 8 A) cor WT B) cor caspasa 8^{-/-}. Escala:40µm. hm=cèl·lules musculars, tr=trabèrcula. **C-D)** Talls horitzontals de seccions de cor C) WT i D) Flip^{-/-}. Escala:100µm AC=cambra atrial, V=ventricle, PC=cavitat pericàrdica, P=pericardi. **E-F)** Tincions de seccions longitudinals d'embrions E) WT i D) FADD^{-/-}. Escala=500µm Adaptada de [117, 187, 191].

En conclusió, la manca de FADD o FLIP, comporta un incorrecte desenvolupament cardíac caracteritzat per problemes en la compactació de la musculatura i la traberculació que causen la mort embrional. Així doncs, sembla que aquestes molècules, que poden interaccionar físicament en el citosol, cooperen en la

mateixa via de senyalització per a facilitar el desenvolupament cardíac independentment de la mort cel·lular [191]. Pel que fa a l'incorrecte desenvolupament cardíac dels ratolins Caspasa 8, es tracta una conseqüència secundària a la malformació de la placenta, aquesta sí causada per la manca d'aquesta caspasa [116].

A més de la funció dels membres de la via extrínseca d'apoptosi en el desenvolupament cardíac, també s'ha observat que les caspases efectores 3 i 7 hi juguen un paper important. Mentre que el fenotip dels animals Caspasa 3^{-/-} està caracteritzat per una manca d'apoptosi que suposa una formació anormal en el cervell i una mort prematura durant les primeres setmanes de vida [110]; els animals Caspasa 7^{-/-} tenen una aparença, morfologia dels òrgans i desenvolupament limfoide normals, es creu que Caspasa 3 podria compensar aquesta manca [194]. En canvi, la doble deleció de les caspases 3 i 7 comporta una mort prematura durant les primeres hores de vida i un fenotip cardíac important, essent normal el desenvolupament del cervell [194]. Mitjançant estudis histològics s'ha observat que els animals Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} (DKO) presenten un cor amb una dilatació de les aurícules important i una desorganització i no compactació de la musculatura ventricular (figura 15). La no compactació de la musculatura també la presenten els animals sense FADD, Flip o Caspasa 8, la manca d'aquests, en canvi, com ja s'ha explicat, és letal en estadis embrionals; això podria indicar que la letalitat s'indueix per vies diferents, però el fenotip cardíac per una mateixa via on les caspases 3 i 7 en són les efectores [194].

El mateix treball ha estudiat la funció apoptòtica concreta de les dues caspases efectores treballant amb cèl·lules mancades d'una, de les dues i cèl·lules control, els resultats indiquen que Caspasa 3 està implicada en la fragmentació del DNA i en els canvis morfològics típics de l'apoptosi, mentre que Caspasa 7 és més important per a la pèrdua de viabilitat cel·lular, essent crucial en aquest fet la combinació de les dues caspases [194]. El treball també presenta que aquestes caspases participen en esdeveniments que es creien típics de les caspases iniciadores, tals com la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial, que contribueix a la mort cel·lular alterant la funció mitocondrial [195, 196], tot i que hi ha múltiples rutes per a regular la funció mitocondrial durant l'apoptosi. Així doncs, aquest estudi conclou que les dues caspases efectores 3 i 7 són crucials per a portar a terme correctament l'apoptosi i que a més, la seva combinació és important per al correcte desenvolupament cardíac [194], tot i que

al tractar-se d'un Doble-Knock out global, els efectes cardíacs poden provenir de l'expressió de les caspases en altres tipus cel·lulars.

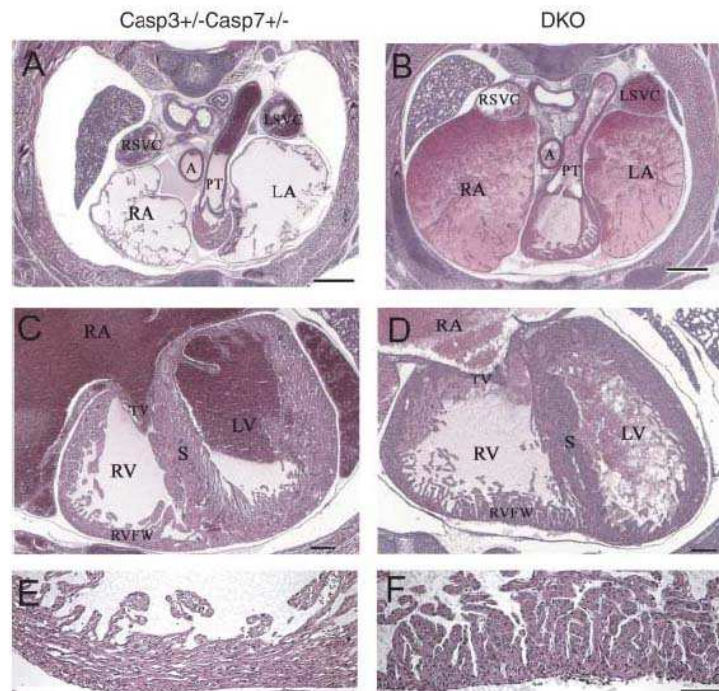


Figura 15: Desenvolupament cardíac en embrions DKO. Hematoxilina-eosina de seccions transverses de cors embrionals E20. E i F: magnificació de la paret ventricular. Escales: A-B:500µm, C-D:200 µm, E-F:100µm. Ao=aorta, RA=aurícula dreta, LA=aurícula esquerra, RV=ventricle dret, LV=ventricle esquerre, S=septe, RVCV=paret ventricle dret, TV=vàlvula tricúspide, LVCV=vena cava superior esquerra [194].

5- La hipertròfia cardíaca i la cardiomiopatia isquèmica.

5.1- La hipertròfia cardíaca.

El cor mamífer és el responsable de bombejar la sang a través del sistema circulatori per tal de portar l'oxigen i nutrients cap als òrgans i tornar el diòxid de carboni als pulmons. En resposta a un augment en la càrrega de treball, normalment causada per una estimulació patològica o bé fisiològica, en el cor té lloc un procés de creixement anomenat hipertròfia [197]. La hipertròfia, però, és un fenomen més complex que un simple "augment en la mida". Com s'ha dit, després del naixement els cardiomiòcits perden l'habilitat de proliferar, i l'augment en la massa cardíaca es deu a la hipertròfia dels cardiomiòcits individuals (figura 16) [198]. La hipertròfia cardíaca normalment té lloc en resposta a condicions patològiques com la hipertensió, les

disfuncions valvulars i l'infart de miocardi, que dona lloc a una remodelació ventricular, dilatació, fibrosis i pèrdua de capacitat cardíaca [199]. No obstant, el miocardi també pot desenvolupar una forma adaptativa d'hipertròfia cardíaca, anomenada hipertròfia fisiològica, que es diferencia fonamentalment de la patològica perquè el cor no desenvolupa cap malaltia i se'n pot beneficiar [200] (figura 16).

La hipertròfia per sí mateixa redueix l'estrès de la paret ventricular tot augmentant-ne la gruixària. La hipertròfia cardíaca es pot classificar en excèntrica i concèntrica, segons la geometria del cor i la dels cardiomiòcits individuals (figura 16) [201]. La hipertròfia excèntrica es caracteritza per un augment en el volum ventricular degut a un creixement coordinat de la gruixària del septe i la paret ventricular, en condicions patològiques la hipertròfia excèntrica pot donar lloc a una dilatació de la paret deguda a un allargament dels cardiomiòcits. La hipertròfia concèntrica es caracteritza per una reducció en la dimensió de la cambra ventricular i un augment del septe i la paret, els cardiomiòcits individuals augmenten més en gruixària que en llargària (figura 16) [201].

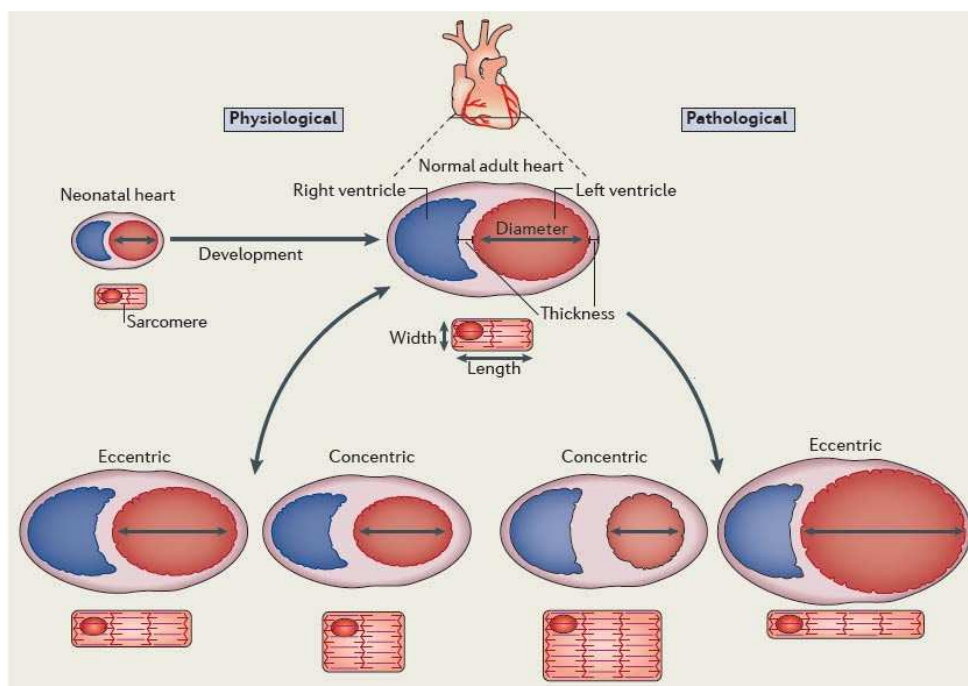


Figura 16: geometria de la hipertròfia cardíaca. Formes que pot presentar la hipertròfia en el cor i en els cardiomiòcits, segons si es tracta d'una hipertròfia patològica o fisiològica [201].

La hipertròfia cardíaca fisiològica, a més de ser la responsable de l'augment en la mida del cor des del naixement a l'estat adult, també es presenta per exemple en la

mare durant l'embaràs i en atletes en resposta a un exercici extrem o repetitiu. És un tipus d'hipertròfia lleu, caracteritzada per un 10-20% d'increment en el pes del cor normalitzat amb el pes corporal [201]. En el cas de la hipertròfia postnatal, l'augment en la massa ventricular entre el naixement i l'adult és del doble o inclús més, com a resultat d'un increment en el diàmetre dels cardiomiòcits [202].

La hipertròfia patològica, per contra, s'indueix per desordres tals com la hipertensió sistèmica o pulmonar, l'infart de miocardi, malalties de les artèries coronàries, mutacions en gens codificants de proteïnes sarcomèriques, cardiomiopatia diabètica i metabòlica, insuficiència valvular i defectes congènits cardíacs. Aquesta hipertròfia s'associa amb un increment del nivell de mort dels miòcits, remodelació fibròtica i una disminució de la funció sistòlica i diastòlica que sovint progressa cap a una fallada cardíaca [203]. La hipertròfia patològica té dues fases, la primera, una fase compensatòria on, en resposta a l'estrès, les parets del cor augmenten la seva gruixària en un intent per a compensar l'estrès. Aquest augment es deu a un augment de la mida dels cardiomiòcits i a un augment en la deposició de col·làgens i altres components de la matriu extracel·lular, en un procés anomenat fibrosi. Aquesta hipertròfia compensada freqüentment dóna lloc a un estadi final de la hipertròfia, la descompensació, on a mesura que les fibres de col·lagen es dipositen, la funció cardíaca es veu progressivament alterada, el cor no pot bombejar prou sang per a suplir les demandes del cos i sovint té lloc una fallada cardíaca (figura 17).

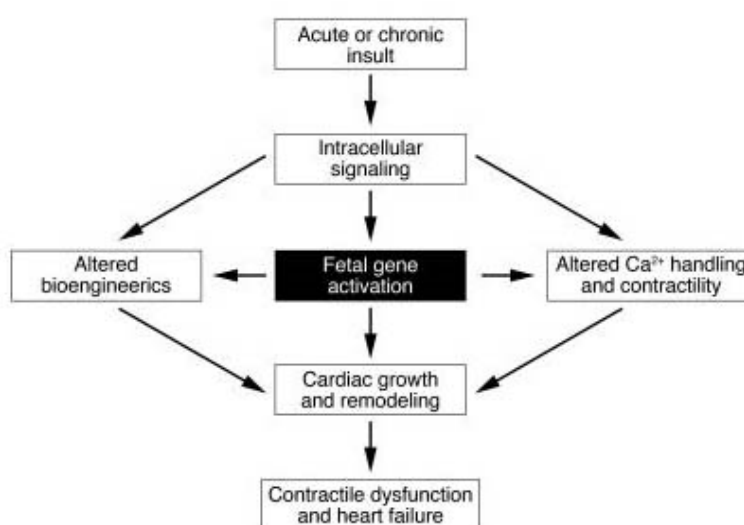


Figura 17: anormalitats associades amb la remodelació cardíaca durant la hipertròfia patològica i la fallada cardíaca [204].

La hipertròfia pot afectar el perfil dels substrats metabòlics del miocardi, durant el desenvolupament la principal font d'energia dels cardiomiòcits en proliferació és la glicòlisi, mentre que després del naixement augmenta la capacitat mitocondrial i l'oxidació dels àcids grassos pren més importància i acaba sent la via metabòlica primària per a generar energia en el cor [205]. A més, mentre que en la hipertròfia fisiològica es manté un balanç entre l'oxidació glicolítica i la dels àcids grassos, augmenten les dues, la hipertròfia patològica s'associa amb un canvi en el perfil metabòlic, passa d'oxidatiu a glicolític [206, 207], un canvi a un metabolisme característic dels estadis fetals, que va acompanyat de l'activació d'un programa gènic fetal que inclou gens que regulen la contractilitat cardíaca i el maneig del calci [208] (figura 17). Una característica important de la hipertròfia fisiològica és la manca d'inducció del programa d'estrès, clàssicament associat amb el desenvolupament de la hipertròfia patològica. A més, els gens codificants per proteïnes del maneig del calci també es mantenen sense variacions durant la hipertròfia fisiològica, mentre que molts d'ells són alterats en la patològica [209]. Així mateix, la hipertròfia fisiològica no està associada amb substitucions fibroses o intersticials, com sí que ho està la patològica [209]; en són un exemple el col·lagen I, que s'acumula en cors amb hipertròfia patològica i són un primer senyal de fallada cardíaca [210], i marcadors de l'activació dels fibroblasts cardíacs, tals com l' α -actina de múscul llis, que es mantenen invariables en rates exposades a entrenaments de resistència [211].

5.1.1- Vies d'inducció d'hipertròfia.

S'han caracteritzat un gran nombre de vies de senyalització intracel·lular involucrades en la resposta hipertròfica. Algunes involucrades en la hipertròfia fisiològica, i altres que determinen una hipertròfia patològica que ràpidament indueix contractilitat cardíaca i fallada cardíaca [210] (figura 18).

5.1.1.1- Mecanismes d'inducció de la hipertròfia fisiològica.

La hipertròfia fisiològica s'inicia per diferents lligands, com l'hormona tiroide, la insulina, l'hormona del creixement i IGF1 (insulin-like growth factor 1)[199]. L'hormona tiroide és un activador transcripcional del creixement postnatal, que s'ha observat que augmenta dràsticament en nens i ratolins després del naixement. La insulina en el cor

afecta la senyalització del transport de la glucosa, la glicòlisi, la glicogènesi, l'oxidació d'àcids grassos i la síntesi de proteïna; a més, s'uneix al receptor d'insulina tirosina kinasa (IR), l'activació del qual activarà la via de senyalització PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt, implicada en la hipertròfia fisiològica, tal com s'explica a continuació [212]. El lligand IGF1 es sintetitza i secreta sobretot pel fetge en resposta a l'hormona de creixement i després es dirigeix als teixits on facilita el creixement. Els nivells de IGF1 i d'hormona de creixement en el cor augmenten després de fer exercici, indicant la seva implicació en la resposta hipertròfica fisiològica; IGF1 s'uneix al seu receptor, IGF1R, i aquest activa també la via PI3K-Akt [213]. Tots aquests lligands i senyals convergeixen en un nombre finit de vies de senyalització intracel·lular.

L'activació de la via PI3K/Akt/GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) és una d'aquestes vies. La sobre-expressió de PI3K o Akt en cors de ratolins transgènics indueix un augment en la mida dels cardiomiòcits i una hipertròfia concèntrica amb absència de fibrosi i una funció cardíaca correcta [214, 215], per tant, tenen un rol específic en la hipertròfia fisiològica. Les senyals de PI3K i Akt convergeixen en la fosforilació de GSK3 β per tal d'inhibir la seva activitat kinasa [216]. Quan activa, GSK3 β fosforila i inhibeix diverses molècules involucrades en la senyalització hipertròfica, la seva inactivació mitjançant fosforilació és suficient per a induir la hipertròfia en els cardiomiòcits *in vitro* [185, 186] (figura 18).

El receptor de la família de citoquines interleuquina 6, gp130, té també un rol crucial en la hipertròfia cardíaca i la prevenció de la seva transició a fallada cardíaca [217]. Els complexos mTOR, que regulen el creixement cel·lular i la supervivència, també estan implicats en el control del creixement adaptatiu del cor [201].

Finalment, també participen en el creixement fisiològic les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ERK1/2 (Extracellular-signal regulated kinases), que s'activen en els cardiomiòcits en cultiu per diversos estímuls d'estrès, tals com factors de creixement. Els ratolins transgènics amb una sobre-activació de ERK1/2 presenten una hipertròfia compensada, concèntrica i amb bona funció contràctil [218]. A més, la inhibició de ERK1/2 causa una major dilatació cardíaca patològica en resposta a l'estrès [219]; resultats semblants s'observen en ratolins amb una disrupció de ERK1 i ERK2 en el cor, que presenten problemes cardíacs en resposta a l'estrès o inclús l'edat [220]. Tot això demostra que la senyalització per ERK1/2 és un component crucial de la

resposta hipertròfica fisiològica protectora i, de fet, protegeix els cardiomiòcits de la mort després del dany isquèmic [221].

En resum, el cor pot créixer fins a un nivell determinat en resposta a estímuls fisiològics sense un augment de la morbiditat i mortalitat. La hipertròfia fisiològica, a més, es podria considerar una forma de prevenir la disfunció cardíaca, ja que la pèrdua del control de la hipertròfia fisiològica i les vies que controlen l'homeòstasi del creixement dels cardiomiòcits promou directament dilatació i possiblement disfunció i fallada cardíaca [201], aquest és el cas dels ratolins sense ERK1 i ERK2, que presenten uns cardiomiòcits incapaços de créixer en amplada i això suposa l'activació d'un programa molecular erroni que comporta un creixement allargat dels cardiomiòcits que donen lloc a una fallada cardíaca [220].

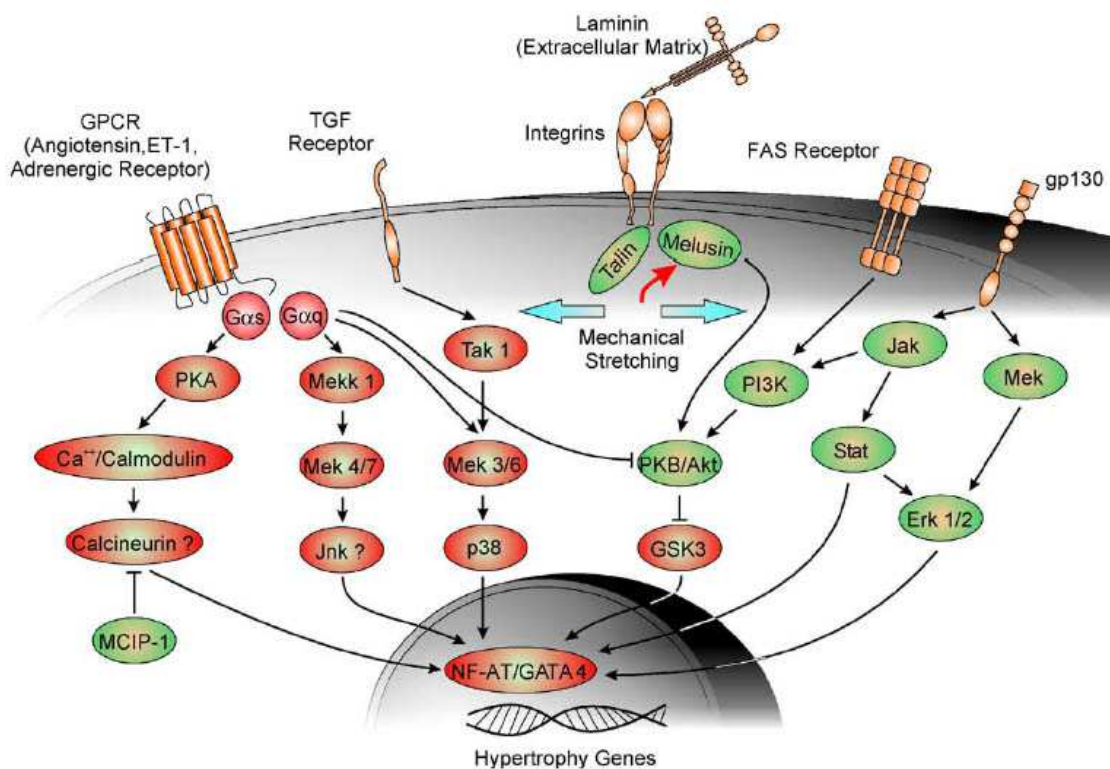


Figura 18: Molècules de la senyalització intracel·lular activades durant la hipertròfia. En verd, molècules de les vies de senyalització que un cop activades tenen un rol protector en la progressió cap a la fallada cardíaca. Per contra, l'activació de les molècules en vermell afavoreix la transició cap a la hipertrofia patològica i la possible fallada cardíaca [210].

5.1.1.2- Mecanismes d'inducció de la hipertròfia patològica.

Les vies de senyalització que s'expliquen a continuació participen en una remodelació hipertròfica cardíaca que afavoreix la transició cap a la fallada cardíaca.

Entre les vies més intensament estudiades es troba la via de la calcineurina, implicada com a regulador crucial en la resposta hipertròfica a diferents estímuls [222]. La calcineurina és una fosfatasa serina/treonina regulada per calci/calmodulina, molt abundant en els cardiomiòcits, que defosforila una gran varietat de substrats, tals com els membres de la família de factors de transcripció NFAT (Nuclear Factor of activated T cells) causant la seva translocació al nucli on formen complexos amb cofactors com Gata4 o Mef2, involucrats en el desenvolupament cardíac embrional, per tal d'activar la transcripció de gens hipertròfics [223] (figura 18). Els ratolins transgènics amb la forma activa de la calcineurina desenvolupen hipertròfia cardíaca i fallada cardíaca en dos mesos, demostrant la implicació de la calcineurina en el tipus d'hipertròfia patològica [224].

El rol de les proteïnes G en la hipertròfia cardíaca també ha estat força estudiat, en concret el de tres proteïnes d'unió a GTP que transdueixen diferents estímuls de creixement, Gq, Gs i Gi. Gq és la diana de l'angiotensina II, endotelina-1 i l'estimulació α -adrenèrgica, que s'ha demostrat que determinen hipertròfia cardíaca [225-227]; així doncs, els ratolins transgènics que sobre-expressen Gq presenten una hipertròfia excèntrica, lligada a una disfunció contràctil, demostrant la implicació de Gq en la forma patològica de la hipertròfia [228]. La proteïna Gs està involucrada en la senyalització β -adrenèrgica; quan les catecolamines s'uneixen als receptors de membrana activen la proteïna Gs, que hi està acoblada, que augmenta la producció de cAMP, i la conseqüent activació de la kinasa dependent de cAMP (PKA), que fosforila nombroses proteïnes involucrades en la mobilitat del Ca^{2+} i el control de la contractilitat [229] (figura 18). L'ús d'antagonistes β -adrenèrgics, que aparentment restauren a una senyalització β -adrenèrgica correcta, protegeix els cors hipertròfics de degenerar cap a una cardiomiopatia severa [230].

Les vies MAPK representen un altre sistema involucrat en el creixement hipertròfic. Consisteixen bàsicament en tres famílies, JNKs (c-Jun N-terminal kinase), P38 i ERKs [210]. Es tracta de molècules interessants perquè s'activen per diversos estímuls mitogènics i, per tant, estan involucrades en diverses formes d'hipertròfia. Les

MAPKs ERK1/2 participen, com s'ha explicat, en la hipertròfia fisiològica. P38 està involucrat en la resposta a diferents estímuls que porten a una remodelació hipertròfica, i la sobre-expressió del seu activador, Tak1, causa una forma d'hipertròfia que condueix a una disfunció miocàrdica important i una mort prematura. Per la seva banda, JNK és essencial per a la hipertròfia cardíaca i la disfunció induïda per Gq. Per tant, l'activació sostinguda de p38 o JNK comporta cardiomiopatia i fallada cardíaca, mentre que estudis amb pèrdua de funció d'aquests gens demostren la seva funció com a reguladors negatius de la hipertròfia cardíaca [199](figura 18).

A més de les vies de senyalització iniciades per estímuls extracel·lulars, una causa força comuna de cardiomiopatia són les mutacions que afecten proteïnes contràctils i estructurals [13]. Mutacions que afecten la MHC (Myosin Heavy Chain), la proteïna d'unió a la miosina o altres components de l'aparell contràctil, s'ha demostrat que causen una cardiomiopatia hipertròfica en humans i models animals [231]. Un altre exemple és la titina, que dona suport estructural regulant la distensió dels sarcòmers, les mutacions en aquest gen en humans causen també cardiomiopatia hipertròfica [232].

5.2- La cardiomiopatia isquèmica.

La cardiomiopatia isquèmica, que és conseqüència d'un flux coronari insuficient, constitueix una de les principals causes de mort i incapacitat en els països industrialitzats i la seva prevalença augmenta contínuament en el conjunt de la població mundial. Immediatament després d'una oclusió coronària aguda, el flux sanguini s'interromp en els vasos coronaris més enllà de l'oclusió, excepte per petites quantitats de flux col·lateral dels vasos del voltant. La part del múscul que no rep flux o que no en rep suficient com per a mantenir la funció del miocardi es diu que pateix isquèmia, i s'anomena zona infartada. El procés en conjunt és l'infart de miocardi. A les poques hores d'absència total de flux sanguini les cèl·lules moren, i aquesta mort és la principal complicació que acaba causant la mort del pacient.

Un cop es produeix una oclusió coronària, la reinstauració del flux coronari o reperfusió és una condició indispensable per a que no es desencadeni la mort dels cardiomiòcits isquèmics. Com abans es produeixi la reperfusió, menor serà el dany i la

mort. Quan aquesta té lloc després de diverses hores ja no es modifica apreciablement la mida final de l'infart [233].

Pel que fa al tipus de mort cel·lular que té lloc en les situacions de fallada en el teixit cardíac, hi ha força controvèrsia sobre si es tracta d'una mort apoptòtica dependent de caspases o no. Estudis amb pacients en els últims estadis de cardiomiopatia mostren que en un moment donat, entre 80 i 250 cèl·lules cardíques de cada 10^5 sofreixen apoptosi [234, 235], mentre que els nivells normals d'apoptosi en un cor saludable humà es troben entre 1 i 10 cèl·lules de cada 10^5 . Aquests estudis demostren que l'apoptosi juga un paper important en aquest procés. Mitjançant la creació d'un ratolí transgènic amb una activació induïble de les caspases dels cardiomiòcits, Wencker et al. varen estudiar el paper de l'apoptosi en la fallada cardíaca. Una inducció aguda de l'apoptosi dependent de caspases causa la mort de tots els ratolins [236], d'altra banda, una dosi pràcticament nul·la de la droga inductora d'apoptosi causa en aquests ratolins una disminució de la supervivència resultat d'una cardiomiopatia causada per uns nivells baixos, però anormals (23 miòcits de 10^5), d'apoptosi en els miòcits. El mateix estudi mostra com mitjançant el tractament d'aquests ratolins amb un inhibidor químic de caspases es produeix una reducció de l'apoptosi en els cardiomiòcits acompanyada d'una absència de dilatació ventricular, menys fibrosi i millora de la funció sistòlica [236]. Així doncs, en el model d'aquest estudi, nivells baixos d'inducció d'apoptosi dependent de caspases són suficients per a induir una cardiomiopatia.

D'altra banda es troben els estudis que defensen que l'apoptosi i les caspases no estan implicades en la mort dels cardiomiòcits durant la fallada cardíaca. La necrosi és un tipus de mort cel·lular alternativa a l'apoptosi, caracteritzada sobretot per una disminució en la producció d'ATP, una disrupció de la membrana plasmàtica i dels orgànuls sense la formació de cossos apoptòtics, una pèrdua del potencial de membrana mitocondrial des del començament del procés i una marcada inflamació [237]. Basant-se en les seves característiques morfològiques s'havia considerat que la necrosi era un tipus de mort accidental, sense regulació, però diferents estudis donen suport al concepte de necrosi programada [237], tot apuntant la necrosi com el tipus de mort responsable de la fallada cardíaca, entre d'altres [238]. La formació de porus a la membrana mitocondrial interna és una de les principals vies d'activació de la

necrosi, ja que causa la distorsió del potencial de membrana i una pèrdua de la funció i estructura mitocondrials que acaben causant la mort necròtica de la cèl·lula [237]. La Cyclophilin D (CypD) és una proteïna que participa en aquest tipus d'activació necròtica mitocondrial facilitant la formació dels porus, ratolins deficientes en CypD són resistents a la mort per isquèmia/reperfusió in vivo, mentre que la sobre-expressió d'aquesta proteïna causa una disrupció mitocondrial i la mort cel·lular [239], a més, les cèl·lules deficientes en CypD moren de manera normal en resposta a diferents estímuls apoptòtics, però són resistents a la mort necròtica induïda per ROS i sobrecàrrega de Ca^{2+} , demostrant que la CypD no està implicada en la mort per apoptosi, i per tant, el fet que els ratolins CypD siguin resistents al dany cardíac induït per isquèmia/reperfusió indica que la mort que té lloc en el dany cardíac és independent de les caspases i l'apoptosi [240]. Un estudi amb un ratolí transgènic amb una sobre-expressió cardio-específica de la subunitat β_2 d'un canal de Ca^{2+} de tipus L, mostra com aquest ratolí té una sobrecàrrega de Ca^{2+} , necrosi miocàrdica i fallada cardíaca. El bloqueig d'aquests canals mitjançant la deleció de CypD, per contra, evita la cardiomiopatia, mentre que la sobre-expressió de Bcl-2 (inhibidor d'apoptosi) no té cap efecte; demostrant que és la necrosi, i no l'apoptosi, el principal causant d'aquesta patogènesi [238].

Com hem comentat, en un procés isquèmic és possible limitar la mida de l'infart mitjançant la reperfusió, tot i això, una part del dany que es desenvolupa es deu a la mateixa reperfusió, i es coneix com a dany per reperfusió o dany per reperfusió letal [241]. Així doncs, tot i ser totalment necessària per a evitar la mort cel·lular després de la isquèmia, la reperfusió per ella mateixa també suposa un dany i mort cel·lular. Durant els primers minuts de la reperfusió, el desenvolupament d'una hipercontractura en els cardiomiòcits sembla ser la primera causa de la mort de les cèl·lules, força estudis impliquen la necrosi com a responsable d'aquesta mort [242], tot i que el debat sobre si la mort és dependent o independent de caspases és viu.

Els nivells elevats i oscil·lants de Ca^{2+} tenen un paper important en la necrosi dels cardiomiòcits induïda per reperfusió tot induint una activació contràctil excessiva, que dóna lloc a la fragilitat del citoesquelet i sarcolemma que afavoreix la transició cap a la permeabilitat del mitocondri, que inicia el programa necròtic [241, 243]. Una de les principals causes de la sobrecàrrega de Ca^{2+} durant la reperfusió és l'entrada

addicional de Ca^{2+} a través de l'intercanviador de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX) operant en mode revers [244], que al seu torn, és una conseqüència d'un augment en la concentració de Na^+ citosòlic [245], que el debilitament de l'ATPasa Na^+/K^+ no pot ajudar a revertir [246]. Per la seva banda, les calpaïnes són unes proteases que requereixen Ca^{2+} per a la seva activitat i que presenten una activitat desregulada durant les condicions patofisiològiques que comporten una pèrdua de l'homeostasi del Ca^{2+} [247]. Les calpaïnes es mantenen inactives abans de la reperfusió gràcies al pH àcid i la força iònica que suposa el miocardi isquèmic [248], durant la reperfusió miocàrdica, però, s'activen i actuen degradant proteïnes estructurals [243]. Durant els primers minuts de la reperfusió després d'una isquèmica prolongada, l'activitat de l'ATPasa Na^+/K^+ es veu afectada, aquesta disminució es deu a una reducció en els nivells de proteïna associada a la membrana del citoesquelet d'aquest intercanviador, procés mediat per les calpaïnes [249], que degraden la fixació de l'intercanviador Na^+/K^+ a la membrana del citoesquelet. Un estudi demostra que la inhibició de les calpaïnes evita el debilitament de l'ancoratge de l'intercanviador Na^+/K^+ , evitant el bombeig de Na^+ cap al citosol i l'alteració de la funció de NCX; i per tant, demostra que l'activació de les calpaïnes induïda per un augment del Ca^{2+} citosòlic durant els primers minuts de la reperfusió afecta la funció de l'ATPasa Na^+/K^+ , que resulta en un nou augment de Ca^{2+} a través del mode revers de NCX, donant lloc a un cicle viciós que pot causar a la mort del cardiomiòcit [249].

Estudis previs del nostre grup van també en contra del dogma de la implicació de les caspases en la mort dels cardiomiòcits adults deguda a processos isquèmics. Aquests estudis mostren *in vitro* que el silenciament de les caspases que es produeix amb el desenvolupament no és reversible, i que durant la inducció d'isquèmia no es produeix cap reactivació de les caspases i, per tant, la mort de les cèl·lules és caspasa-independent [103]. A més, aquest estudi demostra que la maquinària apoptòtica independent de caspases (EndoG, AIF) substitueix la dependent de caspases en els cardiomiòcits adults, i és la responsable de la mort per isquèmia [103]. Aquests estudis, però, s'han portat a terme només *in vitro* i caldria validar-ho *in vivo*.

6- Cicle Cel·lular.

6.1- Introducció al cicle cel·lular, ciclins, CDKs i CKIs.

Cada dia es descobreixen noves espècies que se sumen als ja 8,7 milions d'espècies eucariotes existents. Per a créixer i reproduir-se totes aquestes espècies confien en la progressió de les seves cèl·lules a través del cicle cel·lular, requerint la duplicació del DNA genòmic i la subseqüent distribució a les noves cèl·lules filles [250].

El cicle cel·lular eucariòtic típic es divideix en quatre fases. En la primera fase, G1, les cèl·lules creixen i poden entrar en la següent fase, la fase de síntesi, S, on té lloc la replicació del DNA nuclear. Després passen a la fase G2, on les cèl·lules creixen i es preparen per entrar a l'última fase, la mitosi, M, on les cromàtides se separen i es distribueixen entre les noves cèl·lules filles formades (figura 19). La mitosi es divideix també en quatre fases; profase, on es formen els cromosomes, metafase, on els cromosomes se situen al centre de la cèl·lula, anafase, on se separen els cromosomes i telofase, on té lloc la formació de dos nuclis dins la cèl·lula. La citoquinesi, que no és estrictament una fase del cicle cel·lular, segueix la mitosi i completa el programa de divisió cel·lular amb la formació de dues cèl·lules filles separades per una membrana plasmàtica i, segons l'espècie, una paret cel·lular [251]. La progressió a través del cicle cel·lular està controlada per diferents punts de control, essent els principals els punts de control d'entrada a la fase S (punt de control G1-S) i a la mitosi (punt de control G2-M) i el punt de control del fus, que controla la progressió a l'anafase (figura 19).

Existeix una àmplia diversitat de programes de cicle cel·lular entre espècies que estan associades típicament a uns estadis de desenvolupament o unes condicions fisiològiques concretes [252]. Per exemple, els cicles de les cèl·lules embrioniques són sovint ràpids i poden saltar-se una o ambdós fases G [253]; una altra variant és la que es dona quan té lloc la replicació del DNA genòmic sense mitosi ni citoquinesi, produint cèl·lules poliploides o multinucleades [254] (figura 19).

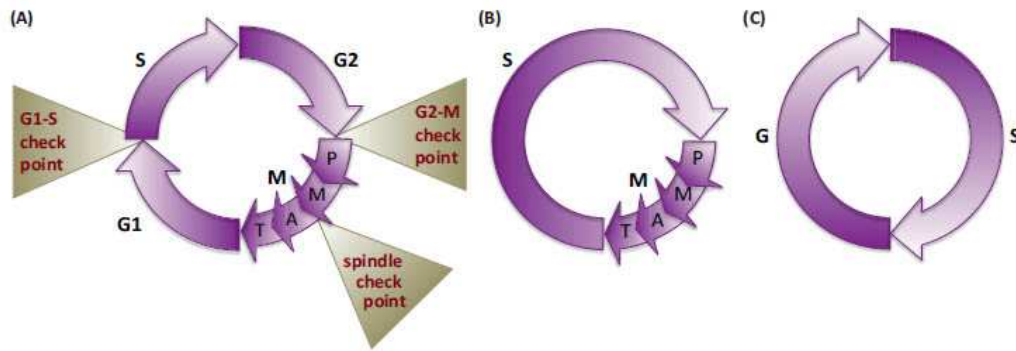


Figura 19: Cicle cel·lular i variants. **A)** Típic cicle cel·lular eucariota amb els seus punts de control. **B)** Cicle cel·lular embrional, més ràpid i amb el possible salt d'algunes fases. **C)** Cicle cel·lular en teixits madurs i diferenciats, les cèl·lules entren en un cicle on la fase S no està seguida d'una fase M, sinó d'una altra fase S i el resultat són cèl·lules poliploides. P:profase, M:metafase, A:anafase, T:telofase [251].

La progressió del cicle cel·lular està controlada per l'activitat d'un grup específic de kinases serina/treonina, les CDKs (cyclin-dependent kinase), que s'activen per la unió de les ciclines (Cyc), formant un complex CDK-ciclina. En llevats una única CDK controla tot el cicle cel·lular i és essencial per a la proliferació [255], en mamífers, en canvi, existeixen diferents CDKs amb diferents funcions en el cicle cel·lular. De manera general, Cdk4 i Cdk6 amb unió a CycD promouen la transició de la fase G₀, una fase de repòs on les cèl·lules es troben en estat quiescent, cap al començament del cicle. Cdk2 controla l'entrada i progressió a través de la fase S formant complex amb CycE o CycA. Finalment, Cdk1 amb CycA o CycB controla l'entrada i progressió a través de la fase M [256, 257].

La regulació de l'activació de les CDKs és més complexa en els punts de restricció o control entre les diferents fases del cicle. L'acumulació de ciclines o inhibidors de CDK està fortament controlada per xarxes de transcripció i control post-traducciona mitjançant la localització i degradació de proteïnes. A més, l'abundància dels reguladors està també subjecta a processos de control intensius [258].

La cascada reguladora d'entrada a la fase S amb elements com la maquinària de replicació del DNA (per exemple PCNA: proliferating cell nuclear antigen) i el complex del manteniment dels minicromosomes està controlada a nivell transcripcional per dos reguladors contraris: E2F (E2 transcription factor) i Rb (retinoblastoma protein), regulats positiva i negativament, respectivament. Així doncs, la fosforilació i inactivació

de proteïnes Rb per part de Cdk4/6-CycD inicia la transcripció, reprimida per Rb, de gens diana de E2F, entre els quals hi ha CycA i CycE, tot completant la fosforilació de proteïnes Rb, que suposa l'activació d'altres gens diana de E2F i que culmina amb l'inici de la fase S [259, 260] (figura 20A).

Pel que fa a la transició del segon punt de control, l'entrada a la fase M, s'han identificat dos mecanismes reguladors: el control de APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome), l'entrada a la mitosi requereix la degradació de CycA i CycB per part de APC/C [261], i la fosforilació/defosforilació de CDKs. La fosforilació de les CDK està catalitzada per Wee1 i Myt1 [262]. Quan una CDK està fosforilada està inhibida, i el pas principal en la progressió cap a la mitosi és la defosforilació de Cdk1 que porten a terme les fosfatases Cdc25 [263] (figura 20B). Contràriament, el cicle cel·lular queda bloquejat després del dany al DNA, aquest bloqueig té lloc mitjançant la fosforilació i inhibició de Cdc25 per part de Chk1 i Chk2 (checkpoint kinase 1-2)[264].

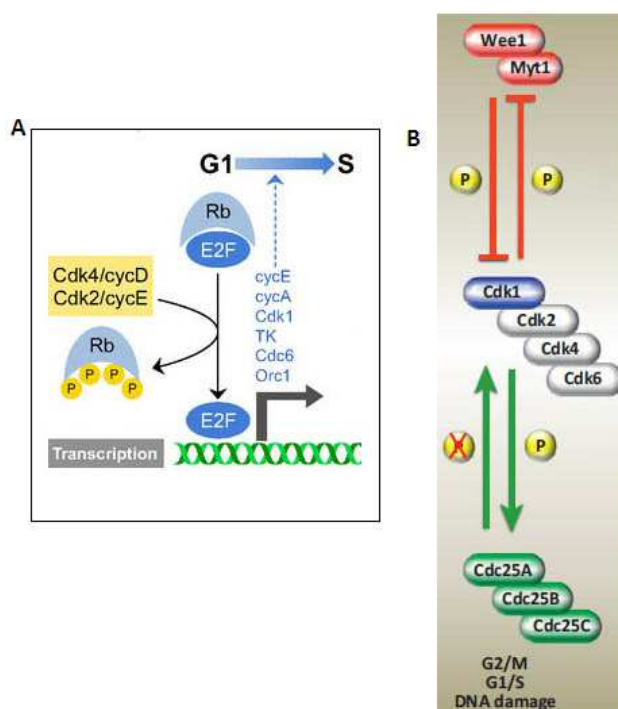


Figura 20: Control dels punts de transició de les fases del cicle. A) Complexes CDK/Cyc que regulen la transcripció Rb/E2F necessària per a la progressió a la fase S [265]. **B)** Fosfo-control de les CDK necessari per a la progressió cap a la mitosi per part de les kinases Wee1 i les fosfatases Cdc25, en verd:activació, en vermell: inhibició, groc:fosforilació [251].

L'activitat i especificitat de substrat de les CDK està controlada tant per les CDK com per les ciclins amb les quals formen complexos [266, 267]. Diversos estudis basats en

aproximacions proteòmiques han permès conèixer els substrats potencials de la majoria de CDKs, que inclouen proteïnes involucrades en processos tals com la traducció, remodelació de la cromatina, secreció proteica, transport nuclear i altres processos no suposats prèviament d'estar sota el control del cicle cel·lular [268].

L'activitat de les CDK, doncs, està regulada per la unió a les ciclines; a la vegada, però, està frenada pels CKIs, inhibidors de CDK. Els CKIs es classifiquen en dues famílies segons la seva estructura i la CDK diana sobre on actuen. La primera família inclou les proteïnes INK4 (inhibidors de CDK4), anomenades així per la seva habilitat d'inhibir específicament les subunitats catalítiques de CDK4 i CDK6, aquestes proteïnes estan compostes de múltiples repeticions que només s'uneixen a aquestes dues CDK. Els CKI que formen aquest grup són p16^{INK4a} [269], p15^{INK4b} [270], p18^{INK4c} [271] i p19^{INK4d} [272]. L'altra família d'inhibidors es coneix com Cip/Kip i el formen proteïnes amb una capacitat inhibidora molt més àmplia, són capaces d'inhibir l'activitat de les kinases dependents de CycA, de CycE, de CycD i de CycB. Aquesta família inclou p21^{Cip1} [273], p27^{Kip1} [274] i p57^{Kip2} [275], totes elles contenen uns motius d'unió en l'extrem amino-terminal que els permet unir-se tant a ciclines com a CDKs [260].

Així doncs, per a ser actives les CDK s'han d'unir a ciclines, que funcionen com una mena de subunitat reguladora de les CDK; els CKI, per la seva banda, inhibeixen els complexos CDK/Cyc. Tot i això, estudis recents demostren que les subunitats individuals sense necessitat de cooperació ni formació de complexos tenen també altres funcions, implicades en una gran varietat de funcions independents del cicle cel·lular, com són la transcripció, reparació del dany al DNA, regulació de la degradació proteolítica, regulació epigenètica, metabolisme, funció neuronal i renovació de les cèl·lules mare [265].

6.2- Regulació del cicle cel·lular en els cardiomiòcits.

L'activitat del cicle cel·lular és un component important en la diferenciació i morfogènesi cardíaca. Sobre l'estadi embrional E8 del ratolí els nivells de síntesi de DNA són exageradament elevats; en canvi, l'inici de la diferenciació cardiomiogènica va acompanyada d'una reducció en la síntesi del DNA, així doncs, durant els últims estadis de l'embriogènesi el nivell de proliferació dels cardiomiòcits disminueix gradualment [276, 277]. Poc després del naixement té lloc una transició del creixement miocàrdic

hiperplàstic a hipertròfic (punt 1.3); a nivell morfològic aquesta transició està caracteritzada per un augment en la densitat de les miofibril·les, l'aparició de discs intercalats madurs i la formació de cardiomiòcits binucleats (figura 21) [278]. La binucleació resulta d'una duplicació genòmica sense citoquinesi. Es podria considerar, doncs, que hi ha dues fases de síntesi de DNA en els cardiomiòcits, la primera té lloc durant la vida fetal i està associada exclusivament amb la proliferació dels cardiomiòcits, i la segona té lloc en la vida postnatal i està associada amb la binucleació [277].

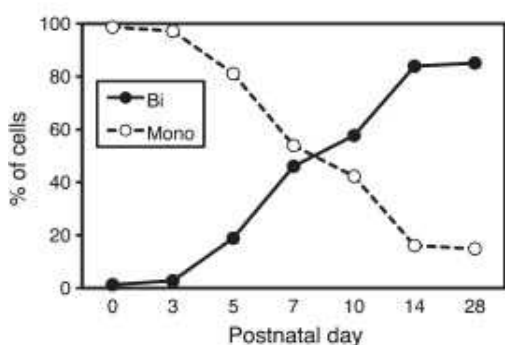


Figura 21: percentatge de cèl·lules mono i binucleades en els cardiomiòcits totals. Es mostra com la majoria dels cardiomiòcits adults són binucleats, i que aquest procés comença cap al quart dia postnatal [279].

Mirant els nivells d'expressió de les proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular hi ha canvis importants entre els estadis embrionals i postnals. En general, els reguladors positius del cicle cel·lular (ciclins, CDKs i protooncogens) es troben fortament expressats en els cors embrionals mentre el cicle cel·lular està actiu, en canvi, l'expressió de la majoria d'aquests reguladors positius cau en el període postnatal (figura 22) [278-280]. Per contra, els nivells d'expressió dels reguladors negatius del cicle cel·lular (com p21 i p27) es troben freqüentment augmentats durant els últims estadis de gestació i el període postnatal [278, 280].

Pel que fa als nivells d'activitat de les CDK s'observa també que aquesta disminueix després del naixement. Cal destacar que durant l'inici de la binucleació mentre que CDK4 i CDK2 ja gairebé no hi són presents l'activitat de CDK1 encara està al 50% del seu màxim, i això podria ser suficient per a iniciar la divisió nuclear però no suficient per a la divisió citoplasmàtica (figura 23). Per tant, la forma activa de CDK1 en els cardiomiòcits neonatals pot estar involucrada en l'inici de la binucleació. També cal destacar, que l'activitat de la DNA polimerasa α disminueix importantment durant la primera setmana postnatal en rata [281].

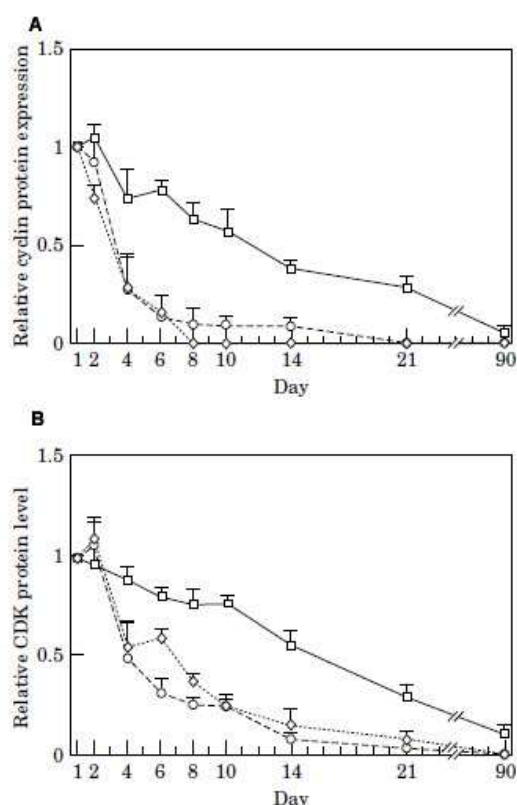


Figura 22: Anàlisis densitomètrics de les CDK i Cyc en els cardiomiòcits durant el període postnatal. A) Abundància proteica de les ciclins. o:ciclina B; ◇:ciclina A; n:ciclina D. **B)** Abundància proteica de les CDK. o:CDK1; ◇:CDK2; n:CDK4 [280].

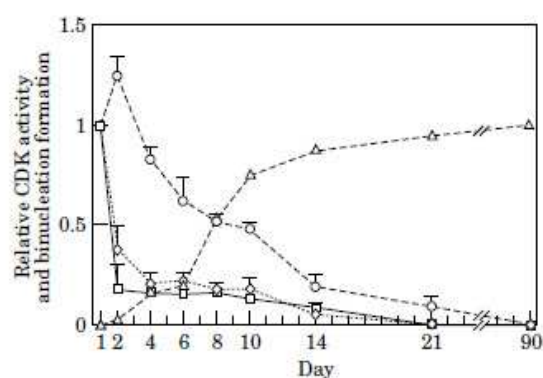


Figura 23: Activitat de les CDK durant la binucleació. Es mostra com durant l'inici de la binucleació CDK1 és l'única CDK encara activa i la que pot estar involucrada en l'inici del procés o:CDK1; ◇:CDK2; n:CDK4; Δ:formació de la binucleació [280].

6.2.1- Reguladors de la proliferació cardíaca.

Està generalment acceptat que els cardiomiòcits retenen una certa capacitat de sintetitzar DNA, no obstant, hi ha un fort debat sobre la freqüència amb que això es produeix i si aquesta síntesi de DNA dóna lloc necessàriament a divisió cel·lular [278]. S'han fet diferents estudis consistents en intervencions genètiques que són capaces de promoure, en els cardiomiòcits, la síntesi de DNA i, en alguns casos, la citoquinesi. La sobre-expressió d'alguns activadors del cicle cel·lular com la Ciclina A2 o la Ciclina D2 s'ha mostrat que promouen desdiferenciació i proliferació en cardiomiòcits post-

mitòtics [1]. Alguns exemples més en són el ratolí transgènic per CDK2, que té un augment en la síntesi de DNA però una disminució de la multinucleació en els cardiomiòcits adults [282]; i els cardiomiòcits ventriculars de rata als quals se'ls ha sobre-expressat FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) o bé FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) que presenten un augment en el nombre de cèl·lules [283, 284].

La diferenciació i proliferació són típicament processos cel·lulars oposats, en el sentit que les molècules que promouen la diferenciació normalment impedeixen la re-entrada al cicle cel·lular. Un exemple n'és p38, la seva sobre-expressió inhibeix la proliferació en cardiomiòcits neonatals, mentre que la inhibició de la seva activitat o la seva deleció genètica augmenta el nombre de cardiomiòcits en mitosi [285]. A més, la inhibició de p38 pot iniciar la proliferació en cardiomiòcits adults diferenciats tot induïnt desdiferenciació [286]. D'altra banda, la combinació de la inhibició de p38 amb l'addició de FGF1 bloqueja l'apoptosi, augmenta la proliferació dels cardiomiòcits i millora la funció cardíaca en rates adultes després d'un infart [286, 287]. La neuregulina 1 (NRG1) és un altre gen que quan sobre-expressat indueix la proliferació en cardiomiòcits, però només d'aquells que són diferenciats i mononucleats, quan això passa, la citoquinesi té lloc gràcies a que es desassemblen els sarcòmers; la NRG1, a més, redueix la formació de teixit cicatritzat i millora la funció cardíaca quan s'aplica a ratolins adults després d'un infart [288]. Finalment, els microRNA (miRNA), que ajuden a regular el desenvolupament cardíac i el creixement, també estan involucrats en la re-entrada en el cicle cardíac i la millora de la funció cardíaca després de la pèrdua de cardiomiòcits que segueix el dany cardíac [1].

Un estudi important és el de Porrello et al., que estudia el potencial regeneratiu del cor de ratolí neonat [289]. Els amfibis i peixos retenen una remarcable capacitat de regeneració cardíaca; el peix zebra adult, per exemple, és capaç de regenerar, sense formació de cicatriu, més del 20% del ventricle a partir de la proliferació dels cardiomiòcits [290]. El cor del peix zebra adult és anatòmicament similar al cor mamífer embrional abans de la septació, format de cardiomiòcits petits, mononucleats i amb capacitat proliferativa [291]. Donada aquesta similitud, Porrello et al. varen estudiar si el mecanisme de regeneració cardíaca en el peix podria haver-se conservat en el cor mamífer neonatal mitjançant la resecció d'un tros de l'apex del ventricle esquerre. Amb 21 dies, un cor de ratolí P1 és capaç de regenerar completament l'apex

i restaurar correctament el miocardi, mantenint una funció sistòlica normal en l'àpex format. Donat que la proliferació dels cardiomiòcits està caracteritzada per un desensamblament del sarcòmer [292], durant la mitosi es produeix una marginalització de les estructures sarcomèriques cap a la perifèria, varen comprovar que això es produïa en els cardiomiòcits dels cors operats, demostrant que el potencial regeneratiu del teixit cardíac en el cor neonatal de ratolí implica una desdiferenciació i una proliferació dels cardiomiòcits. Per tal de determinar si aquest potencial de regeneració es perd quan els cardiomiòcits surten del cicle cel·lular, varen realitzar el mateix tipus d'experiment en ratolins P7, que són incapaços de regenerar el miocardi després de la resecció d'un tros d'àpex, no hi ha senyals de proliferació ni desensamblament dels sarcòmers i desenvolupen un nivell important de fibrosi [289]. Aquests resultats indiquen que la capacitat regenerativa del cor neonatal es perd durant la primera setmana de vida postnatal.

6.3- El metabolisme en la regulació del cicle cel·lular.

La creació de dues cèl·lules a partir d'una requereix una enorme generació de noves proteïnes, lípids i àcids nucleics; la decisió d'una cèl·lula d'entrar al cicle cel·lular representa, doncs, una gran obligació energètica [293]. Els primers estudis en llevat demostren que hi ha una sincronització entre la progressió del cicle cel·lular i la del cicle metabòlic, per tant, sembla haver-hi una relació entre l'expressió dels enzims metabòlics i la progressió de cada fase del cicle cel·lular [294]. Alguns estudis amb ratolins han ajudat a fer-ho evident, un exemple són els ratolins deficients en p21 i p27, que desenvolupen un alt grau d'obesitat [295]; i també els ratolins deficients en E2F, que presenten un metabolisme alterat, i indica que la xarxa transcripcional CDK4-Rb-E2F pot reprimir el metabolisme mitocondrial oxidatiu [296, 297].

En general les cèl·lules tumorals tenen una sèrie de canvis metabòlics que les fan passar d'un metabolisme catabòlic (captació substrats) a un d'anabòlic (consum d'energia) [298]. Les cèl·lules normals en proliferació, però no les post-mitòtiques (que consisteixen la majoria de teixits adults sans), són metabòlicament semblants a les tumorals [299].

La relació entre metabolisme i proliferació suggereix que hi ha d'haver una mena de sensor energètic, demostrat pel simple fet que quan a la majoria de cèl·lules

en cultiu se'ls treuen els nutrients extracel·lulars (per exemple el sèrum) experimenten una sortida del cicle cel·lular [293]. El principal sensor és AMPK (AMP-activated protein kinase). La via Lkb1/AMPK s'activa per l'estrès energètic i suprimeix les vies anabòliques i activa les catabòliques, tot inhibint la proliferació [300]. A més, l'activació de AMPK dóna lloc a la fosforilació i conseqüent activació del gen supressor tumoral p53, que indueix una aturada del cicle mediada per p21 [301]. Una altra diana important de AMPK, a la qual inhibeix, és la via mTOR, una via induïda per factors de creixement extracel·lulars, com la insulina o els nivells d'aminoàcids, que promou les vies anabòliques i la proliferació cel·lular en múltiples contextos [298] (figura 24). Els nivells d'aminoàcids es detecten a la superfície del lisosoma on mTOR està enganxat mitjançant les GTPases Rag [302], que s'enganxen al lisosoma per un complex anomenat Ragulator que actua com a factor d'intercanvi de nucleòtids de guanina (GEF), quan activada, mTOR té centenars de dianes que promouen la progressió del cicle cel·lular (figura 24).

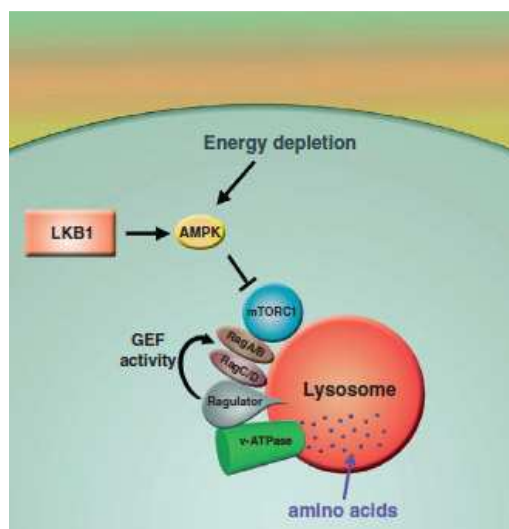


Figura 24: Activació-Inhibició de mTOR. Els nivells d'aminoàcids es mesuren al lisosoma, al qual Tor està unit. L'activitat de mTor està regulada negativament per AMPK que s'activa per sensors com LKB1 o per la manca d'energia, tot desencadenant l'aturada del cicle [293].

Mentre que la manca de sèrum de les cèl·lules en cultiu està clar que inhibeix la síntesi de DNA, no és tan conegut que la reducció extracel·lular de glucosa, aminoàcids o ions fosfat pot ser la causa d'un arrest en la fase G0/G1 del cicle [303]. Un mediador d'aquest punt de control metabòlic és l'activació de l'arrest, ja explicat, mitjançat per p53 quan és activat per AMPK, altres estudis suggereixen que aquesta via es pot activar per altres inductors d'estrès energètics, tals com la disrupció del transport electrònic mitocondrial [304]. En *Drosophila*, aquesta disfunció mitocondrial activa dues vies que poden causar l'arrest del cicle cel·lular tot inhibint l'entrada a la fase S, una és la degradació de Ciclina E mitjançant AMPK-p53 i degut a una insuficient producció de ATP [304] i l'altra és la inducció de p27 per part de ROS [305]. En llevat sembla que l'aturada de cicle a més de produir-se per estrès mitocondrial (producció de ROS) o per manca de nutrients (activació de AMPK), també es pot produir per una reducció en la quantitat de DNA mitocondrial [306].

Un altre estudi en llevat va més enllà [307]. L'adició de fonts de carboni en llevat indueix les cèl·lules a deixar la fase quiescent i començar la fase de creixement, caracteritzada per un augment en l'expressió dels gens de cicle i en la respiració [308]. Entre els metabòlits que més augmenten durant la fase de creixement destaca Acetil-coA [309], principal intermediari en l'oxidació de la glucosa per a produir ATP i també un precursor per a la biosíntesi de nombrosos metabòlits necessaris per a produir una nova cèl·lula, tals com lípids i esterols [307]. Així doncs, les fonts de carboni que poden convertir-se en Acetil-CoA poden induir l'entrada al cicle cel·lular. A més, aquest estudi mostra que el pic de concentració d'Acetil-CoA durant la fase de creixement coincideix amb el començament de l'acetilació d'algunes histones (com H3 o H4), presents en algunes proteïnes involucrades amb el creixement, tot indicant que els llevats mitjançant la regulació de l'acetilació d'algunes proteïnes importants per al creixement en sincronització amb els nivells d'Acetil-CoA poden coordinar la decisió d'entrar en cicle [307]. Això ho demostra el fet que els llevats amb defectes en l'acetilació creixen més lentament i tenen cicles anormals [307]. Una revisió recent diferencia entre les tres formes que pot prendre l'Acetil-CoA: mitocondrial, citosòlica i nuclear. L'Acetil-CoA nuclear és el que estaria involucrat en l'acetilació que regula el cicle cel·lular [310].

En referència a la implicació del mitocondri en el control del cicle cel·lular hi ha una creixent apreciació del rol i la influència de la dinàmica mitocondrial en la

progressió del cicle cel·lular. Els mitocondris poden existir en un estat fragmentat (fissió), en un estat tubulat (fusió), o com és més comú en les cèl·lules en cultiu en creixement, en una barreja de les dues morfologies [311]. Estudis amb cèl·lules de mamífers suggereixen que a mesura que les cèl·lules progressen a través de G1 el potencial de membrana mitocondrial i la respiració augmenten [312], a més, durant la transició G1/S els mitocondris sembla que sofreixen una marcada alteració en la morfologia, formant una xarxa molt fusionada i hiperpolaritzada [313], aquests canvis mitocondrials augmenten la capacitat bioenergètica i regulen l'acumulació de Ciclina E. Per contra, durant la transició G2/M els mitocondris acostumen a trobar-se en la seva forma fragmentada (figura 25).

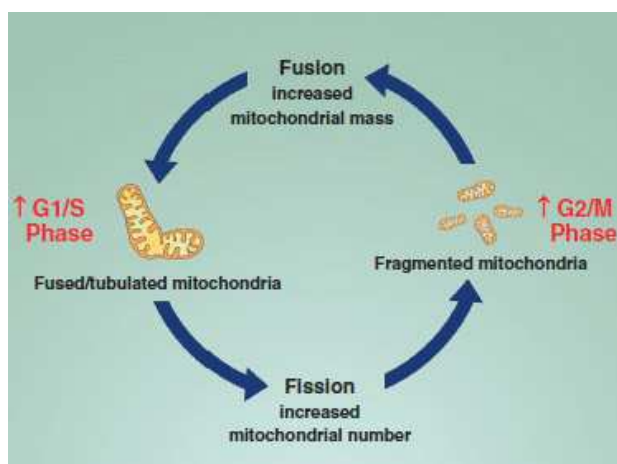


Figura 25: Dinàmica mitocondrial i cicle cel·lular. Els mitocondris sofreixen alteracions en la seva morfologia, la fusió resulta en la formació de mitocondris tubulats allargats i la fissió en mitocondris fragmentats. Aquesta morfologia està coordinada amb el cicle cel·lular, amb mitocondris fusionats durant G1/S i mitocondris fragmentats durant G2/M [293].

En resum, els estudis que demostren una relació entre el metabolisme i el control de la progressió del cicle cel·lular, sobretot en llevat, són cada vegada més nombrosos, indicant que l'estrès mitocondrial o bé una alteració en l'obtenció de nutrients i consegüentment en l'obtenció d'energia i metabòlits importants com l'Acetil-CoA, poden comportar alteracions i l'aturada del cicle cel·lular.

Hipòtesi i Objectius

Les caspases són silenciades durant el desenvolupament cardíac, de manera que la seva màxima expressió es produeix durant el període embrional i és pràcticament nul·la en l'edat adulta. A més, diversos estudis demostren com alguns membres de les vies de senyalització apoptòtica porten a terme funcions no-apoptòtiques importants, per exemple en el desenvolupament o la diferenciació dels teixits. En concret, els ratolins deficients en les caspases 3 i 7 tenen un desenvolupament cardíac anormal.

Dit això, la nostra hipòtesi és que el fet que en el cor les caspases s'expressin sobretot en estadis embrionals indica que les caspases participen en el correcte desenvolupament cardíac portant a terme una funció independent de l'apoptosi.

L'objectiu d'aquest treball és:

- Anàlisi de la funció no-apoptòtica de les caspases 3 i 7 en el desenvolupament cardíac.

Al tractar-se d'un treball molt dinàmic i donada la incertesa de les vies afectades i dels resultats que obtindríem, a partir de l'objectiu principal hem definit els objectius secundaris:

- 1- Anàlisi de la funció de les caspases en els canvis d'expressió gènica:
 - Regulació de l'expressió de PTB.
- 2- Anàlisi de la funció de les caspases executores en la regulació de diverses funcions biològiques.
- 3- Comprovació de la implicació de les caspases en la mort cel·lular causada per processos d'Isquèmia/Reperfusió.

Materials i mètodes

1-Animals d'experimentació.

1.1-Consideracions prèvies.

Els mètodes experimentals utilitzats en els animals de laboratori que es detallen a continuació s'han regit seguint les recomanacions recollides en les següents disposicions legals:

- Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

A més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

1.2-Animals.

Els estudis han estat realitzats amb ratolins de la soca C57*BLACK6. El menjar i l'aigua estaven disponibles *ad libitum*. La temperatura de l'estabulari era de 21°C amb un cicle de llum/fosc de 12:12.

1.2.1- Animals Transgènics Nkx2.5Cre.

Els ratolins Nkx2.5Cre són una soca d'animals transgènics creada i cedida pel grup d'Eric Olson, a Dallas [314]. Aquests animals porten l'expressió de Cre sota l'activació del promotor de Nkx2.5, aquest gen s'expressa únicament en el teixit cardíac, els cardiomiòcits; per tant, l'expressió de Cre és específica en aquestes cèl·lules.

Per a confirmar la presència del transgèn, hem utilitzat una reacció de PCR que confirma la presència del Cre amb una banda de 250bp. Aquest genotipatge detecta només la presència/absència de Cre i, per tant, no permet diferenciar entre animals homozigots i heterozigots. El programa consisteix en 2min a 95°C, seguit de 30 cicles:

1min a 95°C, 1min a 55°C i 1min a 72°C; acabant amb un cicle final de 10min a 72°C. La seqüència dels primers es detalla a la taula 1.

Primer	Seqüència 5'-3'
CRE Fwd	AGG TTC GTT CAC TCA TGG A
CRE Rev	TCG ACC AGT TTA GTT ACC C
CASPASA3 H	GAG CCT TCA TAG GGG TGC AA
CASPASA 3 J	GGG GAG CAG AGG GAA TAA AG
CASPASA 3 K	CAT AGA ATC CCA AGC CAG GA
CASPASA7 WT Fwd	GAC TGC TTC CAC AGC CTC TAA CTG
CASPASA7 WT Rev	GTC TGG TAA AGT GCG GAG AAC G
CASPASA7 Neo Fwd	ATC CTT TAT GGG TGT CAC GCC
CASPASA7 Neo Rev	TGC TAA AGC GCA TGC TCC AGA CTG

Taula 1: Seqüències dels primers per al genotipatge de les soques Nkx2.5Cre i Caspasa7 *Knock-out* Caspasa3 *Floxed*.

1.2.2- Animals *Knock-out* per Caspasa7 i *Floxed* Caspasa3.

Els ratolins *Knock-out* per Caspasa7 i *Floxed* Caspasa3, on s'ha flanquejat l'exó II de Caspasa3 amb motius Cre (dades no publicades), han estat generats i cedits pel laboratori de Richard Flavell. Els ratolins *knock-out* per Caspasa3 i Caspasa7 són letals en estadis neonats [194], en canvi aquests són perfectament viables i això permet estudiar la deleció específica de Caspasa3 en un únic teixit, dependent del promotor sota el qual estigui dirigida l'expressió de Cre, tot obtenint ratolins *Doble Knock-out* de les Caspasa3 i 7 específics de teixit. Per a determinar el genotip d'aquests animals hem utilitzat una reacció de PCR per a cada gen, totes dues amb el mateix programa: 3min inicials a 94°C seguits de 32 cicles de 20sec a 94°C, 30sec a 60°C i 35sec a 72°C; acabant amb 2min a 72°C. Els primers es detallen a la taula 1. Els patrons de bandes són les seqüents:

- Caspasa3: al·lel WT=180bp, al·lel floxejat= 230bp i al·lel KO= 320bp.
- Caspasa7: al·lel WT= 240bp i al·lel KO= 310bp.

1.2.3- Animals *Doble Knock-out* per Caspasa3 i Caspasa7 en els cardiomiòcits.

Aquests animals els hem generat en el nostre laboratori creuant els ratolins Caspasa7 *Knock-out* - *Floxed* Caspasa3 amb els ratolins Nkx2.5Cre, utilitzant el sistema de recombinació Cre-Lox. El procediment seguit per a l'obtenció d'aquesta soca s'explica en detall al punt 2 de l'apartat de resultats.

En el camp de la genètica, la recombinació Cre-Lox s'utilitza per a generar deleccions, insercions, translocacions i inversions en llocs específics del DNA de les cèl·lules. Permet que una modificació del DNA tingui lloc en un tipus cel·lular específic o que es porti a terme després d'un estímul extern determinat. El sistema consisteix en un únic enzim, la Cre recombinasa, que recombina un parell de seqüències curtes diana anomenades Lox. Tant l'enzim Cre com el lloc Lox original, conegut com a LoxP, deriven del bacteriòfag P1. Posant les seqüències Lox apropiadament, els gens es poden activar, suprimir o canviar per altres gens. La figura 26 mostra un esquema d'aquest sistema de recombinació.

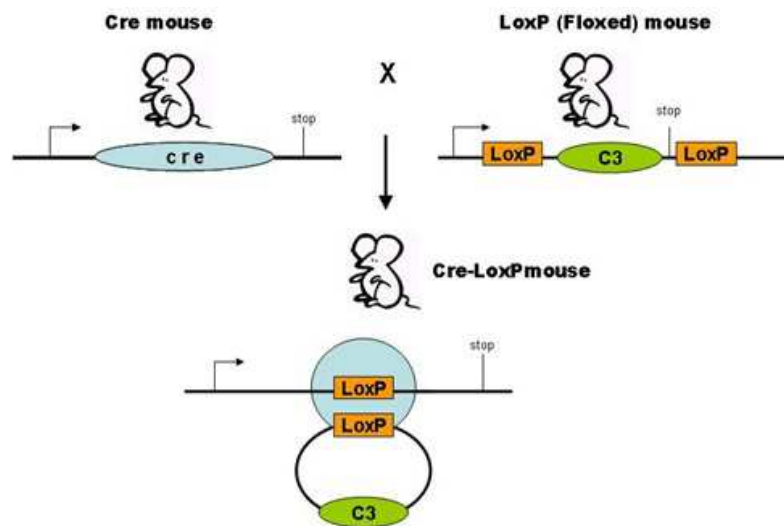


Figura 26: esquema del mecanisme de funcionament del sistema Lox-Cre. Mostra com creuant ratolins amb el Cre i ratolins amb un gen floxejat, es pot deleccionar aquest últim.

Per a determinar el genotip d'aquests animals hem utilitzat les reaccions de PCR explicades ens els punts anteriors.

Els animals *Doble Knock-out* en els cardiomiòcits són animals *Caspasa7 Knock-out*, *Caspasa3 Floxed* i són *Cre+*, per tant, tenen la *Caspasa3* en els cardiomiòcits suprimida. Els animals utilitzats com a *Wild type*, són animals que mantenen i expressen tant *Caspasa3* com *Caspasa7*.

2-Tècniques de Biologia Cel·lular.

2.1- Cultius cel·lulars.

Les cèl·lules es cultiven en un incubador humit a 37°C amb un 5% de CO₂. Els medis de cultiu i suplementes són de GIBCO Invitrogen: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) amb L-glutamina; Fetal Bovine Serum, FBS (#10270-106) inactivat 30min a 56°C; Horse Serum, HS (#26050-088); L-glutamina 200mM (#25030-024); Non-essential Aminoacids, NEAA (#11140-035); Piruvat sòdic 100mM (#11360-039); Penicil·lina/Streptomocina, P/S (#15140-122); Tripsina (#25200-056).

2.1.1- Cultiu de cardiomiòcits neonatals de rata.

Els cardiomiòcits neonatals de rata s'obtenen a partir de cries de rata Sprague Dawley d'entre 2 i 4 dies. S'extreuen els cors de la manera més asèptica possible i es col·loquen en una placa amb ADS 1X en gel. Es treuen les aurícules i els vasos sanguinis més visibles sota la lupa i es passen els cors a una nova placa amb ADS. S'obren els ventricles, es trosseguen per a facilitar la digestió i s'agrupen de 4 en 4 en eppendorfs amb 900µL d'ADS + 12µL de col·lagenasa tipus 2 (10U/µL Worthington). Es faran tres cicles de digestió de 15min cadascun a 37°C i a 1100rpm. Després de cada cicle es recupera el sobrenedant i s'hi afegeix el doble de medi complet ($\frac{3}{4}$ medi DMEM 1g/l glucosa + $\frac{1}{4}$ medi EARLES M199 + 10% HS+ 5% FBSi + 1% L-Glutamina + 1% P/S) per a aturar la digestió. Aquestes suspensions cel·lulars es centrifuguen 4min a 800rpm i el pellet es resuspèn en medi complet. Després de les tres digestions, la suspensió de cèl·lules final es sembra en una p100 (cèl·lules provinents de 10 cors/placa), i es posa 45min a l'incubador. Passats els 45min es recupera el medi i es sembra i s'incuba de forma idèntica a l'anterior. Durant aquestes etapes s'enriqueix la suspensió amb cardiomiòcits, ja que són el tipus cel·lular amb menys afinitat pel plàstic sense tractar, mentre que a la placa que descartem hi queden enganxats els fibroblasts cardíacs, que es poden cultivar com s'explica al següent punt, 2.1.2. Durant aquests temps d'incubació es preparen les plaques per a sembrar els cardiomiòcits amb 0,2% gelatina (Tipus A, de pell porcina, Sigma).

Després de la segona incubació es centrifuguen les cèl·lules i es compten amb blau tripà (punt 2.3.1). El rendiment normal són $1 \cdot 10^6$ cardiomiòcits per cada cor digerit. Abans de sembrar els cardiomiòcits, s'hi afegeix Mytomicina C (Sigma Aldrich) a una concentració de 1:100 per tal d'inhibir la proliferació dels fibroblasts que puguin quedar. Finalment es sembren els cardiomiòcits amb una densitat de $1 \cdot 10^6$ en una placa p35 o 75.000 en una M4, i s'incuben durant 3-4h, passat aquest temps es canvia el medi per medi complet per eliminar la Mytomicina C, que amb llargues exposicions pot danyar els cardiomiòcits.

2.1.2- Cultiu de fibroblasts cardíacs de rata.

Per a l'obtenció de fibroblasts cardíacs es parteix de la primera p100 sense tractar on s'ha sembrat la suspensió de cèl·lules durant el cultiu de cardiomiòcits neonatals (punt 2.1.1). S'hi afegeix medi complet de fibroblasts (medi DMEM 4,5g/l glucosa + 10% FBS + 5% NEAA + 5% Piruvat Sòdic + 1% P/S) i es cultiva durant 2-3 dies fins arribar a confluència.

Un cop el cultiu està confluent cal dividir-lo per anar-lo mantenint, poden dividir-se fins a 4-5 vegades. Per a dividir-los s'aspira el medi, es renta la placa amb PBS 1x escalfat a 37°C, s'hi afegeixen 2ml de Tripsina i s'incuba 3min a 37°C. S'afegeixen 8ml de medi complet per a inactivar la tripsina i es centrifuga 4min a 800rpm. Es resuspèn el pellet i es sembren en una proporció de 3 p100 per a cada p100 original.

2.1.3- Línia cel·lular HEK293T.

La línia cel·lular humana de cèl·lules de ronyó embrional, HEK293T, és una línia utilitzada de manera rutinària com a model, ja que és adequada per a obtenir proteïnes cel·lulars i extracel·lulars, de membrana i excretades. Aquesta línia cel·lular expressa l'antigen T de SV40, permetent la replicació episomal de plàsmids que continguin la regió promotora SV40. La línia cel·lular HEK293T es cultiva en Medi DMEM complementat amb: 10% FBS, 1:100 NEAA, 1:500P/S i 1:100 Piruvat sòdic i es mantenen a 37°C, en atmosfera humida al 5% de CO₂. Per al manteniment de la línia es renta la placa de cèl·lules en tampó fosfat salí (PBS), es desenganxen les cèl·lules amb Tripsina-EDTA a temperatura ambient, s'inactiva la tripsina amb medi amb sèrum, i es

recullen centrifugant-les a 800rpm durant 4 minuts. Es dilueixen segons convingui, essent la dilució habitual 1:10 i es sembren en plaques no tractades en el seu medi.

2.2-Producció de lentivirus.

2.2.1- Transfecció amb polietilenamina (PEI).

La majoria de membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, essent molt difícil que molècules amb càrrega negativa, com són els àcids nucleics, puguin travessar-les. Els lípids catiónics, com la polietilenamina (PEI), condensen el DNA plasmídic neutralitzant les càrregues negatives i protegint-lo de l'acció de DNAses, els agregats resultants tenen alta afinitat per les cèl·lules, donant una alta efectivitat de transfecció. Així doncs, el PEI (Sigma) s'utilitza des de 1995 com a vector de concentració i com a mitjà de transfecció de les cèl·lules.

La transfecció cel·lular amb PEI es realitza en medi sense sèrum ni antibiòtics. Per a cada µg de DNA a transfectar es dilueixen 5µl de PEI 1x (10µM) en 4 volums de solució estèril de NaCl 150mM. El DNA es dilueix també en NaCl 150mM en el mateix volum que està diluït el PEI. Un cop es tenen les dues barreges per separat, la solució de PEI s'afegeix a la del DNA i es vorteja 1min, després es deixa reposar 10min a temperatura ambient, durant els quals es formen els complexos de PEI i DNA. La solució de transfecció s'afegeix damunt la placa de cultiu gota a gota. A les 3 hores es canvia el medi que conté els complexos per medi complert.

2.2.2- Producció i concentració de lentivirus en la línia cel·lular HEK293T.

Degut a la gran quantitat de partícules lentivirals necessàries per a infectar els cultius, és necessari partir d'almenys 3 plaques p100 de cèl·lules a una concentració aproximada de $3,5 \times 10^5$ cèl·lules per placa. L'endemà de ser sembrades les cèl·lules, es canvia el medi per medi DMEM sense antibiòtic ni sèrum, i es mantenen en repòs a l'incubador mentre es prepara la barreja de transfecció.

Es transfecta un total de 40µg de DNA per placa, que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 3:2:1. És a dir, 20µg del plàsmid lentiviral d'interès, 13µg del plàsmid empaquetador psPAX2 i 7µg del plàsmid pMD2G, que codifica per l'embolcall víric. Cal, doncs, un total de 200µl de PEI i tant el DNA com el PEI es resuspenen en 1ml de NaCl 150mM estèril. S'afegeix la solució de PEI sobre la de DNA, es vorteja 1min i es

deixa reposar 10min. Tot seguit s'afegeix la barreja a la placa de HEK293T i es deixa a l'incubador durant 3 hores. Transcorregudes aquestes hores s'aspira el medi sense sèrum ni antibiòtic que conté el PEI i el DNA a la campana de seguretat Biolla i s'afegeix medi complet de HEK293T. A partir de les 24 hores el medi ja conté nombrosos virus. Generalment es recull el medi amb les partícules víriques al cap de 3 dies després de la transfecció.

Tot el procés de concentració dels lentivirus es duu a terme a la campana de seguretat Biolla. El medi recollit que conté els virus es filtra a través d'un filtre de xeringa de 0,45µm, per tal d'eliminar qualsevol cèl·lula que pugui haver quedat en el medi. Un cop filtrat el medi amb els virus, es centrifuga a 50.000g durant 3 hores a 4°C. El pellet obtingut és poc compacte, així que s'aspira el medi suaument i es resuspenen els virus en una solució estèril de PBS a l'1% de BSA, a raó de 30µl per cada placa p100 de partida. I es congelen a -80°C en alíquotes de treball fins a la seva utilització.

2.2.3- Transducció dels cultius amb lentivirus.

Un cop finalitzat el cultiu de cardiomiòcits neonatals de rata i canviat el medi després de la incubació amb Mytomicina C (punt 2.1.1), a cada p35 s'afegeixen, treballant dins la campana Biolla, entre 15 i 20µl de lentivirus concentrats. Les cèl·lules es deixen en contacte amb els lentivirus unes 18h, quan s'aspira el medi amb virus i es canvia per medi complet fresc. Els cardiomiòcits es mantenen durant 4-5 dies, passats els quals, s'inicia el tractament o es processen per a analitzar-los.

2.3- Recomptes cel·lulars.

2.3.1- Recompte de viabilitat amb Blau Tripà.

El reactiu Blau Tripà és un colorant vital que s'utilitza per a tenyir de blau selectivament les cèl·lules mortes. Les cèl·lules vives, amb la membrana plasmàtica intacta, l'expulsen activament mantenint-se incolores, mentre que els nuclis de les cèl·lules mortes es tenyeixen de blau. El reactiu de Blau Tripà (Gibco-Invitrogen) s'utilitza al 0,1%, i de la suspensió de cèl·lules resultant se'n compten 10µl amb la cambra de Neubauer.

2.3.2- Recompte de cardiomiòcits procedents de teixit.

El protocol per al recompte de cardiomiòcits procedents de teixit, tant adults com neonats, ha estat optimitzat i posat a punt en el nostre laboratori, basant-nos en els treballs de Shin et al i Tamura et al. [315, 316]. El fonament d'aquest protocol és digerir els teixits amb KOH, que en disgrega les cèl·lules i permet obtenir-les en suspensió per a poder-les comptar.

Primer de tot cal fixar els teixits, quan es treballa amb cors d'animals neonatals s'han d'extreure els cors, rentar-los amb PBS 1x i fixar-los ON a 4°C amb formol. Quan es treballa amb cors d'animals adults, l'ideal és perfondre els animals per la vena cava (per no danyar el cor) amb formol per tal d'assegurar-nos que el cor queda totalment fixat, i després es deixa el cor fixant-se ON a 4°C. L'endemà els cors es treuen de l'agent fixador, es renten bé amb PBS 1x, es trossegueixen i es posen en KOH 12,5M a 4°C ON. Passada la incubació amb el KOH es treuen els trossets del KOH, es netegen bé amb aigua estèril i es posen en 3ml de PBS 1x. A continuació es vortegen durant 10 min. Després del vòrtex, la solució es passa per una malla de 250µm amb l'ajuda d'una xeringa i es recupera la suspensió que la travessa. Aquesta es centrifuga 5min. a 800rpm, el pellet es resuspèn en PBS 1x i ja es poden comptar les cèl·lules amb la cambra de Neubauer. Els cardiomiòcits són les cèl·lules allargades i més íntegres, tal i com s'aprecia a la figura 27. El nombre aproximat de cardiomiòcits que podem obtenir amb aquest protocol són $1 \cdot 10^6$ cardiomiòcits/cor, coincident amb la literatura.

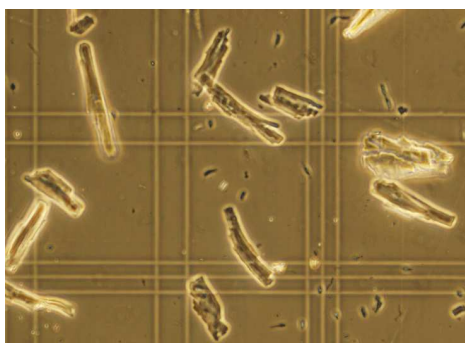


Figura 27: Exemple de cardiomiòcits obtinguts amb el protocol de digestió amb KOH. Els cardiomiòcits són les cèl·lules allargades i més íntegres, la resta són deixalles d'altres tipus cel·lulars que queden en la suspensió.

Cal anar en compte quan es volen comparar diferents condicions en carregar sempre el mateix volum de suspensió cel·lular a la cambra de recompte per a evitar comptar cèl·lules de més.

2.4- Subfraccionaments cel·lulars.

La millor manera per a poder analitzar la localització específica d'una proteïna dins de la cèl·lula és mitjançant el subfraccionament cel·lular, és a dir, mitjançant la separació dels principals components de la cèl·lula: nucli, mitocondris i citosol. D'aquesta manera es pot obtenir la proteïna total de cadascuna de les fraccions cel·lulars per separat i estudiar, per exemple mitjançant western blot, on es troba la nostra proteïna d'interès. Això és possible aplicant un protocol i tampons de lisi i extracció proteica específics per a cada fracció cel·lular, que permeti enriquir amb la fracció d'interès, ja sigui citosol, nucli o mitocondri. Tot i això, una purificació del 100% és pràcticament impossible, i una petita quantitat de proteïna d'altres fraccions sempre pot quedar en la teva fracció d'interès.

2.4.1- Extracció de citosol.

Per a obtenir la fracció citosòlica de les cèl·lules s'utilitza un tampó d'extracció compost de Manitol 220mM, Sacarosa 70mM, Hepes 50mM, KCl 10mM, EGTA 5mM, MgCl₂ 2mM i un cocktail d'inhibidors de proteases 1mM (Complete EDTA-Free, Roche); el principi d'acció d'aquest tampó és que la barreja del manitol i la sacarosa forma uns cristalls que trenquen la cèl·lula i permeten separar-ne les diferents parts.

La quantitat òptima de cèl·lules de partida és d'entre $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$. Les cèl·lules es renten 2 vegades amb PBS 1x i es recullen amb una mica de PBS 1x en un tub de 15ml, se centrifuguen 5min. a 800rpm a 4°C i el pellet (cèl·lules totals) es resuspèn amb 80µl del tampó d'extracció tot passant-ho a un eppendorf, a continuació s'incuba en gel durant 25min. tot agitant el tub cada 10min. Passat el temps d'incubació se centrifuga 20min. a 750g a 4°C, es recupera el sobrenedant (fracció citosòlica) i es torna a centrifugar, ara 20min. a 10.000g a 4°C per tal de precipitar els mitocondris i residus de les altres fraccions; finalment es recupera el sobrenedant, que és la fracció citosòlica. Aquesta es pot quantificar pel mètode de Lowry, explicat al punt 3.4.1.2.

2.4.2-Extracció de mitocondris.

L'extracció de la fracció mitocondrial s'ha fet seguint el protocol del kit: *Mitochondria Isolation kit for cultured cells* de Thermo Scientific™ amb referència 89874.

Breument, es parteix d'aproximadament $2 \cdot 10^7$ cèl·lules, que se centrifuguen i a les quals s'afegeixen uns tampons anomenats A i B, que són els encarregats de llisar les cèl·lules. Després s'hi afegeix un tampó anomenat C que atura la reacció i se centrifuga a 700g per tal d'eliminar els nuclis, que hauran precipitat. El sobrenedant es torna a centrifugar a 12.000g i el pellet d'aquesta segona centrifugació són els mitocondris (el sobrenedant és la fracció citosòlica i la descartem). Es renta el pellet (mitocondris) i finalment es resuspenen amb el tampó de lisi de proteïna utilitzat rutinàriament en el nostre laboratori per a extreure proteïna per al western blot (Tris-HCl pH 6.8 125mM + 2% SDS), descrit al punt 3.4.1.2. La mostra es pot quantificar mitjançant el mètode de Lowry.

2.4.3- Extracció de nuclis.

Per a l'extracció de nuclis s'han provat dos protocols diferents, un utilitzant un tampó de lisi amb detergent i l'altre que utilitza un tampó de lisi sense detergent; això ha estat així perquè s'ha descrit que el detergent en el tampó d'extracció pot permeabilitzar la membrana nuclear alliberant algunes proteïnes nuclears al citoplasma, amb la conseqüent pèrdua d'aquestes de la fracció nuclear [317].

2.4.3.1-Extracció de nuclis amb detergent

Per a l'extracció de nuclis utilitzant detergent s'ha utilitzat un kit anomenat *Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation kit* amb referència NUC-101 de la casa comercial Sigma-Aldrich.

El protocol seguit és el que descriu el distribuïdor. Breument, es parteix d'aproximadament $1,5 \cdot 10^7$ cèl·lules, que se centrifuguen i a les quals s'afegeix el tampó de lisi (no se'n coneix la composició exacta, però se sap del cert que conté detergent). Després d'una incubació de 5min en gel se centrifuguen les cèl·lules a 500g i amb el pellet (seran els nuclis, el citoplasma roman al sobrenedant) es repeteix el mateix procediment. El pellet final es resuspèn en el tampó de lisi de proteïna (Tris-HCl pH 6.8 125mM + 2% SDS) i es quantifica la mostra pel mètode de Lowry.

2.4.3.2- Extracció de nuclis sense detergent

El protocol emprat per a digerir nuclis sense detergent ha estat en gran part adaptat del protocol comercial (*Nxtract*, Sigma-Aldrich) però s'ha optimitzat i els tampons s'han preparat en el nostre laboratori. Cal treballar durant tot el procés amb gel i totes les centrifugacions s'han de fer a 4°C. Es parteix d'unes $2 \cdot 10^7$ cèl·lules, les quals es recullen i a les que s'afegeixen 5 volums de tampó de lisi (10mM HEPES, 1.5mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 1mM EGTA, 1mM DTT i 1mM inhibidors de proteases (Complete EDTA-Free, Roche)) per a cada volum de cèl·lules. S'incuba 15min en gel i se centrifuga a 1000g 5min. El pellet obtingut es resuspèn en 2 volums de tampó de lisi i es passa per una xeringa (27G) per a trencar les cèl·lules (es pot comprovar tenyint una alíquota amb blau tripà, punt 2.3.1), un cop trencades les cèl·lules se centrifuguen 20min a 10.000g, amb aquesta centrifugació la fracció citosòlica queda al sobrenedant i al pellet precipiten els nuclis. Per a assegurar-nos que no queden cèl·lules íntegres que puguin contaminar l'extracte nuclear es torna a afegir 2 volums de tampó de lisi al pellet obtingut, es torna a passar per la xeringa i es torna a centrifugar.

El pellet resultant són únicament nuclis, íntegres. Als quals s'afegeix 2/3 de volum de tampó d'extracció (20mM HEPES, 1.5mM $MgCl_2$, 0.42M NaCl, 0.2mM EDTA, 25%(v/v) glicerol, 1mM DTT i 1mM inhibidors de proteases). Aquest tampó extraurà les proteïnes nuclears i serà possible separar les proteïnes nuclears solubles (fracció nuclear soluble) de les proteïnes nuclears de membrana (fracció nuclear insoluble). Un cop afegit el tampó d'extracció s'agiten els nuclis 30min. i tot seguit se centrifuguen 5min. a màxima velocitat. Amb aquesta darrera centrifugació s'obtidran en el sobrenedant les proteïnes nuclears solubles i les proteïnes de membrana quedaran en el pellet, al qual s'ha d'afegir tampó de lisi de proteïna (Tris-HCl pH 6.8 125mM + 2% SDS) per a extreure les proteïnes de la membrana. Tots dos extractes es poden quantificar pel mètode de Lowry.

2.5- Assaigs d'activitats enzimàtiques en extractes cel·lulars.

2.5.1- Assaig d'activitat de les caspases executores.

S'utilitza el substrat fluorescent Ac-DEVD-AFC (Calbiochem, 264151) per a la detecció de l'activitat de caspasa 3, que també detecta l'activitat de la caspasa 7. Un cop acabat el tractament de les cèl·lules, es desenganxen de la placa, es renten dues

vegades amb PBS 1x fred i es llisen en el tampó següent: 20mM Hepes/NaOH (pH7,2), 5mM MgCl₂, 5mM EDTA, 1% inhibidors de proteases, 10mM DTT, 1% tritó. La lisi es duu a terme a 4°C en agitació orbital durant 20min. Passat aquest temps se centrifuga 5min a màxima velocitat a 4°C i es recupera el sobrenedant. Es quantifica la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford seguint el protocol de la casa comercial (BioRad). Un cop quantificades s'agafen 25µg de cada mostra i es barregen en 100µl del tampó d'assaig, que és el mateix tampó de lisi havent afegit 10% sacarosa, 0,1% CHAPS i el substrat fluorogènic a 50µM. L'assaig es fa en plaques de 96 pous, que s'incuben a 37°C, i es van fent lectures cada hora fins a les 8h. Es detecta la fluorescència a 360nm d'excitació i 530nm d'emissió.

2.5.2- Assaig dels nivells d'AcetilCoA en extractes de teixit.

Per a determinar els nivells d'AcetilCoA s'ha utilitzat el kit *PicoProbe Acetyl CoA Assay kit* d'Abcam (ab87546). El fonament d'aquest kit consisteix en una inactivació inicial del CoA lliure, després l'AcetilCoA es converteix a CoA, aquest reacciona per a formar NADH, i aquest és qui finalment interacciona amb la sonda per a generar la fluorescència que es detecta. S'han utilitzat mostres de teixit, i s'ha seguit el protocol de la casa comercial. Breument, les mostres es desproteïnitzen mitjançant el protocol d'àcid perclòric/KOH, indicat per la casa comercial, això és necessari perquè els enzims de les mostres poden interferir amb l'assaig. Un cop les mostres estan desproteïnitzaades es procedeix a realitzar l'assaig en una placa multipou de 96 i amb tots els reactius inclosos en el kit. Es posen 2 pous per mostra, un dels quals serà un control en el que no es posarà l'enzim i permetrà determinar i corregir les mostres de les altres formes de CoA diferents a l'acetyl, com per exemple el succ-CoA. També es prepara una recta patró amb un estàndard d'AcetilCoA inclòs en el kit. Després d'una incubació de 10min a 37°C es llegeix la fluorescència a 535 d'excitació i 589 d'emissió. Als valors obtinguts se'ls resta el valor "zero" de la recta i, a més, als valors de les mostres se'ls resta, com s'ha dit, el valor del control sense enzim. Mitjançant la recta s'extrapolen els pmol d'AcetilCoA que hi ha en el pou i s'expressa tenint en compte el volum de mostra posat al pou i els mg inicials de mostra. Les concentracions d'AcetilCoA s'expressen doncs en nM/mg de teixit.

3-Tècniques de Biologia Molecular i Bioquímica.

3.1- Construccions plasmídiques

En enginyeria genètica, es considera un vector a una molècula de DNA que pugui utilitzar-se per introduir una seqüència de DNA en una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà. Generalment es tracta d'un plàsmid. Els plàsmids són petites molècules de DNA circular extracromosòmic que es troben en molts bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i poden haver-hi múltiples còpies del plàsmid en una mateixa cèl·lula.

Els virus són entitats infeccioses que contenen l'àcid nucleic que codifica per a la seva pròpia estructura, però no tenen la maquinària enzimàtica d'una cèl·lula. Es repliquen envaint una cèl·lula i utilitzant la seva maquinària per a expressar el genoma viral. En enginyeria genètica s'utilitzen els virus com a vector, ja que permeten introduir un plàsmid a l'interior d'una cèl·lula pel propi mecanisme infecció del virus. S'utilitzen virus defectius, és a dir, que no són capaços de replicar-se i produir nous virus, ja que s'ha substituït el genoma viral pel plàsmid d'interès.

3.1.1- Clonatge d'un insert de DNA en un plàsmid.

La manera general de clonar un insert de DNA en un plàsmid és la següent: es digereixen tant el plàsmid com l'insert amb els enzims de restricció corresponents (Takara), i compatibles per a que puguin lligar (digestions de 3-4h). Un cop digerits, tant l'insert com el plàsmid s'han de netejar de sals, enzims de restricció i fragments de DNA no necessaris, per a això s'utilitzen kits comercials (Nucleospin ExtractII, Magerey-Nagel) de purificació de DNA a partir dels gels d'agarosa.

Un cop purificats es pot procedir amb la lligació, que es realitza en proporció molar de vector:insert de 1:3, i s'utilitza l'enzim T4 lligasa (Takara) en condicions de 16°C ON. Un cop acabada la lligació es transforma en una soca bacteriana *E. Coli* Stbl2 (Invitrogen), mitjançant xoc tèrmic. Finalment, un cop transformada la lligació cal escollir aquelles colònies que han internalitzat el plàsmid amb l'insert i descartar aquelles que han internalitzat plàsmid buit. Per a fer-ho sense necessitat d'haver de fer créixer cada clon es piquen colònies directament de la placa bacteriana i es suquen en

5µl d'aigua, on s'afegirà la mix de PCR amb uns primers que flanquegen la zona de l'insert.

3.1.2- Clonatge de les construccions de Caspasa 3 i Caspasa 7.

Les seqüències de Caspasa 3 i Caspasa 7 s'han obtingut de Source Bioscience. Utilitzant dues seqüències de primers que introdueixen les dianes EcoRI i XhoI en 5' i 3', respectivament, s'amplifiquen els gens. Per a la reacció de PCR es té en compte la temperatura d'anellament dels primers en els diferents cicles, ja que durant els primers 5 cicles s'anellen al DNA motlle els nucleòtids equivalents a la seqüència, i en els 25 següents també ja ho fan els nucleòtids corresponents a les dianes de restricció. Un cop amplificades les seqüències es digereixen tant les seqüències com el plàsmid receptor amb els enzims de restricció corresponents i es realitza el clonatge com s'ha explicat al punt 3.1.1.

El vector lentiviral de sobre-expressió és pEIGW-SK, que té una regió de polilinker amb poques dianes de restricció, per la qual cosa primer es clonen els gens al plàsmid pCRII-SK, amb una regió polilinker més rica en dianes, i a continuació es passa al plàsmid final digerint amb Sfil, equivalent en ambdós plàsmids.

3.1.3- Clonatge de la construcció de Serpina3 humana.

La seqüència del gen Serpina3 en la forma humana s'ha obtingut de Mónica Santamaria [318], es trobava clonada en el vector pCDNA3.1. El clonatge al plàsmid lentiviral de sobre-expressió pEIGW-SK s'ha fet seguint el protocol explicat al punt 3.1.1. De la mateixa manera que s'ha fet amb les construccions de les caspases, primer s'ha clonat Serpina3 al vector intermedi pCRII-SK, en aquest cas, mitjançant la digestió amb els enzims HindIII i XbaI, que flanquegen la seqüència d'interès. Serpina3 s'ha passat al vector final pEIGW-SK mitjançant la digestió amb Sfil.

3.1.4- Mutagènesi dirigida de Caspasa 3 i Caspasa 7.

La mutagènesi dirigida d'una base del centre catalític de Caspasa 3 i Caspasa 7 s'ha portat a terme directament sobre el vector lentiviral pEIGW-SK, s'ha mutat la Cisteïna del centre catalític tot canviant una única base: TCG (Cys) per TCC (Ser). S'ha utilitzat el kit de LifeTechnologies: GENEART® Site-Directed Mutagenesis System, i s'ha

seguit exactament el protocol indicat per la casa comercial. Breument, es metila el DNA de partida i s'amplifica amb un parell de primers que contenen la mutació a incloure en el centre. Després de l'amplificació es porta a terme una reacció de recombinació de 10min a temperatura ambient per tal de tancar el plàsmid i es pot prosseguir directament amb la transformació, s'utilitzen uns bacteris competents inclosos en el kit capaços de digerir el DNA metilat, de manera que només integren el no-metilat (que inclou la mutació). Mitjançant seqüenciació es verifica que el DNA plasmídic de les colònies obtingudes inclou la mutació.

3.2- Amplificació en cadena de la polimerasa.

3.2.1-Extracció de RNA.

L'extracció de RNA dels cultius cel·lulars i els teixits es fa utilitzant el kit comercial *RNAeasy mini kit* (Qiagen) acoblat a la digestió amb DNasa I, que permet eliminar tot el DNA genòmic contaminant que pugui restar en la mostra i que donaria una senyal falsa. Un cop extret el RNA es verifica que no hi hagi degradació mitjançant un gel d'agarosa a l'1%, i la quantitat de RNA es quantifica al Nanodrop (ND-1000 UV/Vis Spectofotometer, de Nanodrop Technologies). Els extractes de RNA es guarden a -80°C.

3.2.2- Síntesi de cDNA.

El cDNA s'obté de RNA a partir de la reacció de transcripció reversa (RT), aquesta es realitza segons el protocol de l'enzim retrotranscriptasa de Taqman (Applied biosystems) a partir d'1µg de RNA. La reacció conté MgCl₂, dNTPs, hexàmers, inhibidors de RNases i la retrotranscriptasa en les proporcions indicades pel distribuïdor. Primer es posen les mostres de RNA 2min. a 90°C i tot seguit s'hi afegeix la barreja de reacció i s'inicia el programa de la transcripció reversa: 10min. a 25°C, 60min. a 42°C i 5min. a 95°C. Quan acaba la reacció les mostres es poden utilitzar per a una PCR convencional o bé una PCR en temps real (RT-PCR).

3.2.3- PCR en temps real.

La tècnica de la PCR en temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar, tant les sondes (20x) com la mix (2x) són d'Applied Biosystems. Aquesta

sonda està marcada amb un fluorocrom (FAM) que el termociclador CFX96™ de Bio-Rad llegeix i quantifica. El programa utilitzat és 2min a 50°C i 10min a 95°C per a activar la reacció, seguit de 40 cicles a 95°C durant 15seg. i 1min. a 60°C. Els gens analitzats i la referència de cada sonda es troben a la taula 2.

Els resultats s'obtenen en forma de Ct (*Cycle Threshold*), que és el cicle de PCR on comença el creixement exponencial del producte de la PCR. Per tant, com més cDNA del gen en qüestió hi hagi en la mostra de partida, més baix serà el Ct.

La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen GAPDH.}$$

I respecte la mostra control:

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ mostra control} - \Delta Ct \text{ mostra.}$$

A partir d'aquests càlculs la concentració relativa del mRNA en qüestió respecte al control és $2^{\Delta(\Delta Ct)}$. De cada mostra se'n fan tres rèpliques, de les quals es calculen la mitjana i errors estàndard.

Gen	Nº de catàleg
Cdc6	Mm03048221_m1
Cenpa	Mm00483252_m1
CiclinaE1	Mm00432367_m1
Fam107a	Mm01706977_s1
Gapdh (ratolí)	Mm99999915_g1
Gapdh (rata)	Rn01775763_gl
Glut4=Slc2a4	Mm01245502_m1
Mef2a	Rn01478096_m1
Mef2d	Rn01455530_gl
Myh6	Mm00440359_m1
Myh11	Mm00443013_m1
Ndr4	Mm00455148_m1
Nppa	Mm01255747_g1
Pold1	Mm00448253_m1
PTB	Mm00943334_m1
Tmem100	Mm00471352_m1
Serpina3 (ratolí)	Mm00776439_m1
Serpina3 (rata)	Rn00755832_mH
Serpina3 (humà)	Hs00153674_m1

Taula 2: Relació de les sondes de Real time utilitzades amb la seva referència.

3.2.4- Extracció de DNA per al genotipatge.

Per a poder genotipar els animals s'ha extret DNA d'un trosset de cua. El tampó utilitzat és el següent: 100mM Tris pH 8,5, 200mM NaCl, 5mM EDTA i 0,2% SDS, al qual s'afegeix proteïnasa K (P2308, Sigma-Aldrich) en una dilució 1/10 just abans de l'extracció. S'incuba el trosset de cua amb 200µl del tampó d'extracció a 55°C durant 4h; passat aquest temps, es centrifuga 8min a màxima velocitat i es recull el sobrenedant, al qual s'afegeixen 800µl d'etanol al 100%. S'agita el tub i es recull el precipitat, el qual es resuspèn en 400µl d'aigua estèril. D'aquesta dilució de DNA s'utilitza 1µl per al genotipatge.

3.2.5- PCR convencional.

En el nostre cas, la PCR convencional s'ha utilitzat principalment per al genotipatge dels ratolins. El programa utilitzat i els primers per a cada genotipatge estan explicats en el punt 1.2. Els reactius per a la PCR són Biotherm de la casa Gene Craft.

Els productes de PCR són migrats ens gels al 2% en agarosa amb un 1% de SYBR safe dye (Invitrogen).

3.3- Micro-arrays d'expressió gènica.

Les plaques de micro-array emprades (Affymetrix® Mouse Gene 2.1 ST Array Plate) permeten mesurar els nivells de més de 35.000 trànscripats codificants i no codificants, cobrint gran part del genoma transcrit. Nosaltres, en col·laboració amb la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) i la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica (UEB) de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebron (VHIR), hem analitzat 6 cors WT i 6 cors DKO de dues edats diferents: neonats (1-2 dies) i animals joves (1 mes). L'extracció de RNA s'ha fet seguint el protocol indicat al punt 3.2.1. Les dades s'han analitzat en funció del temps (neonat vs jove) i en funció del genotip (neonat WT vs neonat DKO / adult WT vs adult DKO).

Abans de començar amb els anàlisis s'ha portat a terme un control de qualitat de les mostres, per a comprovar que els arrays de les diferents mostres de cada grup es comporten de manera similar, en el nostre cas és així, i les mostres queden clarament separades en funció de l'edat.

Dels 35.000 gens de l'array se n'han analitzat aproximadament 6000, descartant els gens la desviació estàndard i la senyal mitjana dels quals estan per sota la mediana. En aquest treball els resultats estan expressats de diferents maneres. Primer, mostrant els gens amb una expressió alterada en els DKO organitzats en funció del fold-change respecte el WT i la seva significança estadística (figura 40A). I segon, també es presenten les diferències agrupades per funcions biològiques, és a dir, havent agrupat els gens en diferents categories (figura 40B); aquest segon anàlisi s'ha portat a terme amb la plataforma online Ingenuity Systems®, els gens s'han filtrat segons el Fold Change i utilitzant el p-valor (0.05) ajustat segons el procediment estadístic Benjamini-Hochberg o False Discovery Rate (FDR), que té en compte la proporció esperada de falsos positius, un test més adient per a comparacions múltiples que altres com el test de Fisher.

3.4- Immunodetecció de proteïnes.

3.4.1- Western blot.

3.4.1.1- Extracció de proteïna total en SDS.

Per a poder fer una immunodetecció de proteïnes mitjançant Western blot cal fer una extracció de proteïna total, aquesta es fa després del tractament oportú de les cèl·lules o directament d'un teixit, ja sigui fresc o congelat. Aquest mètode d'extracció trenca les interaccions entre proteïnes permetent l'alliberament de proteïnes unides a estructures macromoleculares i, a més, conté el detergent SDS (sodium dodecyl sulfate), que desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims, incloses les proteases que podrien danyar l'extracte. El tampó d'extracció és Tris-HCl 125mM (pH 6,8) al 2% de SDS.

Si es parteix de cèl·lules, primer de tot les cèl·lules es renten dues vegades en PBS 1x un cop aspirat el medi per eliminar-ne les restes que hagin pogut quedar i després s'afegeix el tampó d'extracció. L'extracció ha de ser ràpida per a evitar degradacions i aconseguir que l'extracte representi l'estat fisiològic de la cèl·lula viva. Si es parteix de teixit, cal posar el teixit en el tampó d'extracció i homogenitzar-ho uns 20 segons amb el politrò (Heidolph DIAX 900 – 5mm), després cal centrifugar-ho 3min per a eliminar les restes de teixit i es recupera el sobrenedant.

A continuació es soniquen les mostres per fragmentar l'ADN genòmic i així eliminar la viscositat de la mostra. En aquest punt es poden congelar fins que necessitin ser utilitzades.

3.4.1.2-Quantificació de proteïnes pel mètode de Lowry.

És necessari quantificar les proteïnes abans de començar el Western blot per a poder interpretar correctament els resultats, ja que és necessari carregar la mateixa quantitat de proteïna de cada mostra per a poder concloure que les diferències observades són degudes al tractament/condició i no a la càrrega.

Per a determinar la quantitat de proteïna en una mostra s'utilitza el mètode de Lowry, els reactius del qual comercialitza Bio-Rad. En una placa de 96 pous s'hi col·loquen per duplicat els punts de la recta patró i les mostres a determinar. Tot seguit es barregen els reactius A i S (en proporció 50:1), i s'afegeix la barreja als pous amb les mostres (25µL a cada pou). A continuació s'hi afegeix el substrat fluorogènic (reactiu B, 200µL per pou), i es deixa produir la reacció durant 10 minuts. Passat aquest temps es llegeix la placa a una absorbència de 655nm. La recta patró es fa utilitzant concentracions conegudes de BSA i s'utilitza per a estandarditzar els resultats. Els valors d'absorbència de les mostres s'interpolen a la recta patró per tal de determinar la seva concentració proteica.

3.4.1.3-Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

Per a poder separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular s'utilitzen gels desnaturalitzants de poliactilamida amb SDS. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™, que és una solució al 39% d'actilamida amb un 1% de bis-actilamida. La reacció de polimerització es porta a terme amb 0,1% de TEMED (Sigma) com a iniciador de la reacció i persulfat amònic al 0,05% com a catalitzador.

S'utilitzen gels discontinus, és a dir, formats per dos parts amb percentatges d'actilamida diferents. En la part superior o gel apilador és on es carreguen les mostres, té un percentatge d'actilamida baix, normalment del 4%, es prepara en tampó Tris-HCl 0,5M a pH 6,8, i serveix per a portar totes les proteïnes al mateix temps a l'entrada del gel separador. El gel separador es prepara en tampó Tris-HCl 1,5M a pH 8,8, el seu percentatge d'actilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que

volem separar, i és el que realment separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Per a proteïnes de baix pes molecular s'utilitzen gels amb un percentatge superior d'acrilamida que l'utilitzat per a separar proteïnes d'alt pes molecular.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 375mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 25% β -mercaptoetanol i blau de bromofenol), es porten totes a un mateix volum amb tampó de càrrega 1x i es carreguen al gel. En un dels pous es carrega un marcador de pesos moleculars pretenyit (Invitrogen) per a poder interpretar quina és cadascuna de les bandes que s'obtindran agafant-lo com a referència. L'electroforesi es migra a un amperatge constant de 20mA, tot i que quan les mostres entren al gel separador es pot pujar a 25mA, el gel es migra en tampó de migració (glicina 110mM, Tris 24mM, SDS 0,1%) en el sistema HoeferSE260 (Amersham Biosciences).

3.4.1.4-Transferència de proteïnes.

La transferència de proteïnes es fa en un sistema de transferència semisec. Primer de tot, i mentre el gel està corrent, cal hidratar la membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) en metanol 100% durant uns dos minuts i tot seguit en aigua, després cal submergir-la en tampó de transferència (48mM Tris, 0,0375% SDS, 39mM glicina i 20% metanol), en el qual també s'ha de submergir el paper de transferència. Un cop el gel acabi de córrer també cal submergir-lo en tampó de transferència durant uns 15min. Aquest temps és suficient per a que abans de començar la transferència s'equilibrin la membrana, el paper de filtre i el gel.

Un cop equilibrats es pot començar la transferència, es col·loquen 2 papers de transferència sobre el l'ànode, a sobre es posa la membrana de PVDF, a sobre el gel de poliacrilamida, i dos papers de transferència més. Es posa la tapa (càtode) i s'inicia la transferència a un amperatge constant de 0,8 mA per cm² de membrana. La transferència dura 1h. El sistema utilitzat és Hoefer TE70XP (Amersham Biosciences).

3.4.1.5-Immunodetecció de proteïnes.

Un cop finalitzada la transferència proteica, la membrana es renta en TBS-T (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween20) i tot seguit es bloqueja en solució de bloqueig (TBS-T al 5% de llet desnatada en pols) durant 1 hora a temperatura ambient.

Després del bloqueig es fan tres rentats de 10 minuts en TBS-T i s'incuba amb una dilució en TBS-T de l'anticòs primari (taula 3) amb 0,02% d'Azida sòdica per evitar contaminació bacteriana i així poder-lo reutilitzar. La incubació s'acostuma a deixar durant tota la nit a 4°C, tot i que en casos d'anticossos primaris molt potents pot ser suficient amb una incubació d'una hora a temperatura ambient.

Després de la incubació, la solució de l'anticòs es recupera i es guarda a 4°C per a poder-se reutilitzar. Amb la membrana es fan 3 rentats de 10min en TBS-T, i després s'incuba 1h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari (taula 4), que es dilueix en solució de bloqueig. Passat aquest temps la membrana es renta 3 vegades amb TBS-T, aquests rentats poden ser de 20min per a eliminar millor les restes de solució de bloqueig que podrien interferir amb el revelat.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Nº de catàleg
α -actina	1/5000	Sigma	A2172
β -catenina	1/1.000	BD	610153
Caspasa 3	1/3.000	Cell Signaling	9662
Caspasa 6	1/1.000	Cell Signaling	9762
Caspasa 7	1/1.000	Enzo Life Sciences	ADI-AAM-127
Cenpa	1/1.000	Abcam	ab33565
Cdc6	1/200	Santa Cruz	sc-9964
CycE	1/1000	Cell Signaling	4129
Dihydrolipoyl dehydrogenasa	1/20.000	Abcam	ab133551
DNA polimerasa delta	1/1.000	Abcam	ab10362
Gapdh	1/10.000	Abcam	ab8245
Glut4	1/1.000	Abcam	ab33780
Lamin A+C	1/1.000	Abcam	ab8984
Mef2a	1/2.000	Cell Signaling	9736
Ndr4	1/1.000	Cell Signaling	9039
Prohibitina	1/5.000	Neo Markers	292P501F
PTB	1/3.000	Abcam	ab5642
Serpina3	1/250	Sigma	HPA002560

Taula 3: anticossos primaris utilitzats per al western blot amb la dilució emprada i la seva referència.

Antigen	Dilució	Proveïdor	Nº de catàleg
Ratolí- IgG HRP	1/10.000	Sigma	A9044
Conill-IgG HRP	1/5.000	Sigma	A0545
Cabra-IgG HRP	1/20.000	Sigma	A5420

Taula 4: anticossos secundaris utilitzats per al western blot amb la dilució emprada i la seva referència.

L'anticòs secundari és el que permet la detecció perquè està conjugat a peroxidasa, i per a detectar-la s'utilitzen uns reactius comercials que oxiden el luminol (de manera anàloga a com ho faria amb l'aigua oxigenada), donant una senyal luminiscent. Hi ha bàsicament dos tipus d'aquests reactius, que s'utilitzen segons si es preveu tenir molta o poca senyal luminiscent, EZ-ECL (Biological Industries) i SuperSignal West Dura (Thomson) respectivament. Després s'exposa la senyal luminiscent sobre films (Fujifilm) tot utilitzant una solució reveladora i una fixadora i l'aparell Optimax de Protec.

3.4.1.6-Tinció dels gels de SDS-acrilamida i membranes de PVDF.

Tant la membrana com el gel es poden tenyir (de diferent manera, com s'explicarà a continuació). El gel es tenyeix per a comprovar la càrrega de cadascuna de les mostres i assegurar-nos que realment els resultats obtinguts no es deuen a diferents quantitats proteïques, i la membrana per a comprovar que la transferència de proteïna del gel a la membrana ha estat correcta i com a control de càrrega.

Blau de coomassie (0,1% CBB-R250, 50% metanol, 10% àcid acètic): S'utilitza per a tenyir el gel i comprovar la càrrega de cadascuna de les mostres, ja que s'uneix a gairebé totes les proteïnes. Després de la transferència a la membrana es tenyeix el gel, marcant les proteïnes que romanen al gel.

Ponceau S (Sigma-Aldrich): S'utilitza per a tenyir la membrana i comprovar que les proteïnes s'hi han transferit correctament. Aquesta tinció és reversible, i la manera de procedir és incubant la membrana en la solució de Ponceau S durant 2 min. a temperatura ambient, tot seguit es renta amb TBS-T fins que la coloració desaparegui i es pot seguir el protocol del western blot, amb el bloqueig.

Naphtol blue (Sigma-Adlrich): S'utilitza per a tenir un control de càrrega real de la membrana. La membrana es tenyeix al final del western blot i quan ja no s'hi vol analitzar cap altre anticòs perquè és una tinció irreversible. S'hidrata la membrana 5min. amb metanol, es neteja 5min. amb aigua i s'incuba 10min. amb la solució de Naphtol blue. Finalment, es fan 2 rentats de 5 min. cadascun amb la solució de rentat (50% metanol, 7% àcid acètic) per a eliminar les restes de colorant del fons de la membrana.

3.4.2- Array de citoquines.

Per a detectar l'expressió de citoquines s'ha utilitzat un kit que inclou tots els reactius necessaris i també les membranes amb els anticossos de captura posats per duplicat (Proteome Profiler® Array - Mouse Cytoquine Array Panel A, #ARY006, de R&D Systems). L'extracció proteica dels cors es porta a terme amb un tampó compost de PBS1X, inhibidors de proteases i tritó 1%, les mostres es quantifiquen pel mètode de Lowry (punt 3.4.1.2). En el nostre cas hem utilitzat cors neonatals WT i DKO, i hem fet pools de 3 cors en cada membrana, tenint un total de 6 mostres/genotip repartides en dues membranes/genotip. El protocol seguit és l'indicat per la casa comercial, breument, es bloquegen les membranes una hora a temperatura ambient amb el tampó de bloqueig inclòs en el kit, mentrestant es preparen les mostres i es deixen a temperatura ambient 1h: 500µg mostra + tampó de bloqueig fins a 1ml + 0,5ml tampó 4 del kit + 15µl barreja d'anticossos. Passat el temps del bloqueig s'aspira el tampó de bloqueig i les membranes s'incuben amb la barreja de mostra/anticòs tota la nit a 4°C en moviment. L'endemà es fan tres rentats de 10min amb tampó de rentat, s'incuben les membranes 30min amb Streptavidina IRDye 800CW (LI-COR, # 926-32230) a una dilució 1/2000 en tampó de bloqueig i es fan tres rentats més. Les membranes es llegeixen amb Odissey Imager® de LI-COR, a una resolució de 84µm, i qualitat mitjana.

3.5- Electroforesi bidimensional.

L'electroforesi bidimensional és una tècnica que permet fer estudis proteòmics basada en la separació de les proteïnes d'una barreja segons dues propietats moleculars, una en cada dimensió. El procediment més utilitzat es basa en la separació en una primera dimensió mitjançant isoelectroenfoc (IEF), és a dir, separant les proteïnes en funció del seu punt isoelèctric, i la segona dimensió segons el pes molecular (electroforesi SDS-PAGE).

3.5.1- Extracció i quantificació de proteïna mitjançant el mètode de Bradford.

Per a extreure la proteïna s'utilitza un tampó comercial (RHB-V, amb número de referència #28-9435-27, comercialitzat per GE) compost bàsicament d'urea, thiourea i el detergent CHAPS. Com que la mostra de partida és un teixit (cor) s'utilitza el politrò

(Heidolph DIAX 900 – 5mm) per a homogeneïtzar la mostra, seguit d'una centrifugació per a eliminar les restes de teixit que puguin quedar.

Per a quantificar-la s'utilitza el mètode de Bradford (Biorad Protein Assay Dye Reagent, #500-0006). En una placa de 96 pous s'hi col·loquen per duplicat els punts de la recta patró i les mostres a determinar, ajustant el volum fins a 50µl amb aigua. Tot seguit s'afegeix a cada pou 200µl del reactiu Bradford 1x i es deixa produir la reacció durant 15min. Passat aquest temps es llegeix la placa a una absorbència de 620nm. La recta patró es fa utilitzant concentracions conegudes de BSA i s'utilitza per a estandarditzar els resultats. Els valors d'absorbència de les mostres s'interpolen a la recta patró per tal de determinar la seva concentració proteica.

3.5.2- Primera dimensió.

La primera dimensió és l'IEF, que separarà les proteïnes segons el punt isoelèctric. S'utilitza el mateix tampó emprat per a l'extracció, amb 50mM Dithiothreitol (DTT) i amfolits 1x (Biorad #163-1112). Es posa la mostra a la cubeta col·locada a l'aparell d'IEF (BioRad Protean IEF Cell) vigilant que quedi ben estesa i després la tira per a l'IEF (Biorad, amb el rang de pH que es vulgui), fent que toqui als elèctrodes de la cubeta. Primer cal rehidratar la tira, es fa una rehidratació activa en condicions de: 50V / 12h / 20°C, però abans és bo posar-ho uns minuts en rehidratació passiva, sense corrent, per a que la mostra impregni totalment la tira. Passat aquest temps, es posen 800µl d'oli mineral sobre la tira per a evitar l'evaporació de la mostra durant la rehidratació i l'IEF. Tot seguit es pot connectar el corrent. Quan acabi la rehidratació s'iniciarà el programa d'IEF: 150V 1h, 300V 1h, 1000V 3h i 4000V (9000hv).

3.5.3- Segona dimensió.

La segona dimensió separarà les proteïnes segons el seu pes molecular, es treballa amb gels desnaturalitzants d'acrilamida discontinus, iguals que els del western blot (punt 3.3.1.3). Abans de fer córrer el gel s'ha d'equilibrar la tira. Per a equilibrar la tira cal fer 2 incubacions de 15min cadascuna, la primera amb la solució equilibradora (6M urea, 0.375M Tris HCl pH 8.8, 2% SDS, 20% glicerol) amb DTT al 2% i la segona amb la solució equilibradora amb Iodoacetamida (IAA) al 2,5%. Un cop equilibrada, es posa

la tira al pou fet al gel, amb el cantó de pH àcid al costat del marcador de pesos moleculars i es fixa amb agarosa low-melt. Quan acaba de córrer el gel, si es vol immunodetectar una proteïna es segueix a partir d'aquí el protocol del western blot (3.4.1.4). Si es vol tenyir el gel, un cop acaba de córrer el gel es segueix com s'explica al punt següent.

3.5.4- Tinció de les proteïnes al gel amb plata

Tenyir els gels de les electroforesis bidimensionals permet tenir el patró proteòmic de la mostra i poder-lo comparar amb diferents mostres. Un mètode molt comú és la tinció de plata, que es fa seguint el protocol de la casa comercial del kit de tinció (Proteosilver Silver Stain kit #protsil1-1KT, Sigma-Aldrich).

3.6- Anàlisi proteòmic mitjançant iTRAQ i LC-MS/MS (ESI).

L'anàlisi de l'expressió diferencial de proteïnes és fonamental per a entendre els processos biològics, és per això que s'han desenvolupat nombrosos marcatges amb isòtops estables com a alternativa a les aproximacions basades en estudis bidimensionals per a estudis proteòmics semi-quantitatius. Amb aquestes tècniques la quantificació es porta a terme en el mateix espectròmetre de masses on els pèptids s'analitzen per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS), així doncs, la identificació dels pèptids i la quantificació relativa es produeix a la vegada [319]. La tècnica iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) és una tècnica de quantificació de proteïnes no basada en gels que proporciona mesures relatives i absolutes de, en teoria, tots els pèptids de diferents mostres. Els reactius de marcatge iTRAQ consisteixen en un grup *reporter* (N-Methylpiperazine), un grup *balance* (carbonil) i un grup éster que reacciona amb els grups amino N-terminal dels pèptids, formant un pont amida. Donat el disseny de massa isobàrica d'aquests reactius, tenen el mateix pes, els pèptids marcats de manera diferent apareixen en un únic pic en els escàners MS, reduint la probabilitat de superposicions entre els pics. Quan els pèptids units als reactius iTRAQ es sotmeten a l'anàlisi MS/MS, el grup *balance* s'allibera com a un fragment neutre, deixant lliures els ions *reporter* que proporcionen la informació quantitativa de les proteïnes [320] (figura 28). Aquesta tècnica de marcatge isobàric

permet un anàlisi múltiple de 4 o 8 mostres diferents (4-Plex o 8-Plex) en un únic experiment.

Després de la desnaturalització, reducció i alquilació de les mostres, aquestes es sotmeten a una digestió enzimàtica i es marquen tots els pèptids per iTRAQ, cada mostra es marca individualment. Els pèptids marcats són separats per cromatografia líquida acoblada a una font de ionització d'electrosprai (ESI) i posteriorment analitzats per espectrometria de masses amb un analitzador de Trampa Iònica o un analitzador OrbiTrap. Els pèptids idèntics provinents de diferents mostres tenen la mateixa massa i unes propietats cromatogràfiques similars, permetent tant la identificació com la quantificació del pèptid a partir del mateix espectre de MS/MS (figura 28).

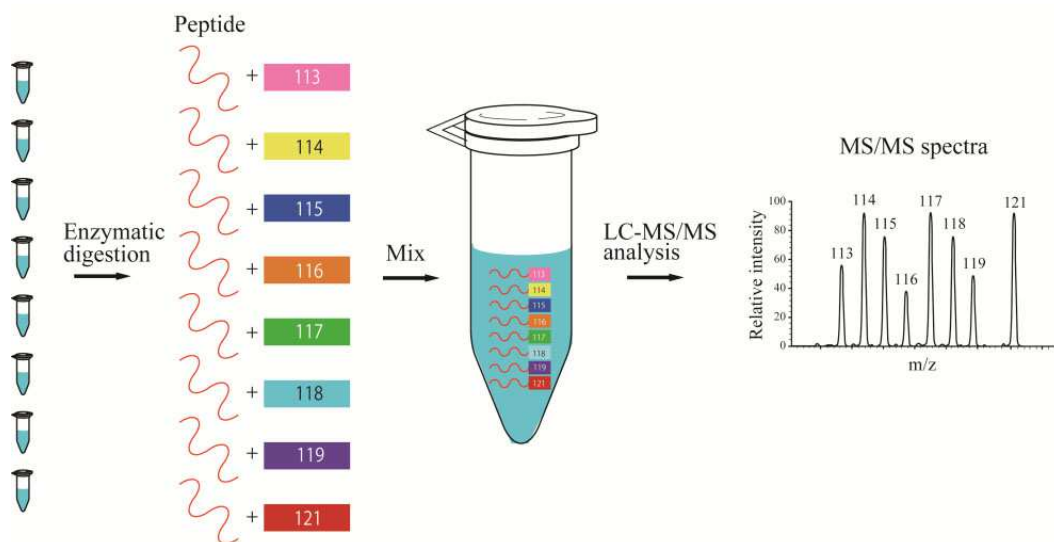


Figura 28: esquema de l'estudi proteòmic per iTRAQ. Breument, les mostres es digereixen enzimàticament, es marquen les proteïnes de cada mostra amb un iTRAQ diferent (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 i 121), es barregen els pèptids, es passen per cromatografia líquida (LC) i s'analitzen per espectrometria de masses (MS/MS) [321].

En el nostre cas, hem portat a terme un estudi 8-Plex, en col·laboració amb el servei de Proteòmica del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). Les 8 mostres que hem analitzat són els cors de quatre edats diferents per a cada genotip, Wild Type (WT) i Caspasa3^{-/-} Caspasa7^{-/-} cardio-específic (DKO). Segons els experts, amb una única mostra per punt és suficient, però nosaltres per a fer-ho més consistent hem fet un pool de dues mostres per cada punt. L'extracció i quantificació de proteïna s'ha fet com s'explica en els punts 3.4.1.1 i 3.4.1.2, respectivament.

Resultats

1- Caracterització de l'expressió de les caspases executores en el cor.

1.1- Silenciament de les caspases durant el desenvolupament en el teixit cardíac.

Inicialment, per tal de conèixer els nivells d'expressió de les caspases durant els diferents estadis de desenvolupament cardíac hem analitzat mitjançant western blot l'expressió de les caspases 3, 6 i 7 en cors de rata de diferents edats. L' α -actina és el marcador de diferenciació dels cardiomiòcits utilitzat, que augmenta progressivament amb l'edat. Tal i com mostra la figura 29, l'expressió de les caspases cau durant la diferenciació dels cardiomiòcits, essent pràcticament nul·la a dia 90. Treballs anteriors del nostre grup demostren que a més de la repressió de les caspases, té lloc també una repressió de la majoria de gens apoptòtics [35, 103].

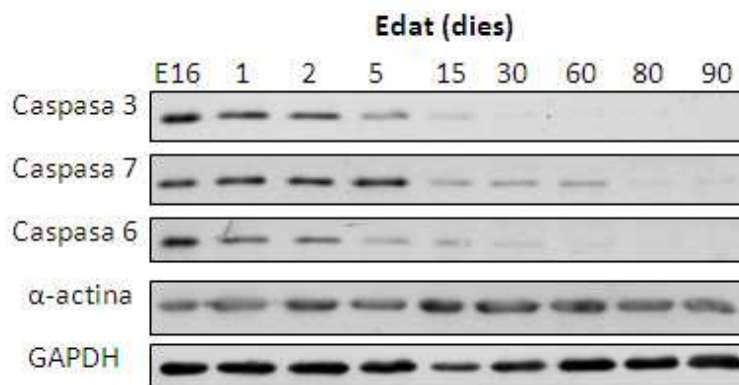


Figura 29: Silenciament de l'expressió de caspases *in vivo* durant la diferenciació dels cardiomiòcits. L'expressió de les caspases i d' α -actina s'ha detectat en cors embrionals de rata (E16) i en cors de rates de diferents edats.

1.2- La Caspasa 7 és citosòlica, mentre que la Caspasa 3 és citosòlica i també mitocondrial.

A més de voler estudiar l'expressió de les caspases segons l'estadi de desenvolupament cardíac, per tal de conèixer-les millor hem analitzat la seva localització subcel·lular. Donat que s'ha descrit que el detergent en el tampó d'extracció nuclear pot fer permeable la membrana nuclear alliberant algunes proteïnes nuclears al citoplasma [317], per a descartar que això pugui passar amb les caspases, en cas que siguin nuclears, hem provat un protocol d'extracció de nuclis que no inclou detergent i que permet obtenir la fracció nuclear de membrana o insoluble i

la fracció nuclear soluble, a més del protocol amb detergent que és el que utilitzem rutinàriament en el laboratori. Aquestes proves les hem portat a terme amb cèl·lules HEK293T, de les quals també hem extret citoplasma i mitocondris per a poder realitzar els controls pertinents (figura 30).

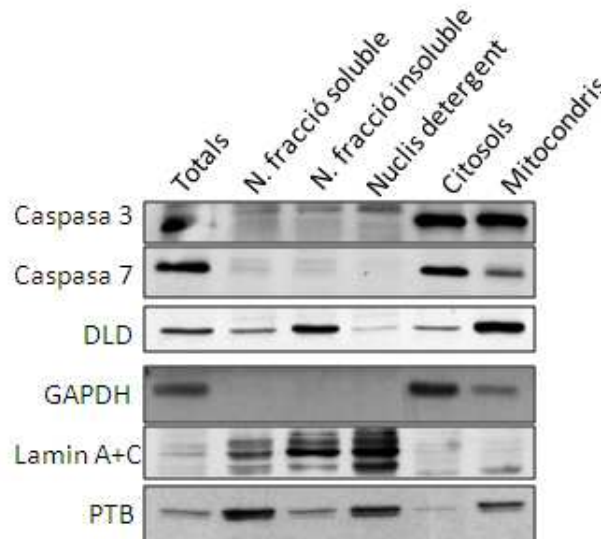


Figura 30: Localització subcel·lular de les caspases en cèl·lules HEK293T utilitzant diferents protocols per a l'extracció nuclear. Western blot amb extractes proteics de les fraccions subcel·lulars de cèl·lules HEK293T. Per a demostrar l'enriquiment en cadascuna de les parts cel·lulars hem fet western blot amb anticossos contra proteïnes presents específicament en cadascuna de les parts cel·lulars. DLD= marcador mitocondrial. GAPDH= marcador citosòlic. Lamin A+C= marcador membrana nuclear. PTB=marcador fracció nuclear soluble.

Els diferents controls indiquen que les diferents fraccions nuclears s'han obtingut correctament (figura 30), a més, els resultats indiquen que en les cèl·lules HEK293T les caspases 3 i 7 no estan presents ni en la fracció nuclear soluble, ni en la insoluble, ni tampoc en els nuclis extrets amb el tampó amb detergent.

Donat que el nostre model són els cardiomiòcits, hem analitzat la localització de les caspases en les nostres cèl·lules d'interès. La figura 31A mostra com en els cardiomiòcits embrionals de rata la Caspasa 7 té una localització principalment citosòlica, mentre que la Caspasa 3 presenta una localització citosòlica i també mitocondrial, essent pràcticament del 50-50%. Els resultats obtinguts coincideixen amb els dels estudis trobats a la literatura [322]. També hem analitzat l'expressió de les caspases en cardiomiòcits neonatals de rata (figura 31B) per tal de descartar que després del naixement a més d'una disminució en l'expressió de les caspases es

produís també un canvi en la seva localització dins la cèl·lula; no és així, en l'edat neonatal la Caspasa 7 també és sobretot citosòlica, essent la Caspasa 3 citosòlica i mitocondrial. Els westerns blots per Caspasa 3 de la figura 31 semblen indicar que hi ha una mica de Caspasa 3 en la fracció nuclear, però el fet que aparegui també una senyal dèbil de Dihidrolipoil Dehidrogenasa (DLD) en el nucli, tractant-se d'una proteïna mitocondrial, indica que en la purificació dels nuclis s'han arrossegat alguns mitocondris (possiblement units a la membrana nuclear), que són els responsables d'aquestes falses bandes dèbils en nucli. D'aquí la utilitat de realitzar els controls pertinents en el western blot per a comprovar el grau d'enriquiment i contaminació en cadascun dels extractes subcel·lulars.

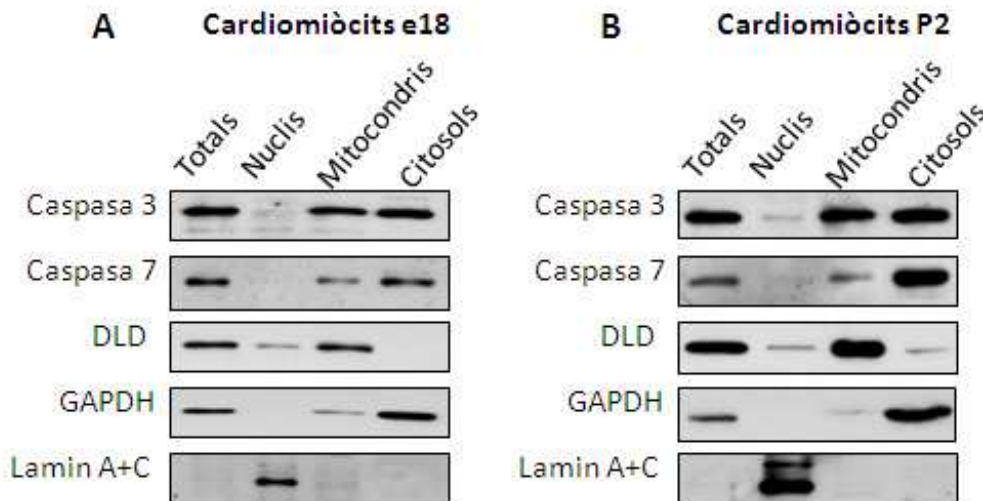


Figura 31: Localització subcel·lular de les caspases en els cardiomiòcits embrionals i neonatals.

Western blot amb extractes proteics de les diferents parts cel·lulars de cardiomiòcits embrionals **(A)** i neonatals **(B)** mostrant la localització de les caspases 3 i 7. Per a demostrar l'enriquiment en cadascuna de les parts cel·lulars hem fet western blot amb anticossos contra proteïnes presents específicament en cadascuna de les parts cel·lulars. DLD= marcador mitocondrial. GAPDH= marcador citosòlic. Lamin A+C= marcador nuclear.

En resum, aquests resultats indiquen que la Caspasa 7 és citosòlica, mentre que la Caspasa 3 és citosòlica i també mitocondrial.

2- Generació de ratolins Caspasa 3 i Caspasa 7 Doble *Knockout* específicament en el teixit cardíac.

Com s'ha explicat en el punt 1.2.3 de l'apartat de Materials i Mètodes, en el nostre laboratori hem generat ratolins deficients en Caspasa 3 i Caspasa 7 específicament en els cardiomiòcits ($Casp3^{-/-} Casp7^{-/-}$, DKO). Ho hem fet a partir del creuament de dues soques: la soca $Nkx2.5Cre$, cedida per Eric Olson, que porta l'expressió de Cre sota el promotor de $Nkx2.5$, un gen que s'expressa des del principi del desenvolupament només en els cardiomiòcits; i la soca Caspasa7 KO - Caspasa3 *Floxed*, cedida per Richard Flavell, on el fet de tenir la Caspasa3 floxejada fa possible l'obtenció de DKO específics de teixit segons el tipus de ratolí Cre amb el que es creuin, en el nostre cas la doble deleció només es produirà en els cardiomiòcits. La figura 32 mostra els tipus de creuaments que hem posat per a generar la soca.

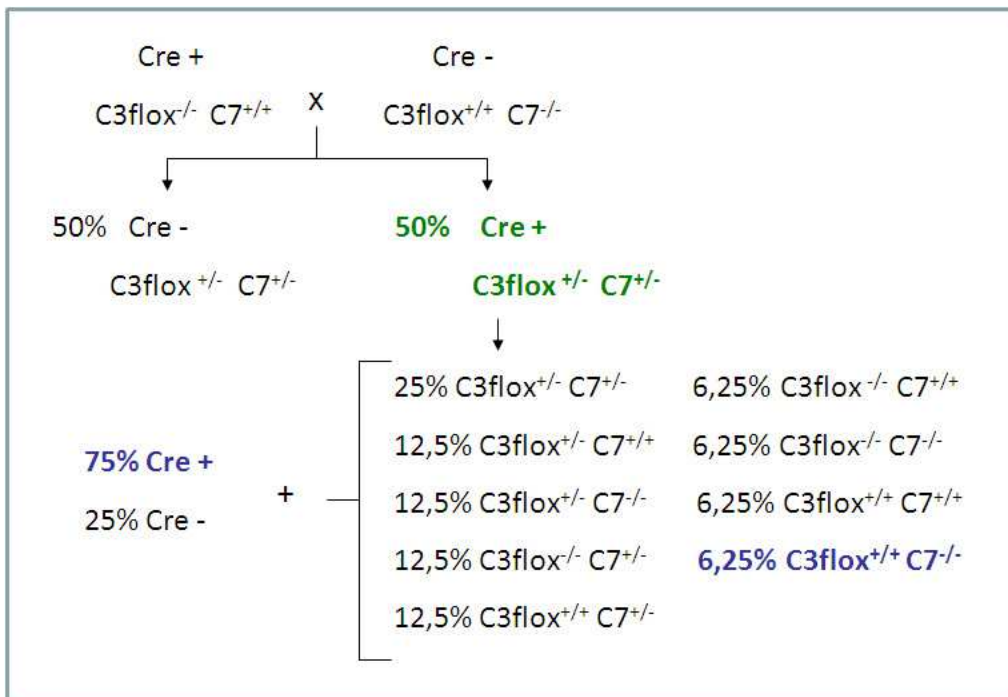


Figura 32: Creuaments necessaris per a l'obtenció de la soca DKO. Partim de la soca Cre+ *Wild type* (WT) per a les dues caspases i de la soca Caspasa7 KO-Caspasa3 Flox Cre-. Mitjançant aquests primers creuaments vam obtenir ratolins heterozigots per Caspasa3 i 7, el 50% dels quals eren Cre+ (verd). Finalment, amb el creuament d'aquests últims va ser possible començar a obtenir animals deficients en les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits (blau).

La proporció de ratolins Caspasa3^{-/-} Caspasa7^{-/-} que neixen és consistent amb les lleis mendelianes de l'herència. Les cries sobreviuen i no presenten problemes en el creixement, a més, tenen una aparença i desenvolupament normals i els òrgans no presenten alteracions en la morfologia. Aquest resultat és totalment contraposat al que presenten els ratolins Doble *Knockout* total per Caspasa3 i Caspasa7 [194], presents en proporcions mendelianes just abans de néixer, però amb una mort prematura durant els primers dies de vida. Aquests ratolins, a més, presenten un desenvolupament cardíac anormal amb una important dilatació de les aurícules i mala compactació de la musculatura ventricular (figura 15).

Per a poder identificar els animals els hem genotipat mitjançant PCR. El genotipatge de Caspasa 7 dóna el mateix patró de bandes tant si es fa a partir de DNA procedent de la cua com del cor (240bp WT i 310bp KO); per contra, el de Caspasa 3 varia, ja que amb el genotipatge amb DNA procedent de la cua només és possible veure la banda corresponent al gen floxejat, en canvi amb el DNA procedent del cor, a més de la banda del gen floxejat (proporcionada pels fibroblasts) es veu la banda corresponent a la deleció de Caspasa 3 en els cardiomiòcits (180bp WT, 230bp Floxejat i 320bp KO) (figura 33A). Tal com mostra la figura 29 les caspases se silencien amb el desenvolupament dels cardiomiòcits, per tant, per a poder verificar l'eliminació de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits dels animals DKO hem analitzat els cors d'animals neonatals, que encara expressen caspases. El nostre model és *Knockout* total per Caspasa 7, així doncs, les cèl·lules no-cardiomiòcits tampoc l'haurien d'expressar. La Caspasa 3, per contra, manca només en els cardiomiòcits, per tant, mitjançant l'estudi de cors totals no és possible veure una eliminació total de Caspasa 3, degut a la "contaminació" que proporcionen els fibroblasts i altres cèl·lules minoritàries. L'estudi per western blot (figura 33B) d'extractes totals cardíacs ens ha permès verificar que el nostre model no expressa Caspasa 7 en el cor, a més, hem pogut observar que tot i no estar del tot eliminada, la Caspasa 3 està força menys expressada en els DKO que en els *Wild type* (WT) de la mateixa camada, donat que només hi està present, principalment, en els fibroblasts. Per tal d'estar segurs que el nostre model és deficient en Caspasa3 en els cardiomiòcits hem realitzat una immunohistoquímica, figura 33C, que confirma que els cardiomiòcits no presenten Caspasa3, per tant, el nostre model és correcte.

Donat que la manca d'una caspasa podria compensar-se per la sobre-expressió d'una altra caspasa amb una funció similar, hem analitzat per western blot, figura 33B, si la manca de les caspases 3 i 7 suposa una sobre-expressió de l'altra caspasa executora, Caspasa 6, els resultats indiquen que això no és així, i que la manca de Caspasa 3 i Caspasa 7 no és compensada per la sobre-expressió de Caspasa 6.

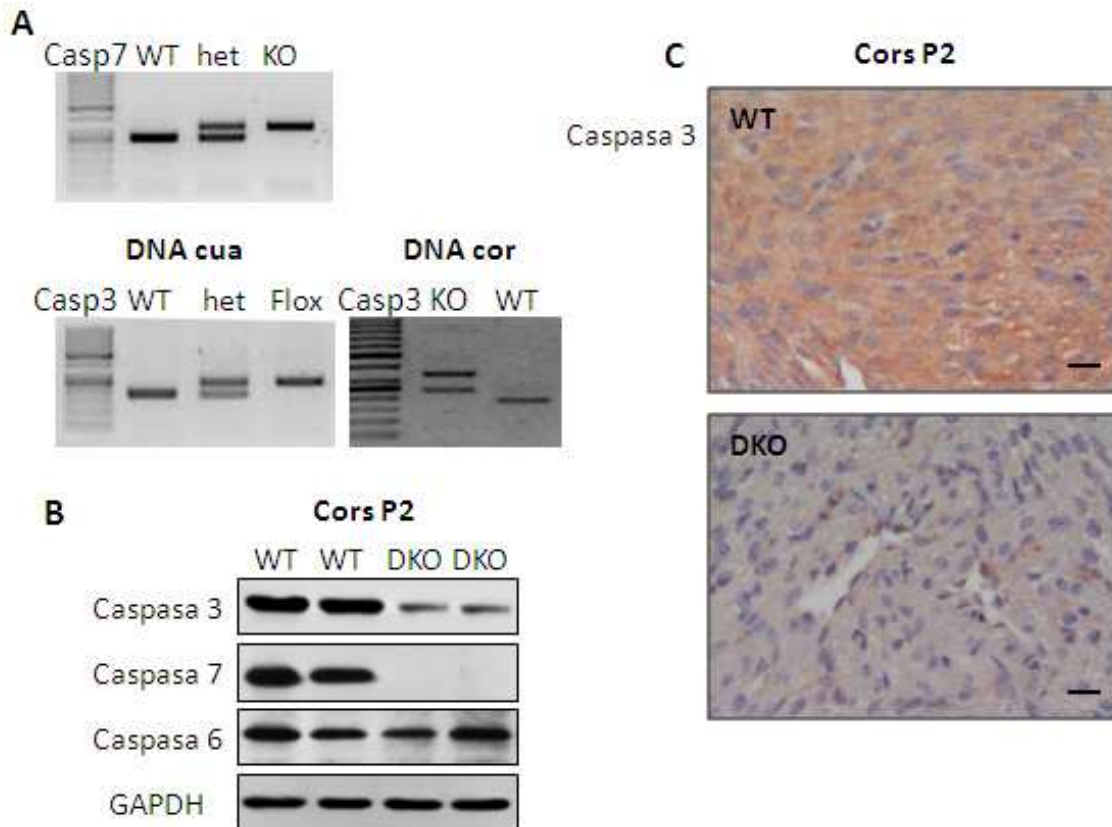


Figura 33: Els cardiomiòcits DKO no expressen ni Caspasa 3 ni Caspasa 7. A) Genotipatge dels animals per Caspasa 7 amb DNA de cua (igual resultat que el DNA de cor) i per Caspasa 3 amb DNA de cua i també de cor. Banda intensa del marcador=250bp. **B)** Abundància de caspases en extractes totals de proteïna de cors neonatals (P2= 2 dies) d'animals *Wild type* WT i Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} (DKO). **C)** Imatge de la immunohistoquímica de Caspasa 3 en cor neonatal WT i DKO. Escala:20µm.

3- Les caspases regulen PTB post-transcripcionalment en el cor.

PTB (polypyrimidine tract binding protein) és una proteïna coneguda per la seva funció en la regulació del *splicing* alternatiu [33] i, a més, participa en la traducció de proteïnes apoptòtiques durant la diferenciació dels cardiomiòcits [35], així doncs, PTB té una contribució important en el control post-transcripcional de l'expressió gènica durant la diferenciació muscular. Aquesta proteïna és silenciada perinatalment durant el desenvolupament cardíac, mantenint-se, però, els nivells de mRNA sense canvis significatius, suggerint una regulació post-transcripcional [36]. Aquesta regulació és dependent de les HDAC (Class II histone deacetylases), ja que l'estudi amb animals *Knock Out* (KO) per HDAC mostra com la manca de HDAC suposa una disminució de la proteïna de PTB però no del seu transcrit [36]. L'aparició d'una banda més baixa corresponent a una forma tallada de PTB en els KO de HDAC [36], coincident amb el tall que porten a terme les caspases en PTB [323], ens va indicar un possible rol de les caspases en la regulació post-transcripcional de PTB. Així doncs, si les caspases tenen un paper fisiològic en el tall de PTB *in vivo*, la manca de caspases hauria de resultar en un augment de l'abundància de PTB en el cor en desenvolupament. La figura 34A mostra com això és així, ja que els animals Doble *Knockout* per Caspasa 3 i Caspasa 7 en els cardiomiòcits que hem generat, tenen més proteïna PTB que els seus anàlegs *Wild type* (WT), mentre que l'abundància del transcrit es manté constant (figura 34B).

La reducció dels nivells de PTB durant el desenvolupament cardíac és responsable de nombrosos canvis en el *splicing* alternatiu, nosaltres estàvem interessats en la possibilitat que els factors de transcripció MEF2 poguessin ser una diana important d'aquesta regulació. Els transcrits de Mef2 poden contenir un exó alternatiu (β) que dona lloc a proteïnes MEF2 amb una activitat transcripcional més forta (figura 34C) [28], resultats del nostre grup demostren que durant el desenvolupament cardíac l'exó β és progressivament inclòs en els transcrits de Mef2a i Mef2d, a la vegada que els nivells de proteïna PTB disminueixen en el miocardi [36]. Per tant, PTB indueix el salt de la inclusió de l'exó β en Mef2a i Mef2d, potenciant la forma més embriònica. Donat que la manca de caspases suposa una abundància anormal de PTB, hem analitzat com afecta la manca de les caspases 3 i 7 específicament en el cor en la inclusió/exclusió de l'exó β en Mef2a i Mef2d. La figura

34D mostra com els animals DKO tenen una reducció en la inclusió de l'exó β , que dóna lloc a la forma madura de Mef2a i Mef2d, mentre que es produeix un augment en l'expressió de la forma embrionària dels gens Mef2, sense l'exó β .

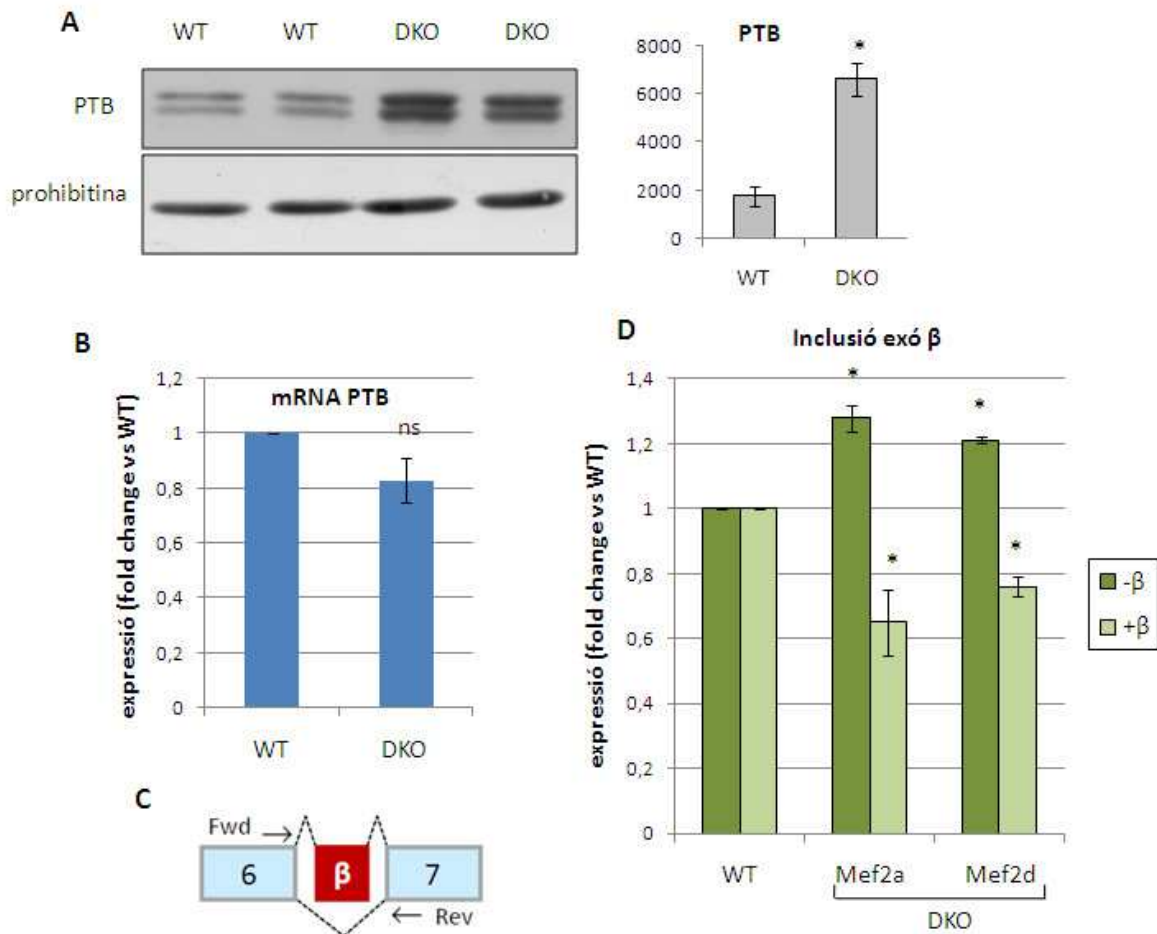


Figura 34: Implicació de les caspases en la regulació post-transcripcional de PTB. **A)** abundància de PTB en extractes totals de proteïna de cors de ratolins joves WT i ratolins deficients en caspasa 3 i 7 en els cardiomiòcits (DKO). Al panell de la dreta: anàlisi densitomètrica del western blot. * $P < 0.05$ vs. WT **B)** PCR en temps real del transcrit de PTB en els mateixos cors que A. $n = 3$. **C)** *Splicing* alternatiu dels gens Mef2, la inclusió de l'exó β s'ha analitzat amb primers flanquejant l'exó en qüestió. **D)** Anàlisi de la inclusió de l'exó β (- β : no inclòs; + β : inclòs) en els transcrits de Mef2 a partir d'extractes totals de RNA de cors d'1 mes WT i DKO. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs. WT.

4- Fenotip dels cors Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-}.

4.1- Els cardiomiòcits Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} proliferen menys que els *Wild-Type*.

Veient que els cors dels ratolins de la nostra soca Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} cardio-específica (DKO) no presenten el desenvolupament anormal dels cors dels animals amb la deleció total de caspasa 3 i 7 [194] i que, com hem dit, tenen una morfologia i desenvolupament normals, ens hem centrat en el seu estudi i en veure si presenten un fenotip i, en cas afirmatiu, en què consisteix.

El primer que hem fet és pesar els cors dels animals neonatals (entre 1-2 dies). Tal com mostra la figura 35A els cors DKO neonatals pesen un 25% menys que els cors WT de la mateixa camada, essent estadísticament significatiu ($P < 0,05$). A mesura que els animals es fan grans, però, aquestes diferències desapareixen i ja als 2-3 mesos d'edat els pesos dels cors DKO i WT no presenten diferències significatives (figura 35B).

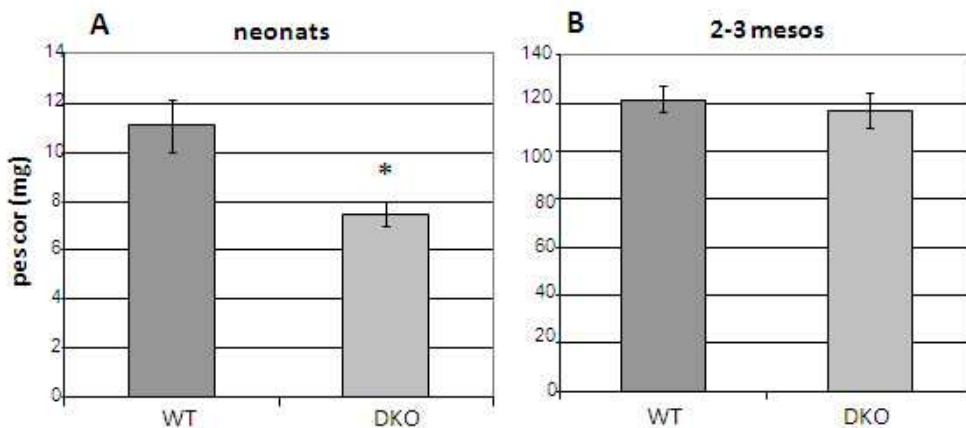


Figura 35: Els cors neonatals DKO pesen menys que els WT. **A)** pes dels cors Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} cardio-específics i cors *Wild type* neonatals. n=6.*P<0.05 vs WT **B)** pes dels mateixos cors que A però de 2-3 mesos d'edat. n=9.

Una possibilitat per a poder explicar aquesta disminució en el pes dels cors DKO és que tinguessin menys cèl·lules, en concret menys cardiomiòcits, que són els afectats per la doble mutació. Per a poder comptar les cèl·lules dels teixits hem optimitzat un protocol consistent en la disgregació del teixit per a poder aïllar les cèl·lules, diferenciar els cardiomiòcits de restes i altres cèl·lules i així poder contar-los (punt

2.3.2 de l'apartat de materials i mètodes). Els resultats indiquen que els cors neonatals DKO (1-2 dies) tenen aproximadament un 20% menys de cardiomiòcits que els WT (figura 36A), aquesta diferència es manté amb l'edat, els cors DKO de 7 mesos presenten també aproximadament un 20% menys de cardiomiòcits que els WT de la mateixa camada (figura 36A).

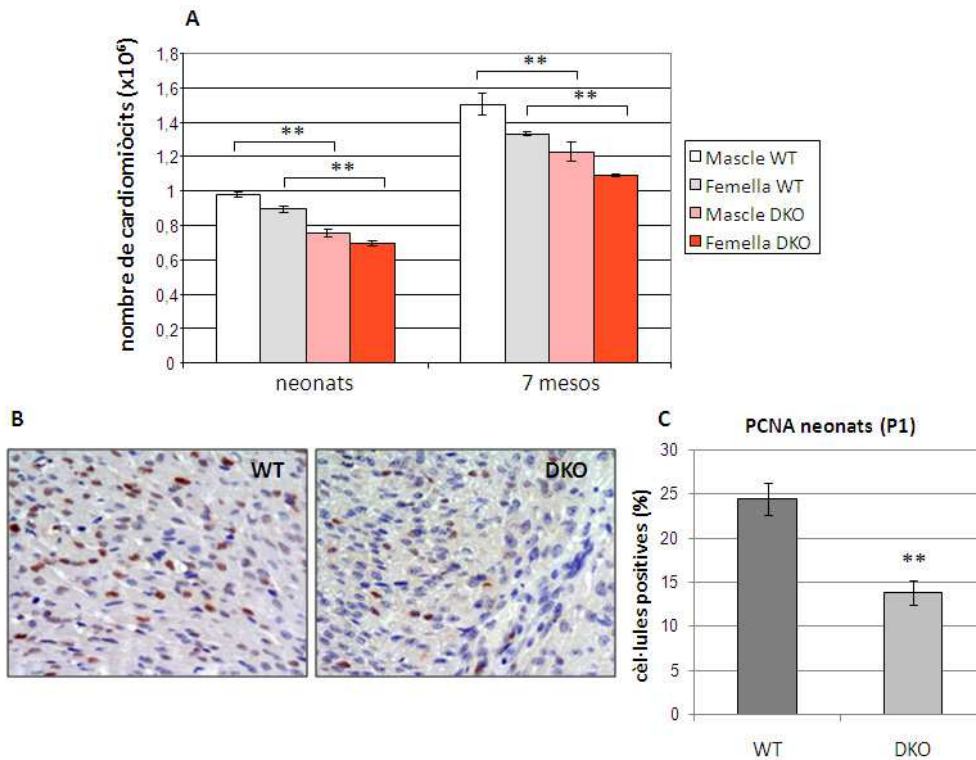


Figura 36: Els cardiomiòcits DKO proliferen menys que els WT. A) Recompte del nombre de cardiomiòcits en cors neonatals i cors adults DKO i WT. n=5. **P<0.01 vs WT. **B)** Imatge de la immunohistoquímica contra PCNA en cors P1 WT i DKO. **C)** % de cèl·lules PCNA-positives en cors neonatals WT i DKO. n=3. **p<0.01.

Aquests estudis de recomptes cel·lulars ens han permès, a més, obtenir altres resultats interessants, el primer és que tal i com es mostra a la figura 36A el nombre de cèl·lules no es manté constant entre els cors neonatals i els cors adults sinó que augmenta, indicant que tot i que després del naixement es produeix una sortida de cicle i una repressió de la maquinària de divisió cel·lular [9, 280], els cardiomiòcits mantenen una certa capacitat de proliferació després del naixement. L'altre resultat que hem extret d'aquests estudis és que comparant el nombre de cèl·lules que tenen els cors dels mascles i els cors de les femelles, independentment del genotip i l'edat, les femelles tenen entre un 8 i un 11% menys de cèl·lules que els mascles (figura 36A).

Per a confirmar que la manca de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits comporta un defecte en la proliferació hem fet una immunohistoquímica en cors neonatals (P1, que encara mantenen proliferació) contra PCNA (proliferating cell nuclear antigen), un dels marcadors de proliferació més comunament emprats (figura 36B). Els resultats indiquen que els cors DKO tenen un 50% menys de cèl·lules positives per PCNA (figura 36C), que es tradueix en una caiguda important de la proliferació, i corrobora el fet que els cors DKO siguin més petits perquè tenen menys cèl·lules que els WT.

4.2- Amb l'edat, els cardiomiòcits dels DKO desenvolupen una hipertròfia lleu.

Com hem mostrat al punt anterior, el fet que els cors neonatals DKO pesin menys s'explica pel fet que els cors neonatals DKO tenen menys cèl·lules que els WT. Per contra, els DKO adults també tenen menys cèl·lules però no pesen menys que els WT, ens falta, doncs, la peça que expliqui què passa amb els cors DKO joves i adults que fa que tenint menys cèl·lules pesin el mateix que els WT: la mida de les cèl·lules. Mitjançant la tinció per WGA (figura 37D), que marca la membrana de les cèl·lules, hem mesurat l'àrea dels cardiomiòcits de cors neonatals (2-3 dies), joves (2-3 mesos) i adults (7 mesos). En els neonatals degut al fet que no tenen una matriu extracel·lular ben formada, hem tingut certa dificultat per obtenir seccions de teixit homogèniament ben tenyides, i per això no hem distingit entre ventricle esquerre i septa a l'hora de fer les mesures. Pels animals joves i adults sí que hem distingit entre les cèl·lules del septa i les del ventricle esquerre. Els cardiomiòcits dels cors neonatals DKO no presenten diferències en la mida respecte els WT (figura 37A i D). En els animals joves, les cèl·lules del septa DKO són un 30% més grans que les seves anàlogues WT, mentre que les cèl·lules del ventricle esquerre no presenten diferències segons el genotip (figura 37B i D). En els animals adults es manté la diferència del 30% d'increment en la mida de les cèl·lules DKO del septa i, a diferència dels animals joves, les cèl·lules DKO del ventricle esquerre dels animals adults són també un 15% més grans que les WT de la mateixa zona (figura 37C i D). Aquests resultats semblen indicar que els animals DKO intenten compensar el fet de tenir menys cardiomiòcits tot augmentant-ne la mida, comencen amb els cardiomiòcits del septa (encarregat de donar força i suport al cor) i amb l'edat ja tenen també més grans els ventriculars. Es produeix una mena

d'hipertròfia compensatòria, que permet als cors DKO funcionar amb normalitat i compensar el fet de tenir menys cèl·lules. Pel que fa al sexe, sembla no haver-hi diferències entre la mida dels cardiomiòcits dels mascles i de les femelles.

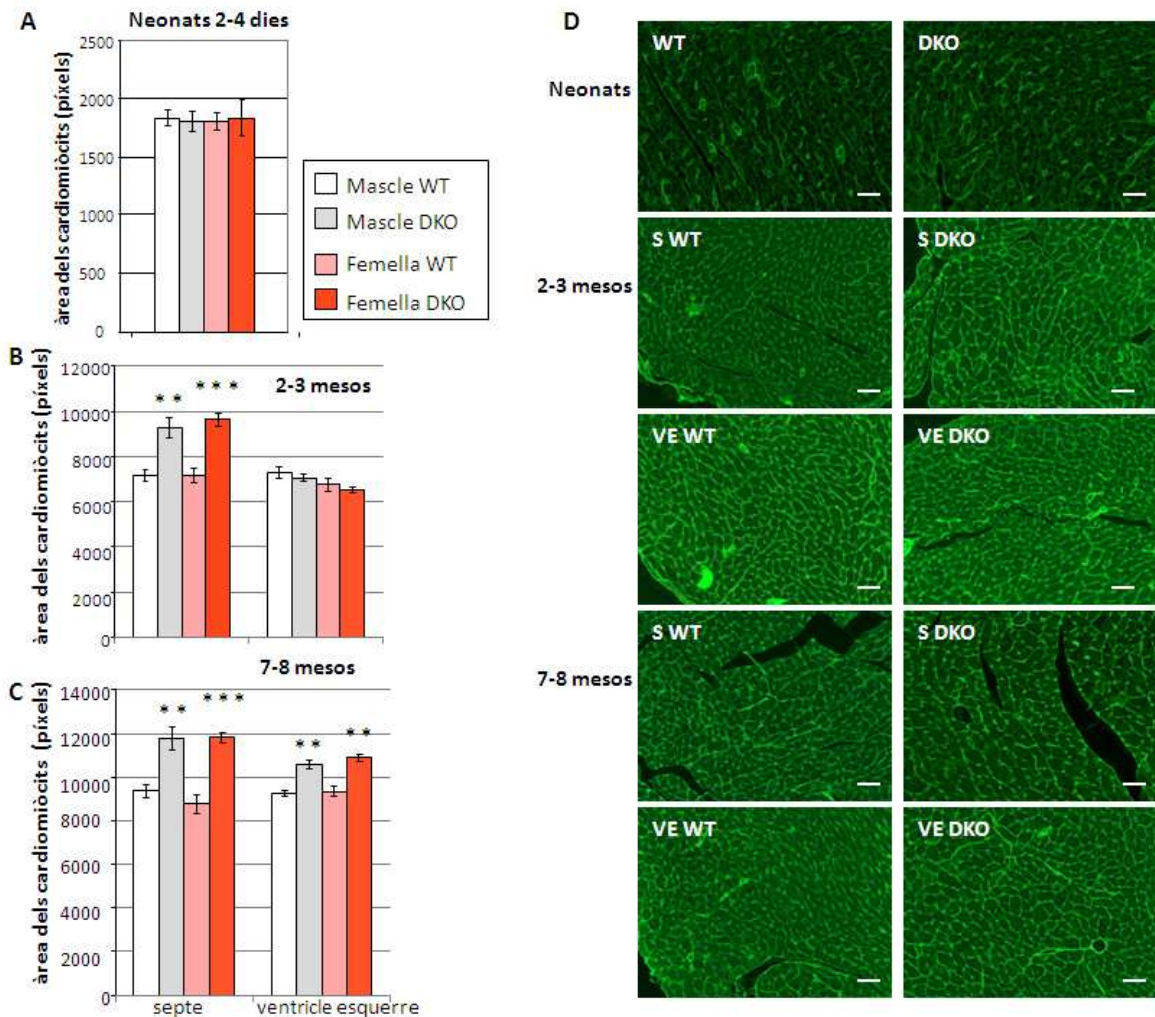


Figura 37: Els cardiomiòcits DKO són més grans que els WT. A) Àrea dels cardiomiòcits en animals neonatals. n=6 **B)** Àrea dels cardiomiòcits del septe i ventricle esquerre d'animals joves de 2-3 mesos. n=6 **C)** Àrea dels cardiomiòcits del septe i ventricle esquerre d'animals de 7-8 mesos. n=6. **P<0.01; ***P<0.001 vs WT. **D)** Imatges de les tincions WGA dels cors neonatals, joves i adults, WT i DKO, en septe (S) i ventricle esquerre (VE). Escala neonatals=20µm. Escala joves i adults=50 µm.

4.3- Tot i la hipertròfia que desenvolupen, els animals Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} adults no presenten alteracions en la funció cardíaca ni responen de manera diferent a l'estrès.

Veient que els animals Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} adults desenvolupen una hipertròfia lleu en resposta a la deficiència en el nombre de cèl·lules, hem fet un estudi

ecocardiogràfic d'aquests animals per a comprovar com els afecta, si ho fa, en la funció cardíaca i si tenen alteracions importants en algun paràmetre (taula 5).

Paràmetres ecocardiogràfics			
	WT (n=14)	DKO (n=13)	
PES (g)	27,7571 ± 1,1611	27,0692 ± 1,0517	p=0,666
S (mm/g)	0,0338 ± 0,0016	0,0347 ± 0,0018	p=0,732
PP (mm/g)	0,0277 ± 0,0011	0,0271 ± 0,0013	p=0,724
DTD (mm/g)	0,1479 ± 0,0050	0,1589 ± 0,0068	p=0,200
DTS (mm/g)	0,1027 ± 0,0035	0,1132 ± 0,0049	p=0,084
FE (%)	64,1846 ± 1,4586	61,9103 ± 1,5800	p=0,300
FA (%)	30,3571 ± 1,0246	28,7181 ± 1,0576	p=0,276
FC (bpm)	424 ± 9	372 ± 28	p=0,103

Taula 5: Paràmetres ecocardiogràfics de ratolins adults WT i DKO. S: gruixària del septe intra-ventricular en sistole, PP=gruixària de la paret posterior del ventricle esquerre en diàstole, DTD:diàmetre telediastòlic del ventricle esquerre, DTS:diàmetre telesistòlic del ventricle esquerre, FE:fracció d'ejecció, FA:fracció d'escurçament, FC:freqüència cardíaca (bpm=beats per minute).

La taula 5 mostra com els animals DKO adults (5 mesos) no presenten diferències significatives en els paràmetres ecocardiogràfics mesurats, en el pes (com ja hem dit abans) i tampoc en la gruixària del septe (S), on l'inferior nombre de cèl·lules es troba compensat per un augment en la seva mida. La freqüència cardíaca (FC) és el paràmetre que es troba més afectat en els DKO, tot i no arribar a ser estadísticament significatiu (P=0,1), aquesta menor freqüència cardíaca pot indicar que aquests animals, tot i ser capaços de portar a terme la funció cardíaca de manera normal gràcies a haver desenvolupat hipertròfia en les seves cèl·lules, o bé degut a aquesta hipertròfia que han desenvolupat, han de fer un sobre-esforç i la funció cardíaca se'n veu una mica afectada, però, com hem dit, això només és una tendència, ja que les diferències no són significatives.

L'isoproterenol (ISO) és un agonista de receptor β -adrenèrgic; causa una remodelació cardíaca en resposta a l'estimulació β -adrenèrgica, indueix hipertròfia i vasodilatació. Per tal de saber si la hipertròfia que causa aquesta estimulació s'accentua degut a la manca de les caspases 3 i 7 (que ja per sí mateixa en animals adults produeix hipertròfia), hem fet un estudi administrant ISO a ratolins adults (5 mesos) durant 7 dies utilitzant mini-bombes osmòtiques amb una proporció de 8,8mg/kg/dia [30], als animals control se'ls ha administrat només salí.

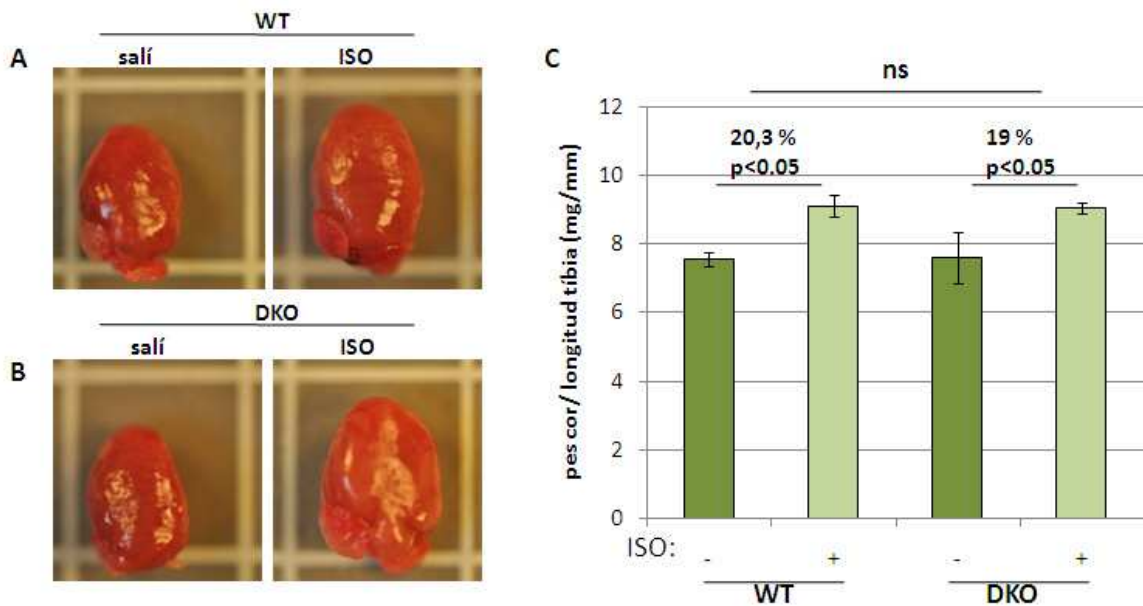


Figura 38: L'estimulació β -adrenèrgica per isoproterenol produeix el mateix grau d'hipertròfia en WT i DKO. **A-B)** cors WT (A) i Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} (DKO) (B) tractats amb vehicle salí o ISO (8,8mg/kg/dia) durant 7 dies. **C)** els cors WT i DKO han estat crònicament infosos amb salí (-) o ISO (+) i sacrificats al cap de 7 dies per a mesurar la hipertròfia assolida, expressat en forma de Pes cor/Longitud tibia. n=6; ns=no significatiu.

L'estudi ha funcionat (figura 38A-B), ja que l'increment del ràtio pes cor/longitud tibia (PC/LT) assolit es correspon al trobat a la literatura, aproximadament un 20% [30]. Comparant els ràtios PC/LT dels cors WT i DKO podem observar com no hi ha diferències significatives (figura 38C), suggerint que la manca de les caspases 3 i 7 no suposa cap diferència a la resposta a aquest tipus d'estrès i que les caspases 3 i 7 no actuen en vies de senyalització activades per una estimulació β -adrenèrgica.

4.3.1- Les caspases no estan implicades en la mort dels cardiomiòcits durant l'oclusió coronària.

Amb l'objectiu de saber com responen els animals DKO a un procés d'isquèmia-reperfusió (I/R) i de retruc, comprovar si les caspases executores estan implicades en la mort dels cardiomiòcits adults deguda a processos isquèmics, hem realitzat en col·laboració amb el grup de Cardiologia Experimental del VHIR un estudi d' I/R en animals WT i DKO adults (5 mesos). Aquests animals s'han sotmès a un procés d'isquèmia *in situ* de 45min seguit d'una reperfusió miocardiaca de 24h o 28 dies, efectuats mitjançant oclusió quirúrgica de l'artèria coronària descendent anterior esquerra. La reperfusió de 24h permet determinar l'àrea de l'infart (AI) en relació a l'àrea de risc (AR), que és l'àrea per sota de la sutura. La reperfusió de 28 dies permet establir l'àrea infartada mitjançant la consolidació de la cicatriu i estudiar el possible remodelat advers del ventricle esquerre, quan es desenvolupa un procés isquèmic el remodelat ventricular que el segueix provoca un estrenyiment de la paret ventricular (figura 39C) i un deteriorament de la funció ventricular. Per a estudiar la cicatriu s'utilitza la tinció de Pricosirius Red (PR) [324] que tenyeix les fibres de col·lagen de color vermell, indicant on ha tingut lloc el remodelat després de la isquèmia, en un fons groc clar.

En tots dos genotips la zona de risc en proporció a la mida del ventricle esquerre és manté (figura 39A), indicant que els processos isquèmics s'han realitzat correctament i de la mateixa manera en els dos grup d'estudi. Un cop analitzada la zona infartada després de la reperfusió de 24h hem vist que la manca de caspases no modifica l'àrea de l'infart (AI) ($40 \pm 5,1\%$ en els WT vs. $36,2 \pm 3,6\%$ en els DKO) (figura 39B). Mitjançant l'estudi de la tinció PR després de 28 dies de reperfusió, l'àrea en fibrosi també és la mateixa en els animals WT i DKO ($41,1 \pm 5,4\%$ en els WT vs. $44,6 \pm 8,7\%$ en els DKO) (figura 39C-D); tampoc hi ha diferències significatives entre WT i DKO pel que fa al grau de disfunció cardíaca i dilatació ventricular, totes dues severes en els dos grups de ratolins.

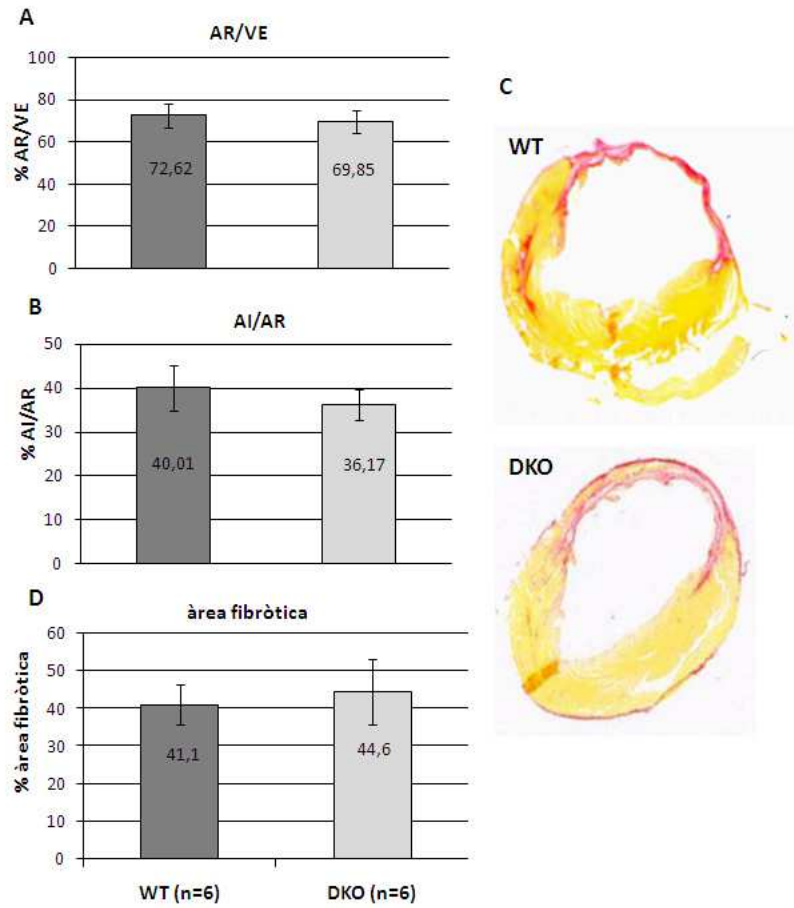


Figura 39: Els animals DKO presenten el mateix grau d'infart que els WT després d'un procés d'isquèmia-reperfusió. A) % d'àrea de risc (AR) respecte el ventricle esquerre (VE). **B)** % d'àrea d'infart (AI) respecte AR. **C)** Imatge representativa de la tinció amb Picosirius Red. En vermell les fibres de col·lagen que formen la cicatriu en la zona de l'infart. **D)** % d'àrea fibròtica en la zona de l'infart. En A, B, C i D: cors adults WT i DKO, n=6.

Aquests resultats indiquen d'una banda que els animals Caspasa 3^{-/-} Caspasa7^{-/-} responen de la mateixa manera que els animals WT als processos d'isquèmia, tenen la mateixa mida d'infart i d'àrea fibròtica, indicant que la hipertròfia compensatòria que pateixen no els fa més susceptibles a aquest tipus d'estrès per isquèmia. D'altra banda, aquests resultats confirmen d'una manera directa que l'activació de les caspases 3 i 7 no està involucrada en la mort dels cardiomiòcits durant l'oclusió coronària aguda, indicant que en el cor adult la mort cel·lular es produeix per la via independent de caspases, tal i com alguns estudis ja havien indicat [103, 104], i com ja suggereix el silenciament de les caspases que es produeix durant la diferenciació dels cardiomiòcits (figura 29).

Donat que les caspases en el cor adult estan silenciades, els animals adults WT i DKO es podrien considerar tots dos *Knock-out* per caspases, així doncs, el fenotip que observem en els DKO es deu a la funció que tenen les caspases quan encara estan presents (estadis embrionals i neonatals); això podria explicar per què no observem diferències en la resposta a les diferents fonts d'estrès que hem utilitzat en animals adults. Creiem doncs, que per tal d'esbrinar la funció de les caspases 3 i 7 més enllà de la seva funció apoptòtica i que dona lloc a aquest fenotip, cal estudiar els cors en estadis més joves i neonatals.

5- La comparació transcriptòmica dels cors WT i DKO revela canvis importants en l'expressió de gens implicats en el cicle cel·lular i en el desenvolupament.

Per tal de conèixer com afecta genèticament la manca de les caspases efectores 3 i 7 en el cor i poder estudiar la base molecular que explica el fenotip trobat en aquests cors, hem portat a terme un estudi transcriptòmic amb micro-arrays en col·laboració amb la Unitat d'Alta Tecnologia (UAT) de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebron (VHIR). En l'estudi hem treballat amb quatre grups, cadascun amb una n=6: WT neonatals (1-2 dies) – WT joves (1 mes) – DKO neonatals – DKO joves. Un cop executat, hem realitzat diverses comparacions estadístiques segons l'efecte del temps (neonatal vs jove), l'efecte del genotip (WT vs DKO) i la interacció entre temps i genotip. La figura 40 mostra els resultats més significatius de l'estudi, representats en funció dels gens més diferentment expressats entre WT i DKO segons l'edat (figura 40A) i agrupant els gens en famílies (figura 40B).

Els resultats mostren com en l'edat neonatal els cors DKO tenen en general menys expressats els gens de progressió de cicle cel·lular, d'entre els que destaquen per exemple *Pold1* (DNA polymerase δ catalytic subunit), *Cdc6* (cell division cycle 6), *PCNA* i *Ccne* o *CycE* (Ciclina E). A més de les diferències en l'expressió dels gens de cicle, els DKO neonatals tenen també menys expressat el gen *Slc2a4* (solute carrier family 2) o *Glut4* (glucose transporter 4), la funció principal del qual és el transport de glucosa, però que s'ha trobat, a més, implicat en la hipertròfia cardíaca [325]. *Hif3 α*

(hypoxia-inducible factor 3 α), per contra, es troba sobre-expressat en els DKO, aquest gen s'indueix en resposta a la hipòxia però també en resposta a la hipoglucèmia [326].

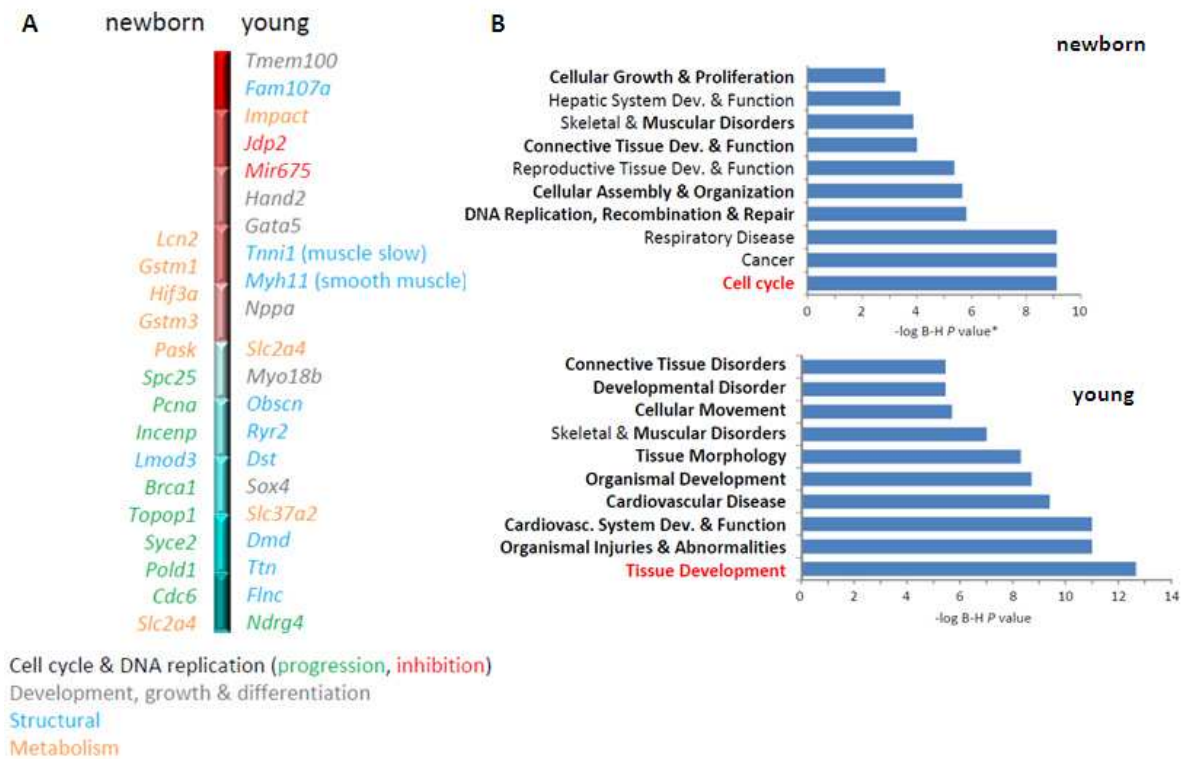


Figura 40: Principals gens i famílies gèniques amb diferències significatives entre WT i DKO. A) Gens amb més diferència significativa entre WT i DKO, expressat en funció del *fold-change* i el nivell estadístic. A la barra del mig: blau=sota-expressió, vermell=sobre-expressió en DKO. **B)** principals famílies de gens afectades en el DKO comparat amb el WT, en vermell la més afectada. S'ha utilitzat la plataforma online Ingenuity Systems® (punt 3.3 de Materials i Mètodes).

Pel que fa als animals joves, els DKO presenten sobretot una alteració en els gens implicats en el desenvolupament i morfologia del teixit cardíac, per exemple tenen menys expressats gens estructurals que formen part dels sarcòmers i que, per tant, són necessaris per a la funció contràctil del cor, com la Ttn (titina), Dmd (distrofina), Fln (Filamin C), Obscn (obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF) i sobre-expressats alguns gens estructurals típics de múscul llis, com la Myh11 (Myosin Heavy Chain 11), de diferenciació endotelial, Tmem100 (transmembrane protein 100), o gens no musculars com la Myl9 (myosin light chain 9). A més, Ndr4 (N-myc downstream-regulated gene 4), un gen necessari per a la proliferació dels miòcits [327], es troba importantment sota-regulat en els DKO. Altres

gens que es troben sobre-expressats en els DKO joves són els inhibidors de cicle cel·lular, d'entre els que destaca Fam107a (family with sequence similarity 107 member); també es troba sobre-expressat en els DKO el marcador d'hipertròfia Nppa (atrial natriuretic peptide precursor) [328], en concordança amb el fenotip d'hipertròfia lleu compensatòria que observem en els animals DKO.

La figura 41 agrupa d'una manera molt visual els resultats dels arrays exposats anteriorment, ja que mostra en un mateix gràfic la tendència de l'expressió dels gens de les diferents famílies tot comparant els valors dels cors neonatals i joves dels dos genotips. Així doncs, mostra com els gens de progressió del cicle cel·lular i els gens implicats en la replicació, recombinació i reparació del DNA estan menys expressats en els cors neonatals DKO que en els WT, sense haver-hi canvis molt importants en els cors joves; per contra, els gens d'inhibició de cicle cel·lular estan força més expressats en els DKO joves. Els gens dels sarcòmers i dels costàmers estan menys expressats en els cors joves DKO quan es comparen amb els WT, mantenint-se constants els valors dels animals neonatals, en concordança amb els canvis estructurals adaptatius a que es veu sotmès el cor DKO a mesura que es va fent adult. Finalment, l'expressió dels gens implicats en el desenvolupament i la diferenciació no segueix en tots la mateixa tendència, indicant una alteració global del desenvolupament en els animals DKO però sense un patró concret en els canvis d'expressió gènica. Una mostra de l'alteració en el desenvolupament és el fet que per exemple Gata5 i Hand2, gens implicats en el correcte desenvolupament cardíac i l'expressió dels quals és important durant els estadis embrionals, es troben sobre-expressats en els cors joves DKO, edat en la que el cor ja està totalment desenvolupat.

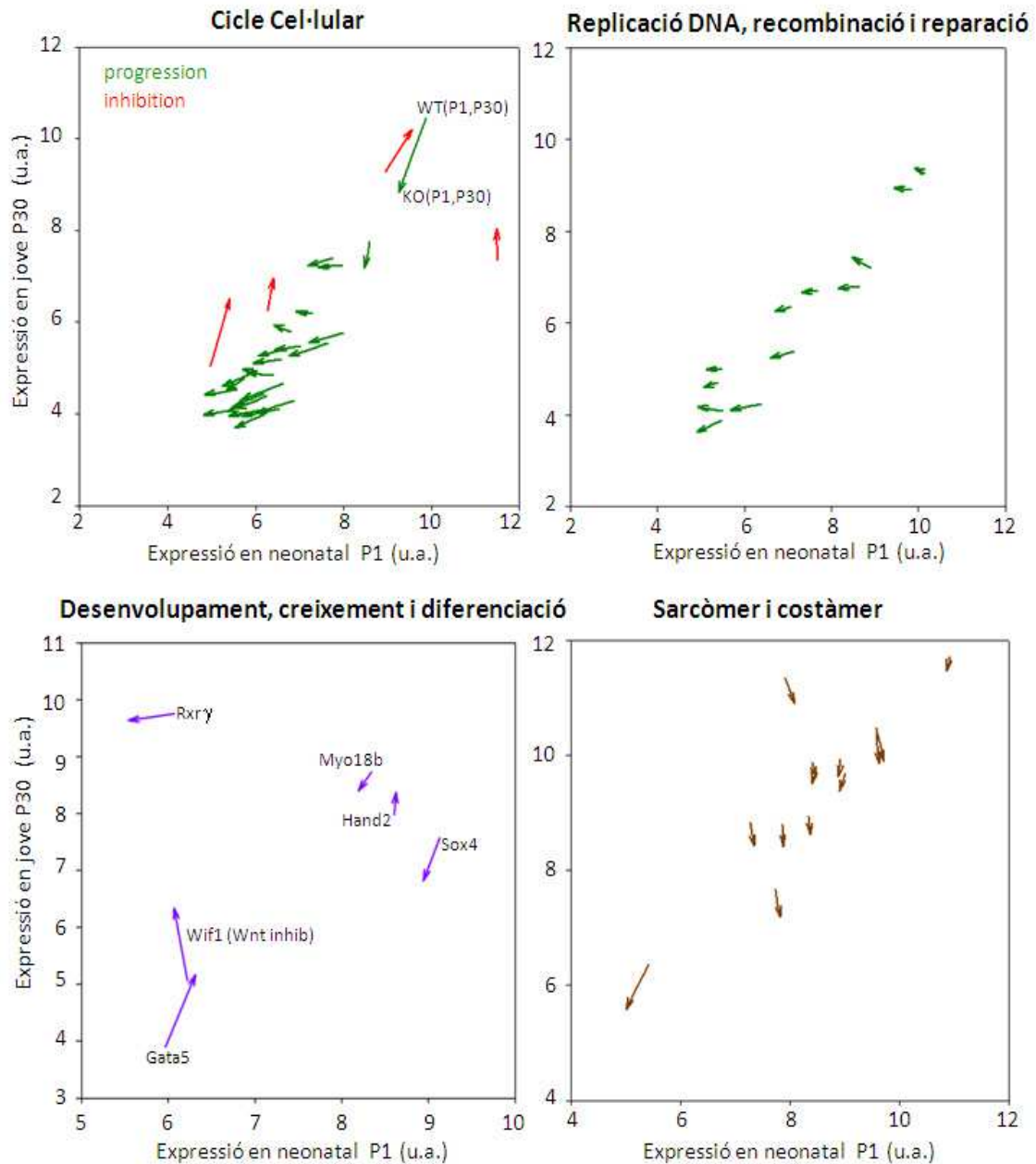


Figura 41: Tendència dels canvis en l'expressió gènica dels cors neonatals i joves. Selecció dels gens de l'array amb canvis més estadísticament significatius, on cada fletxa uneix el valor d'expressió gènica de l'animal WT amb el del DKO (com es mostra en el gràfic de dalt a l'esquerra). Les fletxes apuntant cap a l'esquerra indiquen una expressió més baixa en els neonatals DKO amb una expressió similar en els animals joves. Les fletxes apuntant cap a baix indiquen una expressió més baixa en el jove DKO amb una expressió semblant en neonatals. Les fletxes que apunten cap a dalt indiquen valors més alts en els DKO joves. u.a= unitats arbitràries.

Per tal de corroborar els resultats obtinguts en l'estudi i veure més clarament fins a quin punt hi ha diferència en l'expressió d'aquests gens hem analitzat mitjançant Real Time l'expressió d'alguns dels principals gens significativament diferents en

l'estudi. Els anàlisis de la Real Time els hem fet també en cors neonatals i cors joves de 1 mes, i hem utilitzat entre 6 i 9 cors per a cada grup. Els resultats es mostren a la figura 42.

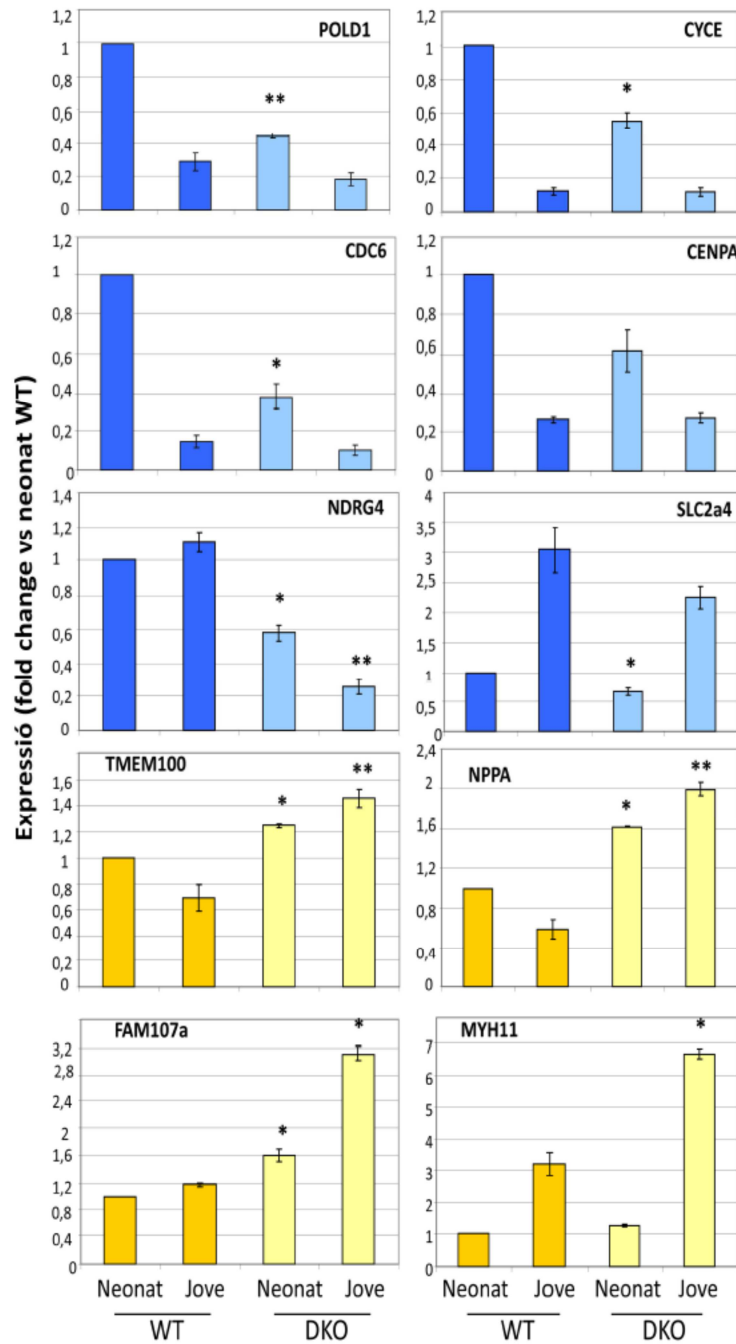


Figura 42: Real time dels principals gens diferentment expressats en els DKO identificats en l'estudi transcriptòmic. En blau es mostren els gens sota-expressats i en groc els que estan sobre-expressats en els DKO, tot comparant-ho amb els WT de la mateixa edat. n=6-9, *P<0.05; **P<0.01 vs WT.

Els resultats de les Real Time confirmen els resultats de l'estudi transcriptòmic. En resum, les figures 40, 41 i 42 ens indiquen que els animals neonatals DKO tenen menys expressió dels gens implicats en la progressió del cicle cel·lular, que podria explicar la insuficient proliferació dels cardiomiòcits amb la consegüent generació d'un cor amb menys cèl·lules, com els DKO. Pel que fa als animals DKO joves, presenten alteracions en els gens estructurals i de desenvolupament, possiblement per tal d'adaptar-se i en resposta a la dificultat que li suposa al cor DKO formar-se i funcionar partint de menys cèl·lules; aquests animals també presenten una sobre-expressió dels gens que aturen el cicle cel·lular, en línia, també, amb l'inferior nombre de cèl·lules que presenten els cors DKO.

Com s'ha explicat a la introducció, els factors de transcripció de la família Mef2 estan fortament implicats en el correcte desenvolupament cardíac [25], a més, donat que en el nostre grup s'ha treballat bastant amb aquests gens hem trobat interessant veure si hi ha canvis en els seus nivells d'expressió entre WT i DKO. Hem analitzat mitjançant Real Time l'expressió de Mef2a i Mef2d, els factors de la família Mef2 importants per a la biologia postnatal del cor [29, 30]. Els resultats es mostren a la figura 43 i es veu com tot i que els DKO joves expressen una mica menys de Mef2a i Mef2d que els WT, les diferències no són significatives. Per tant, la manca de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits no afecta l'expressió dels factors transcripcionals Mef2.

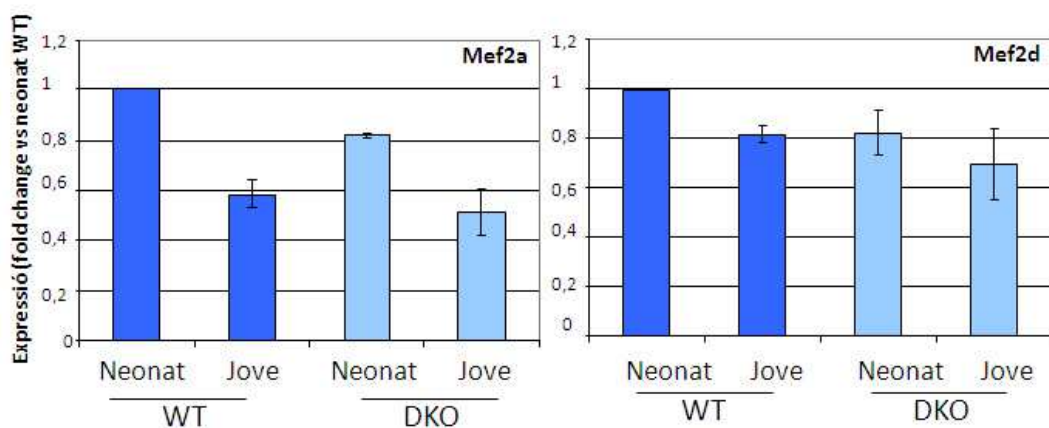


Figura 43: L'expressió de Mef2a i Mef2d no varia entre els cors WT i DKO. Real time de Mef2a i Mef2d en cors neonatals i joves (1 mes) WT i DKO. n=6.

La Myh11 és la miosina característica de múscul llis, mentre que la Myh6 és la miosina més típica de múscul cardíac. Donat que els DKO tenen uns nivells força més elevats de Mhy11 que els WT, hem analitzat per Real time els nivells d'expressió de Myh6 per tal de comprovar si aquest augment en l'expressió de Myh11 es produeix en detriment de l'expressió de Myh6. La figura 44A mostra com la Myh6 s'expressa de la mateixa manera en els cors WT i DKO, per tant, l'augment en l'expressió de Myh11 es produeix independentment de Myh6. Per tal de conèixer si la Myh11 en el cor la proporcionen o no els cardiomiòcits i si, per tant, les diferències que veiem es deuen a que realment els cardiomiòcits DKO n'expressen més i no a que en aquests cors hi hagi per exemple més fibroblasts, hem analitzat mitjançant real time l'expressió de les dues miosines en cor total, cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs (figura 44B). Els resultats mostren com tant els nivells de Myh6 com els de Myh11 en el cor els determinen sobretot els cardiomiòcits i, per tant, l'augment en la Myh11 que presenten els DKO es deu a un augment en l'expressió d'aquesta miosina per part dels cardiomiòcits Caspasa3^{-/-} Caspasa 7^{-/-}.

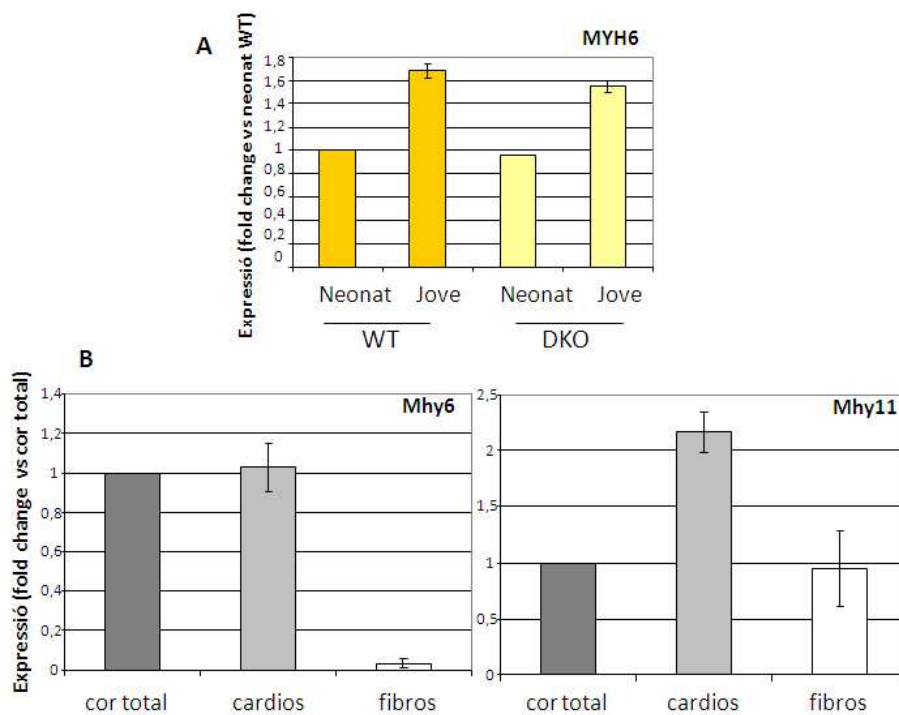


Figura 44: L'expressió de Mhy6 es manté en els cors DKO. Els nivells de Myh11 i Myh6 en el cor els proporcionen els cardiomiòcits. A) Real Time de Myh6 en cors WT i DKO neonatals i joves. n=6. B) Real Time de Myh11 i Myh6 en cor total, cardiomiòcits i fibroblasts cardíacs neonatals de rata. n=3.

Tant la Caspasa 3 com la Caspasa 7 són caspases executores i per tant participen de manera similar en la inducció de l'apoptosi. Tot i això, i donat que la Caspasa 3 és mitocondrial a més de citosòlica (figura 31) i podrien tenir diferents funcions no apoptòtiques, no sabem si totes dues participen de la mateixa manera o bé si una és dispensable a l'hora de provocar els canvis en l'expressió gènica que hem observat en el nostre model. Per a verificar-ho, hem analitzat mitjançant real time l'expressió de tres gens de cicle força sota-expressats en els animals neonatals deficientes en les dues caspases (Pold1, CycE i Cdc6), en cors neonatals Caspasa 3^{-/-} i cors neonatals Caspasa 7^{-/-} (figura 45).

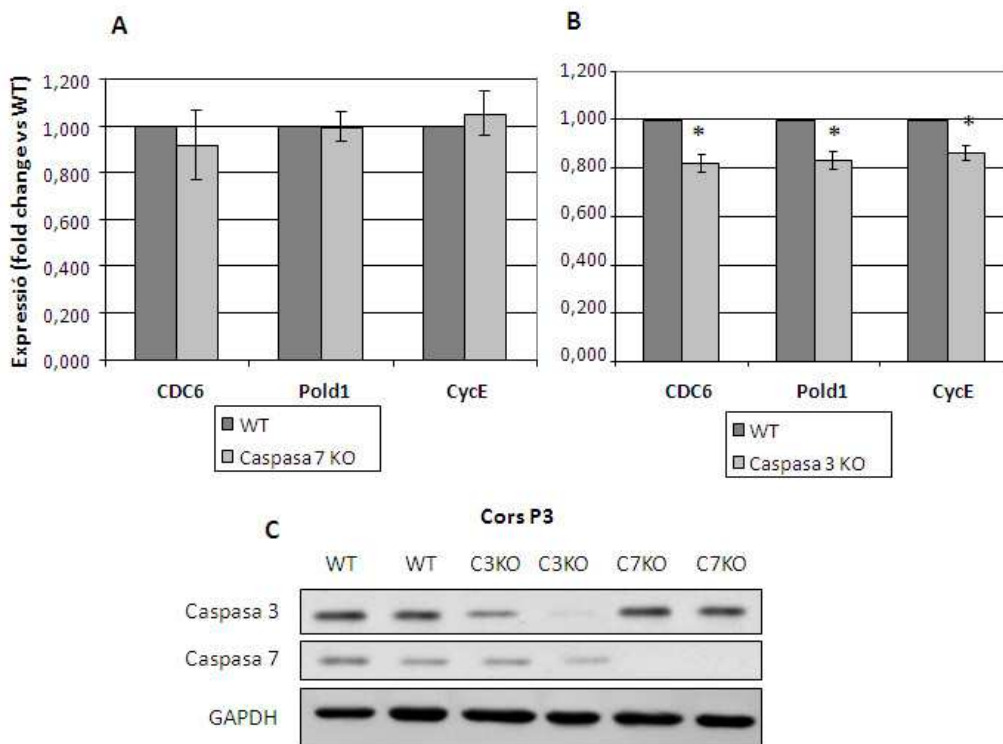


Figura 45: La manca de Caspasa 3 provoca una disminució en l'expressió dels gens de cicle, però inferior a la que provoca la manca de totes dues caspases. A) Real Time de cors neonatals WT i cors neonatals Caspasa 7 KO. n=3. **B)** Real time de cors neonatals WT i cors neonatals Caspasa 3 KO n=3. *P<0.05 vs WT. **C)** western blot d'extractes totals de cors neonatals WT, Caspasa 3 KO i Caspasa 7 KO.

La manca de només Caspasa 7 no provoca alteracions en l'expressió dels gens de cicle (figura 45A), sembla, doncs, que Caspasa 3 pot compensar la seva absència tot i no trobar-se sobre-expressada (figura 45C). Els animals KO per Caspasa 3, en canvi, tenen entre un 13 i un 18% menys d'expressió d'aquests gens (figura 45B). Aquests resultats indiquen que la Caspasa 7 només pot compensar l'activitat de la Caspasa 3 en

el compartiment on comparteixen localització (citosol) però no en el mitocondri, on la Caspasa 3 és més abundant que la Caspasa 7. Així doncs, l'efecte observat en el DKO deriva tant del mitocondri com del citosol, mitjançant vies independents.

Per a confirmar que els canvis en els nivells de mRNA es tradueixen en canvis en la quantitat de proteïna, hem analitzat per western blot en cors neonatals i joves WT i DKO els nivells de proteïna d'alguns dels gens alterats en els DKO (figura 46). Els resultats dels western blots es corresponen amb els resultats de les Reals Time, els gens alterats a nivell de mRNA en els DKO es troben alterats de la mateixa manera pel que fa a proteïna. Mef2a, que no presenta diferències en els nivells de mRNA entre WT i DKO, tampoc presenta diferències a nivell de proteïna, a més, es confirma un resultat prèviament publicat pel nostre grup, i és que l'abundància de proteïna Mef2 en el cor no es correspon amb els nivells del seu transcrit [32], la proteïna augmenta mentre que el seu transcrit disminueix amb l'edat.

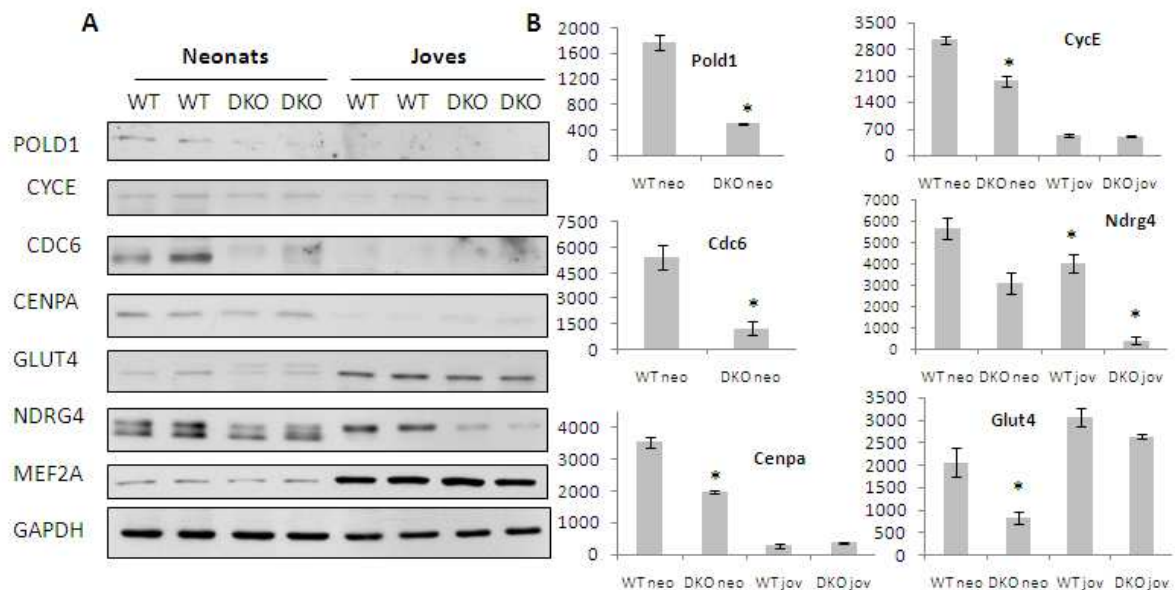


Figura 46: els gens alterats a nivell de transcrit en els DKO també ho estan a nivell de proteïna. A) western blots d'extractes totals de proteïna de cors de ratolins neonatals i joves WT i DKO. **B)** anàlisi densitomètric del western blot. *P<0.05.

L'estudi d'Abdul-Ghani et al. demostra que les caspases 3 i 8 participen en la correcta diferenciació dels cardiomiòcits, ja que estan implicades en la inactivació de la via canònica de Wnt tot tallant β -catenina, de manera que els nivells d'aquesta proteïna en les cèl·lules P19 tractades amb inhibidors de les caspases 3 i 8 són més elevats [149]. Per tal de comprovar si l'efecte que té lloc en el nostre model deficient

en les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits pot tenir relació amb el de l'estudi publicat, hem analitzat els nivells de β -catenina en les nostres mostres. Els nivells del transcrit de β -catenina obtinguts dels estudis amb micro-arrays en els cors WT i DKO no presenten diferències en cap de les dues edats estudiades. Pel que fa als nivells de proteïna de β -catenina tampoc hi ha diferències entre WT i DKO ni en l'edat neonatal ni a 1 mes (figura 47). Això demostra que es tracta de mecanismes diferents i que la via Wnt i en concret la β -catenina no estan implicades en el desenvolupament del fenotip que nosaltres observem i que es caracteritza per un problema en la proliferació i no en la diferenciació dels cardiomiòcits.

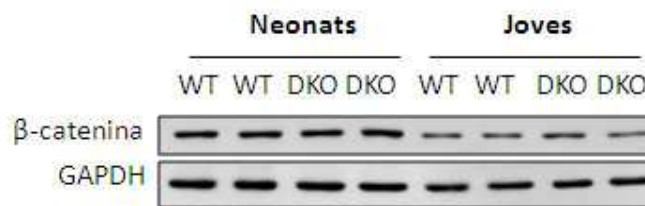


Figura 47: els nivells de β -catenina es mantenen constants en els cors DKO. western blot amb extractes totals de proteïna de cors de ratolins neonatals i joves WT i DKO.

5.1- Els canvis gènics que presenten els DKO no es deuen a la presència de Cre.

Tal com s'indica a la figura 32, hem creuat animals Cre⁺ amb animals Cre⁺ per tal d'augmentar el nombre de descendència Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} i per tant, és possible que alguns dels DKO siguin homozigots per Cre⁺. Per tal de descartar que els canvis gènics que hem observat en els animals DKO siguin una conseqüència secundària d'una inserció errònia del Cre que hagi pogut truncar un gen que ho desencadeni tot, hem analitzat en cors joves WT i cors Cre⁺ (descendents de creuaments entre ratolins Cre⁺) els nivells de mRNA d'alguns dels gens més alterats en els cors joves DKO (Ndr4, Nppa, Tmem100, Myh11 i Fam107a) (figura 48). Els resultats mostren com la presència de Cre no afecta en l'expressió d'aquests gens, els canvis observats són, doncs, deguts a la manca de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits.

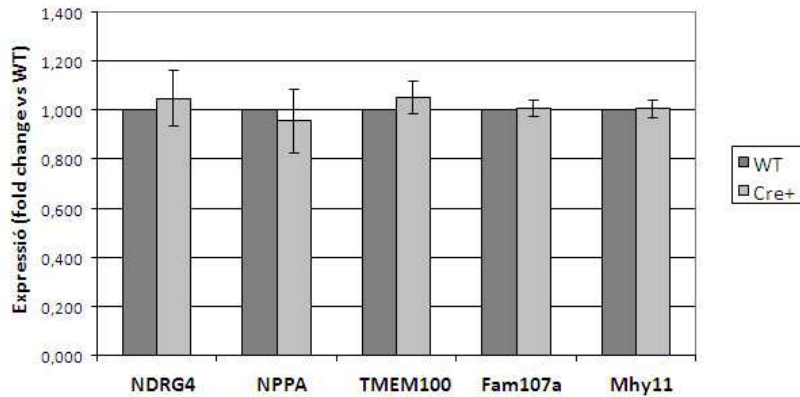


Figura 48: La presència de Cre no és la causa de les alteracions gèniques dels DKO. Real time de cors joves WT i cors Cre+ descendents de creuaments entre animals Cre+. n=3. Expressat en *fold change* vs WT.

6- Contribució de dues aproximacions proteòmiques a la comprensió dels canvis bioquímics observats en els cors deficients en caspases executores.

6.1- L'estudi proteòmic mitjançant gels bidimensionals i MS/MS indica alteracions en les proteïnes de la via metabòlica de producció d'energia.

Per a completar la informació que ens ha proporcionat l'estudi transcriptòmic i que ens indica a grans trets que els cardiomiòcits neonatals Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} tenen alterats sobretot els gens de cicle cel·lular, mentre que els cardiomiòcits joves tenen sobretot una alteració en els gens estructurals; en col·laboració amb el servei de genòmica i proteòmica de l'IRB Lleida hem portat a terme un estudi proteòmic dels cors d'animals joves (2 mesos). Aquest estudi s'ha fet mitjançant la comparació de gels bidimensionals amb extractes proteics totals de cor (n=5 per a cada genotip i cada mostra per triplicat), on, després de la normalització dels gels i l'anàlisi de la intensitat de tots i cadascun dels punts mitjançant el software PDQuest de Bio-Rad, hem pogut detectar aproximadament 260 punts. D'aquests 260 s'han elegit els punts diferencials entre els dos genotips que compleixen un o els dos requisits següents: tenir un ràtio DKO/WT superior a 1.5 o inferior a 0.6 i/o ser estadísticament significatiu (P<0,05), els punts elegits són 16. Finalment, mitjançant MS/MS s'ha analitzat a quina proteïna correspon cadascun d'aquests 16 punts. La figura 49 mostra un exemple d'un gel

bidimensional de cada genotip, aquestes imatges corresponen als gels abans de normalitzar la intensitat dels punts, no es tracta d'intensitats del tot reals i, per tant, les diferències en la intensitat dels punts que es veuen poden no ser correctes. La normalització es fa mitjançant el mateix software i no permet generar noves imatges. Els punts marcats en vermell són els punts que, un cop havent normalitzat la intensitat de tots els punts de tots els gels, compleixen un o els dos requisits abans nombrats i, per tant, es poden considerar diferencials entre WT i DKO.

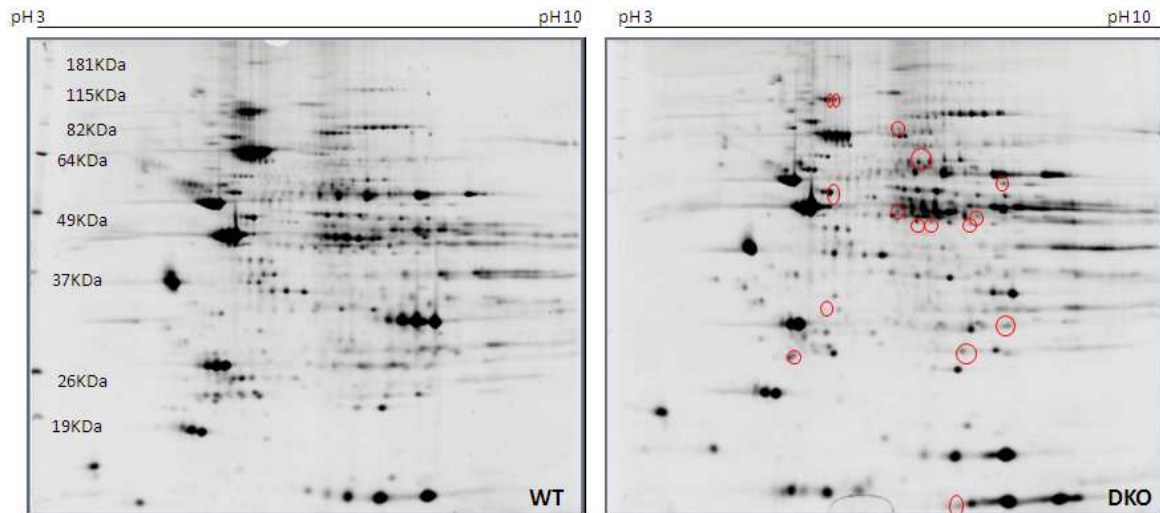


Figura 49: exemple de gel bidimensional de cor jove WT i DKO. La primera dimensió s'ha fet amb una tira de pH de rang lineal 3-10, la segona dimensió és un SDS-PAGE al 10%. En vermell estan marcades les proteïnes diferencials ($p < 0,05$ i/o ràtio DKO/WT superior a 1.5 o inferior a 0.6) en WT i DKO, aquests són els punts dels quals s'ha analitzat la identitat.

El resultat de l'anàlisi per MS/MS dels punts identificats es mostra a la taula 6. Quan hem anat a buscar la funció de cadascuna d'aquests proteïnes per a trobar com poden estar implicades en el desenvolupament d'aquest fenotip, ens hem adonat que la majoria de les proteïnes identificades i que, per tant, segons aquest estudi proteòmic s'expressen de manera diferent en els DKO quan comparat amb els WT, formen part de la cadena respiratòria i les vies metabòliques mitocondrials d'obtenció d'energia (figura 50). Això ens ha fet pensar que potser el problema és una manca en l'obtenció d'energia o bé, i de manera més important, una manca en la producció d'Acetil-CoA, un metabòlit clau que participa en la formació d'àcids grassos, aminoàcids i glucosa, en el catabolisme dels glúcids i àcids grassos i també en els processos d'acetilació tot aportant el grup Acetil.

Proteïna	Ràtio DKO/WT	P<0,05
Peroxiredoxin-2 (Prdx2)	1.51	NO
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3,mit (NDUFS3)	1.52	NO
Serum Albumin	2.44	SÍ
Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mit (IVD)	1.73	NO
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit (UQCRC1)	1.23	SÍ
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mit (ACSS1/AceCS2)	0.56	SÍ
Hemoglobin subunit beta-1 (HBB)	0.55	NO
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit (SCAD)	0.72	SÍ
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, mit (NDUFV1)	0.73	SÍ
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mit (DLD)	0.75	SÍ
Aspartate aminotransferase, cyt (AST/GOT)	0.75	SÍ
Glutathione S-transferase Mu 1, cyt (GSTM1)	0.80	SÍ
Superoxide dismutase, mit (SOD)	0.74	NO

Taula 6: proteïnes diferencials entre cors WT i DKO de 2 mesos identificades mitjançant MS/MS.

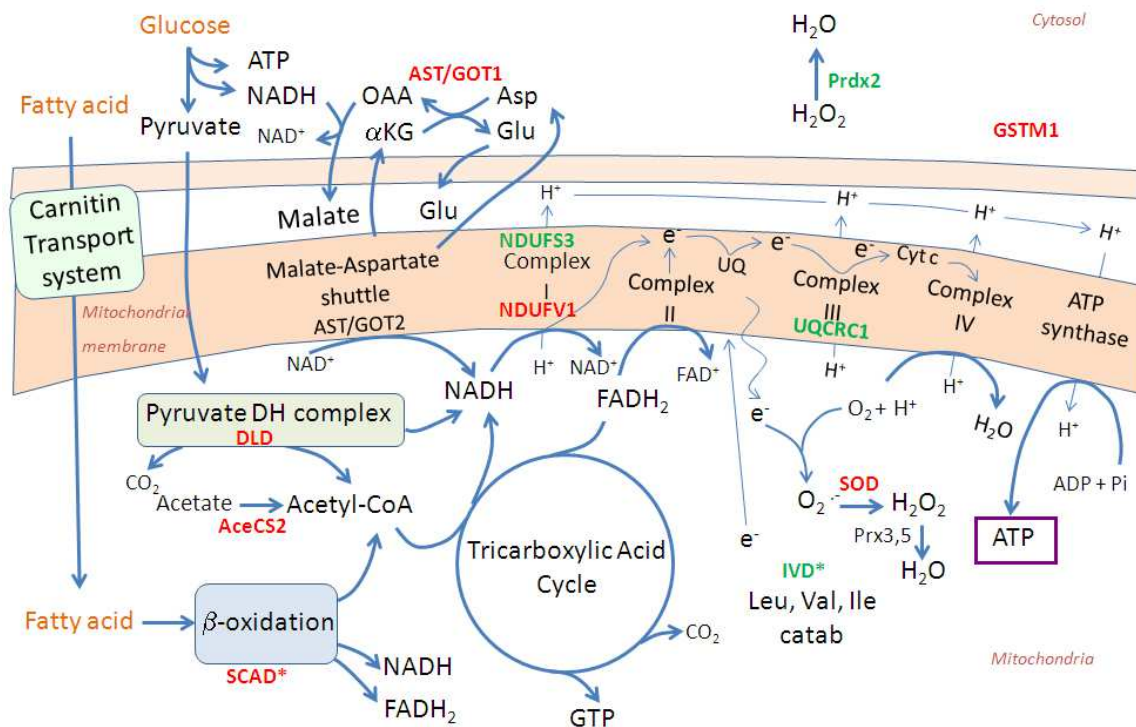


Figura 50: Funció de les proteïnes diferencials entre WT i DKO identificades per la comparació de gens bidimensionals. Esquema de la cadena respiratòria i vies metabòliques d'obtenció d'energia, on es troben la majoria de proteïnes identificades per MS/MS. En verd: sobre-expressades, en vermell: sota-expressades en DKO.

6.1.1- Els cors Caspasa3^{-/-} Caspasa7^{-/-} produeixen uns nivells d'Acetil-coA normals.

L'acetilació (modificació proteica que consisteix en l'adició d'un grup acetil proporcionat pel metabòlit Acetil-coA) mitjançant la seva funció reguladora en

l'expressió gènica està implicada en la regulació del cicle cel·lular, en concret en l'acetilació de les histones, necessària per a la síntesi del DNA [310]. Aquesta modificació proteica depèn de la disponibilitat d'Acetil-coA, els nivells del qual poden variar segons les condicions metabòliques intracel·lulars i depèn de la disponibilitat de nutrients [329]. Un estudi en llevats correlaciona els nivells d'Acetil-coA amb els nivells d'acetilació de les histones i amb els nivells de proliferació de les cèl·lules, indicant que la disponibilitat d'Acetil-coA pot regular el creixement de les cèl·lules tot controlant l'acetilació de les histones [307].

Els nostres resultats demostren que els cardiomiòcits deficientes en Caspasa 3 i Caspasa 7 tenen problemes de proliferació, a més, l'estudi proteòmic indica que aquestes cèl·lules tenen alterades diverses proteïnes de la via metabòlica d'obtenció d'energia i en concret les proteïnes Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase i sobretot Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, implicades en la producció d'Acetil-coA a partir dels àcids grassos i glucosa respectivament. En llum a aquests resultats i al fet que l'Acetil-coA pot tenir un paper en la regulació del cicle cel·lular, hem mesurat els nivells totals d'Acetil-coA en cors WT i DKO neonatals i joves (1 mes) (figura 51). Tant els cors dels animals neonatals com els dels animals joves DKO expressen els mateixos nivells d'Acetil-coA que els WT de la mateixa camada.

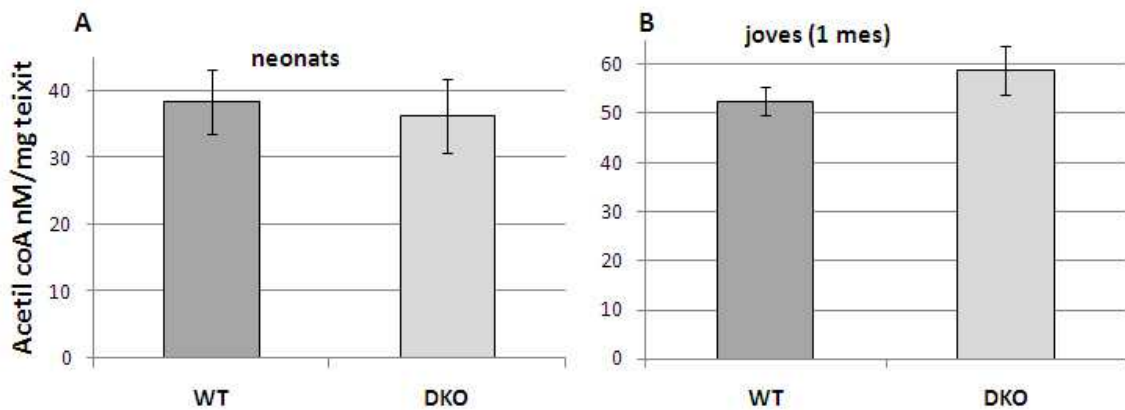


Figura 51: La manca de caspases 3 i 7 no afecta els nivells de producció d'Acetil-coA. Nivells d'Acetil-coA expressats en nM/mg teixit en cors *Wild-type* i *Casp3^{-/-}Casp7^{-/-}* neonatals (A) i joves d'un mes (B). n=4.

Aquests resultats indiquen que el dèficit en els enzims de producció d'Acetil-coA en els cors DKO que hem determinat mitjançant l'estudi proteòmic no és funcional, és a dir, que no és suficient per a significar un canvi en els nivells de

producció d'Acetil-coA, o bé que l'organisme és capaç de contrarestar-lo per a produir Acetil-coA a nivells normals. Per tant, en el nostre cas l'alteració en la proliferació que presenten els cardiomiòcits Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} no es deu a una incorrecta acetilació limitada per una insuficient producció d'Acetil-coA.

6.2- Anàlisi simultani del proteoma de cors neonatals, joves i adults de ratolins WT i deficients en caspases 3 i 7 per marcatge isobàric per quantificació relativa i absoluta (iTRAQ).

Donada la gran quantitat i qualitat d'informació que l'estudi transcriptòmic amb els arrays ens ha proporcionat, la informació que hem obtingut de l'estudi proteòmic mitjançant gels bidimensionals és pobra degut a la limitació que suposa la tècnica per sí, en el sentit que en cada gel només s'identifiquen entre 200 i 300 proteïnes d'entre les quals n'hem pogut determinar sols 16 de diferencials. Degut al nostre interès per a tenir la màxima informació possible i poder comparar el comportament dels diferents grups de gens a nivell transcripcional i a nivell proteòmic, hem decidit portar a terme un altre estudi proteòmic diferent. Es tracta d'un estudi per iTRAQ en col·laboració amb el Servei de Proteòmica del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares) de Madrid. Hem analitzat 4 edats per a cada genotip: neonatal, 1 mes, 3 mesos i 8 mesos.

La taula 7 mostra les proteïnes més diferentment expressades entre els cors WT i DKO neonatals, edat més important a estudiar donat que és quan les caspases encara s'expressen i on els canvis proteics observats es deuen d'una manera més o menys directa a la manca de les caspases 3 i 7. La taula també inclou la funció de les proteïnes en qüestió, en cas que estigui descrita. Els valors estan expressats en forma de *fold change*, presenten símbol negatiu i fons verd aquelles proteïnes més abundants en els DKO i símbol positiu i fons vermell les proteïnes més abundants en els cors neonatals WT.

	fold change
Serine protease inhibitor A3F (Serp13)	-7,13
Inhibidor de proteases	
Testican-1	-7,02
Interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu	
Uncharacterized protein C5orf46 homolog	-7,01
Funció desconeguda	
tRNA wybutosine-synthesizing protein 1	-6,52
Metiltransferasa, biosíntesi de wybutosine	
DmX-like protein 1	-5,00
Funció poc coneguda, processos de regulació	
E3 ubiquitin-protein ligase	7,15
Desestabilització residus N-terminal, mediació degradació	
Uncharacterized protein CXorf49 homolog	7,31
Funció desconeguda	
Protein FAM178A	7,49
Poc estudiat	
Kinesin-like protein KIF1A	7,62
Transport de precursors axonals	
CMP-sialic acid transporter	10,80
Transport àcid siàlic a l'aparell de Golgi	

Taula 7: proteïnes més diferentment expressades entre cors WT i DKO neonatals. Els valors negatius i en fons verd indiquen proteïnes més expressades en els DKO. Valors positius i en fons vermell indiquen proteïnes més expressades en els WT.

Com s'ha comentat repetidament, els cors DKO pateixen una adaptació amb l'edat, que a més de comportar el desenvolupament d'una hipertròfia lleu té com a conseqüència un canvi en la tendència de l'expressió de diversos gens. El mateix s'ha observat amb l'estudi proteòmic, ja que moltes proteïnes evolucionen de manera diferent amb l'edat segons si es tracta d'un cor WT o DKO. La taula 8 inclou les proteïnes amb una diferència més clara i significativa, mostra el canvi d'expressió de cada edat (1 mes, 3 mesos i 8 mesos) en relació a l'edat neonatal. Els valors de Zq mesuren la distància a la mitjana de la població en unitats de desviació estàndard, de manera que com més gran és el valor, major és el canvi. Valors de Zq negatius i en verd indiquen que la proteïna augmenta amb l'edat, els positius i en vermell indiquen que disminueix amb l'edat.

El que demostra la taula 8 és que moltes proteïnes es comporten de manera totalment contrària entre WT i DKO a mesura que els cors es fan adults, mentre que en l'edat neonatal aquestes proteïnes no presenten diferències. Això demostra i dona força a la idea del procés adaptatiu que sofreixen els cors DKO i la importància a nivell transcripcional i traduccional que això comporta.

Resultats

	WT				DKO				WT-DKO
	Zq 1 m	Zq 3 m	Zq 8 m	mitjana	Zq 1 m	Zq 3 m	Zq 8 m	mitjana	
NAD(P) transhydrogenase	-3,60	-3,69	-2,36	-3,21	1,81	1,82	1,65	1,76	-4,97
Oxidoreductasa, transferència de protons entre NAD(H) i NADP(+), producció NADPH									
Beta/gamma crystallin domain-containing protein	-3,94	-4,26	-3,54	-3,91	-1,42	0,51	2,05	0,38	-4,29
Interacció selectiva i no-covalent amb carbohidrats									
Polycystin-2	-3,68	-2,44	-3,08	-3,07	0,26	-0,38	0,77	0,22	-3,29
Funciona com a canal de calci permeable als cations									
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	-2,87	-2,81	-1,50	-2,39	0,42	1,16	0,62	0,73	-3,13
Responsable de la biosíntesi de pèptids de piroglutamil									
5-azacytidine-induced protein 1	-2,76	-3,02	-2,16	-2,64	0,13	0,58	0,26	0,33	-2,97
Té relació amb les vies de cicle cel·lular, transició G2/M									
Collagen alpha-2(I) chain	1,75	1,54	0,29	1,20	-1,65	-1,53	-1,51	-1,56	2,76
Component estructural de les fibres de colagen del cartilag									
Rho GTPase-activating protein 26	1,30	1,21	0,32	0,94	-1,59	-1,45	-2,30	-1,78	2,72
Participació en la via d'adhesió a la matriu extracel·lular									
Tudor domain-containing protein 6	1,84	2,06	1,52	1,81	-0,05	-0,62	-0,12	-0,26	2,07
Formació de cossos cromàtics i per a l'expressió de miRNA precursors i madurs									
Protein Urb2	1,10	0,86	0,33	0,76	-1,35	-1,01	-1,40	-1,25	2,02
Biogènesi de ribosomes									
Carboxypeptidase D	1,18	1,33	0,05	0,85	-0,88	-1,07	-1,51	-1,16	2,01
Tall d'unions peptídiques en l'extrem C-terminal de pèptids o proteïnes									

Taula 8: Evolució de les proteïnes més diferentment expressades entre WT i DKO amb el temps. Valors de Zq negatius i en verd indiquen augment amb l'edat, positius i en vermell indiquen disminució amb l'edat.

6.2.1- Els cors neonatals Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-} presenten un augment en la resposta inflamatòria i en l'expressió de Serpina3.

Com ja s'ha comentat, el fet que l'expressió de les caspases sigui silenciada durant el desenvolupament i que la seva expressió comenci a caure de manera important després del naixement fa que la comparació proteòmica en l'estadi neonatal sigui la més important, ja que dona informació sobre les primeres proteïnes que es troben alterades degut a la manca real de les caspases; les alteracions proteiques a edats més avançades quan les caspases de manera natural ja no s'expressen poden ser degudes molt possiblement a adaptacions.

La Alpha 1-antichymotrypsina (α 1-ACT) és una proteïna codificada pel gen Serpina3, es tracta d'un inhibidor de proteases secretat pels hepatòcits; a més, però, es troba en el nucli de les cèl·lules on les seves funcions són poc conegudes [318]. α 1-ACT és, segons l'estudi per iTRAQ, la proteïna més diferentment expressada entre els cors WT i DKO neonatals, la qual es troba de manera molt més abundant en els DKO (taula 7). Per tal de saber si el comportament del mRNA del gen Serpina3 és el mateix que el de la proteïna, hem fet una real time en cors neonatals i joves de 1 mes WT i DKO (figura 52).

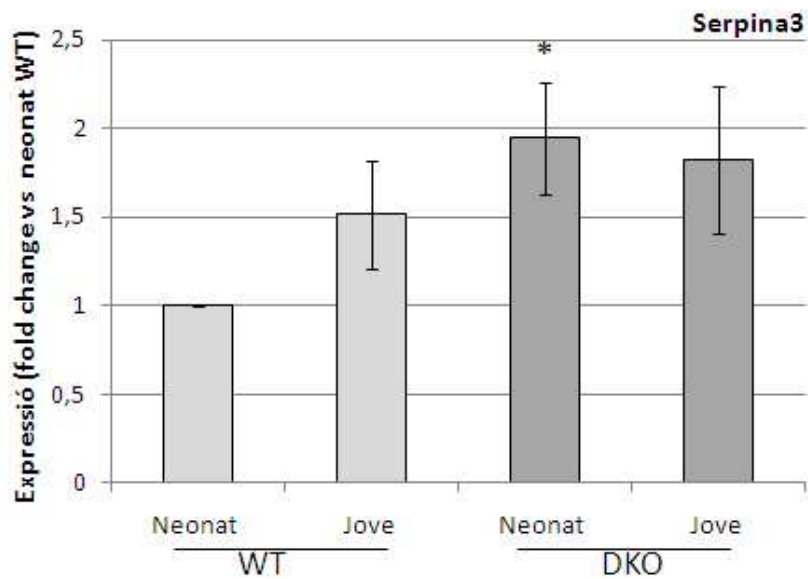


Figura 52: El gen Serpina3 es troba més expressat en els cors DKO que en els WT neonatals. Real time de Serpina3 en cors WT i DKO neonatals i joves. *P<0.05. n=6.

Els resultats mostren com Serpina3 també es troba a nivell de mRNA molt més expressada en els cors DKO que en els WT, demostrant una implicació de les caspases 3 i 7 en la regulació de la seva expressió. Un estudi recent demostra com la α 1-ACT inhibeix la proliferació dels hepatòcits i com la seva sobre-expressió comporta una disminució de PCNA i altres marcadors de proliferació [318]. Així doncs, la Serpina3, expressada més abundantment en els cors DKO, sembla estar implicada en la inhibició de la proliferació, que és la principal conseqüència que suposa la manca de les caspases 3 i 7. Donada aquesta concordança hem trobat interessant entrar més a fons en l'estudi de la regulació d'aquesta proteïna. Les serpine es sintetitzen principalment en el fetge [330] i la seva concentració en el plasma augmenta en resposta a la inflamació [331]. En concret, els principals inductors de la transcripció de Serpina3 són la Oncostatina-M (OSM), la Interleuquina-1 (IL-1) i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) [331].

Degut a que l'expressió de Serpina3 s'indueix en resposta a la inflamació i que les caspases, en concret Caspasa 1, que porta a terme el processament de la proIL-1 β a IL-1 β [123], i Caspasa 8, que participa en l'activació de la via NF- κ B [129], ja s'ha descrit que es troben implicades en la resposta inflamatòria, hem cregut oportú mesurar els nivells d'expressió de diferents citoquines en els cors neonatals WT i DKO.

Per a això hem portat a terme un array de citoquines, hem analitzat dues membranes per a cada genotip i en cada membrana hi hem posat un pool de proteïna de tres cors neonatals (figura 53).

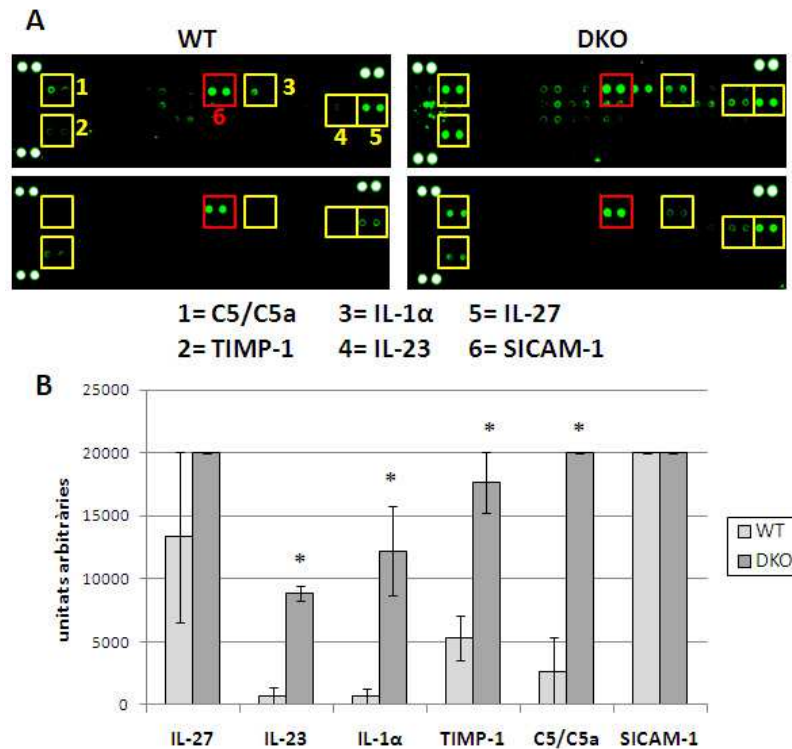


Figura 53: Els DKO presenten més expressió d'algunes citoquines que els WT. A) array de citoquines, cada membrana inclou un pool de tres cors neonatals; cada citoquina està per duplicat en la membrana. Els punts blancs són un control de càrrega. En groc: punts diferencials entre WT i DKO. En vermell: punts que no varien. **B)** densitometria dels punts diferencials entre WT i DKO. *P<0.05.

Els resultats mostren com els cors DKO tenen un augment important en l'expressió d'algunes citoquines, en concret la IL-1 α , responsable de la producció d'inflamació així com de la febre i sepsis; el Component 5 del Complement (C5/C5a), important en el procés inflamatori i processos de mort cel·lular; l'inhibidor metallopeptidasa TIMP-1, inhibidor de la majoria de metalloproteases conegudes i capaç de promoure proliferació cel·lular; i la IL-23, metalloproteasa de matriu que participa en l'angiogènesi. D'entre aquests resultats cal destacar el fet que l'estudi proteòmic per iTRAQ també apunta la IL-1 α com una de les proteïnes diferencials i que es troba més expressada en el DKO neonatal, confirmant l'augment en l'expressió d'aquesta proteïna i en la resposta inflamatòria. Així doncs en resum, aquests resultats

apunten a que l'augment en l'expressió de Serpina3 que presenten els cors neonatals DKO pot ser degut a un augment en l'expressió d'algunes citoquines i un augment, per tant, en la resposta inflamatòria, causat per la manca de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits.

7- Estudi *in vitro* de les funcions no apoptòtiques de les caspases 3 i 7 en el miocardi.

7.1- La sobre-expressió de les caspases 3 i 7 en cardiomiòcits neonatals produeix un augment en l'expressió dels gens de cicle.

Havent comprovat que la manca de les caspases efectores 3 i 7 en els cardiomiòcits provoca una disminució en el pes d'aquests cors, causada per un defecte en la seva proliferació que s'explica al seu torn per una disminució en l'expressió dels gens de cicle, hem transduït cardiomiòcits neonatals de rata amb lentivirus de sobre-expressió de Caspasa 3 i Caspasa 7 per tal d'analitzar si es reverteix l'efecte. Després de comprovar que els lentivirus funcionen i s'aconsegueix una sobre-expressió significativa tant de Caspasa 3 com de Caspasa 7 (figura 54C), hem analitzat els nivells de mRNA mitjançant Real time d'alguns dels gens relacionats amb la proliferació més alterats en els cors DKO: Pold1, CycE i Ndr4. Per a descartar que els canvis en l'expressió dels gens es deuen a un efecte inespecífic de la sobre-expressió, hem analitzat també l'expressió de Mef2a, un gen no alterat segons els resultats dels arrays d'expressió en els cors deficientes en aquestes caspases. Donat que l'expressió dels gens de cicle així com la proliferació dels cardiomiòcits cau durant el període postnatal, per tal d'esbrinar si l'efecte és diferent segons l'edat de les cèl·lules, hem realitzat l'experiment amb cardiomiòcits neonatals de diferents edats, P1-P2 (figura 54A) i P4-P5 (figura 54B).

En cardiomiòcits P1-P2 la sobre-expressió de només Caspasa 3 o només Caspasa 7 suposa un augment d'aproximadament un 10% en l'expressió de Ndr4, Pold1 i CycE. En els mateixos cardiomiòcits, la doble sobre-expressió de Caspasa 3 i Caspasa 7 comporta un augment del 18% en l'expressió de Ndr4, del 22% en Pold1 i del 36% en CycE sobre els valors basals que encara es mantenen en aquesta edat, ja

que els miòcits neonatals mantenen certa capacitat de proliferació (figura 36). Donat l'important increment en l'expressió de CycE, hem analitzat per western blot si aquest augment en el mRNA es correspon amb un augment en els nivells de proteïna (figura 54C-D), els resultats mostren que això és així, i que la sobre-expressió de Caspasa 3 i Caspasa 7 en cardiomiòcits P1-P2 comporta també un augment en els nivells de proteïna CycE. En cardiomiòcits P4-P5, l'augment en l'expressió dels gens deguda a la sobre-expressió de cadascuna de les caspases per separat es manté, sobre un 10% d'augment en cada gen, mentre que l'augment degut a la doble sobre-expressió no és tan gran com en les cèl·lules més joves, ja que és d'un 13% per NdrG4 i Pold1 i només d'un 16% per CycE, en front al 36% dels cardiomiòcits P1-P2. Pel que fa a Mef2a, la sobre-expressió no comporta canvis en cap de les dues edats, confirmant els estudis amb cors Caspasa 3^{-/-} Caspasa 7^{-/-}, on Mef2a no es troba alterat.

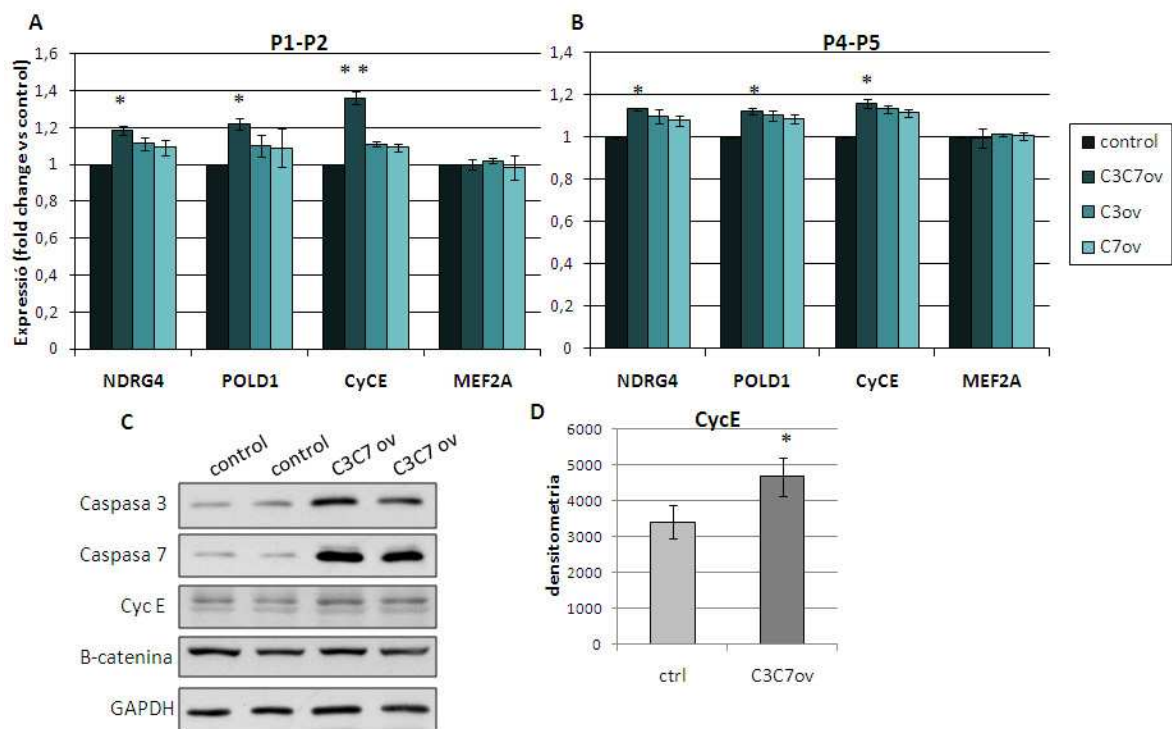


Figura 54: La sobre-expressió de les Caspases 3 i 7 suposa un augment en l'expressió dels gens de cicle.

Nivells de mRNA mesurats per Real Time en cardiomiòcits sobre-expressors de Caspasa 3 i Caspasa 7 (C3C7ov) P1-P2 (A) i P4-P5(B) *P<0.05, **P<0.01 n=3. C) western blots d'extractes totals de proteïna de cardiomiòcits P1-P2 transduïts amb lentivirus amb plàsmid control o C3C7ov. D) anàlisi densitomètric del WB de CycE. *P<0.05, n=4.

Com s'ha comentat abans, un estudi força recent demostra la implicació de les caspases 3 i 8 en la diferenciació dels cardiomiòcits tot mitjançant la degradació de β -

catenina i conseqüent inactivació de la via canònica de Wnt [149]. Els cardiomiòcits P1-P2 transduïts amb lentivirus que sobre-expressen Caspasa 3 i Caspasa 7 no presenten diferències en els nivells de β -catenina quan es comparen amb els cardiomiòcits control (figura 54C), confirmant el resultat ja mostrat en els cors DKO (figura 47), que tampoc presenten canvis en els nivells d'aquesta proteïna ni en el seu transcrit, demostrant que l'efecte i mecanisme d'acció i efecte observats en ambdós estudis no són els mateixos.

D'una banda aquests resultats complementen els resultats observats en els cors DKO, ja que l'efecte observat quan les caspases 3 i 7 se sobre-expressen és el contrari a l'observat quan manquen, demostrant que aquestes caspases estan d'alguna manera implicades en la regulació de l'expressió d'aquests gens. D'altra banda, mostren que la reactivació de la maquinària de cicle cel·lular es produeix més fàcilment quan més jove és la cèl·lula, lògic si pensem que durant el període postnatal dels cardiomiòcits té lloc el canvi de proliferació a hiperplàsia i la diferència de només 3 dies implica una baixada important en la proliferació i en els gens que la regulen [278-280], i possiblement és més difícil reactivar-los.

Com mostra la figura 52, els cors DKO expressen més Serpina3 que els WT, en concordança amb l'estudi proteòmic que mostra uns nivells superiors d'aquesta proteïna en els cors DKO. La real time per Serpina3 en cardiomiòcits sobre-expressors de Caspasa 3 i Caspasa 7 (figura 55) mostra com la sobre-expressió d'aquestes caspases suposa una disminució en l'expressió de Serpina3. Aquest resultat, a més, demostra per primera vegada l'expressió de Serpina3 en els cardiomiòcits i recolza el resultat obtingut amb els cors totals, ja que dona força al fet que l'expressió detectada es deu als cardiomiòcits, cèl·lules més abundants del cor, i no a altres cèl·lules cardíques no deficientes en caspasa 3 i 7.

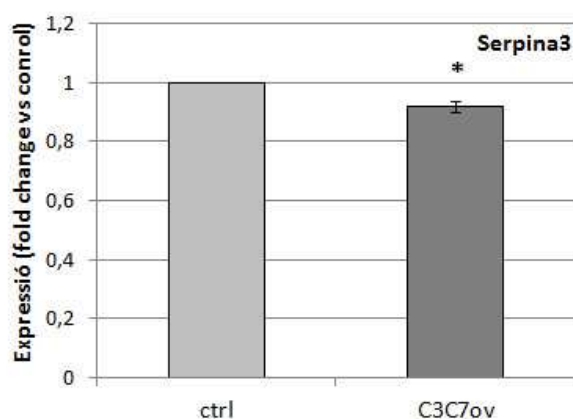


Figura 55: La sobre-expressió de Caspasa 3 i 7 en cardiomiòcits neonatals suposa una disminució en l'expressió de Serpina3. Real time de Serpina3 en cardiomiòcits neonatals de rata control i transduïts amb lentivirus sobre-expressors de caspasa 3 i 7. *P<0.05. n=4.

La caiguda en l'expressió dels gens implicats en la proliferació en els cors DKO (figura 42) és d'un 42% per *Ndr4*, un 44% per *Pold1* i casi un 50% per *CycE*, aquesta caiguda és superior a l'augment d'expressió aconseguit en els cardiomiòcits transduïts amb lentivirus sobre-expressors (figura 54A), el mateix passa amb *Serpina3*, ja que mentre que els cors DKO n'expressen el doble que els WT, la caiguda en l'expressió aconseguida en els cardiomiòcits transduïts amb lentivirus sobre-expressors és només d'un 12%. Donat que *Nkx2.5* s'expressa des de l'inici del desenvolupament [18], els cors DKO han estat durant tot el període embrional i neonatal deficientes en les caspases 3 i 7, mentre que els cardiomiòcits neonatals han estat expressant nivells normals de les caspases 3 i 7 fins que nosaltres els hem posat els lentivirus, això pot estar indicant que l'augment en l'expressió no és proporcional a la disminució perquè aquesta no es deu única i/o directament a la presència o no d'aquestes caspases en un determinat moment, sinó a tot un procés de desenvolupament mancat d'aquestes caspases i l'alteració de les vies que es veuen afectades per la seva funció; falta, doncs, alguna cosa en els cardiomiòcits que sobre-expressen Caspasa 3 i Caspasa 7 que permeti aconseguir els mateixos nivells d'augment que de disminució en l'expressió dels gens implicats en la proliferació cel·lular.

7.1.1- La sobre-expressió de Serpina3 en cardiomiòcits neonatals influencia l'expressió de gens de cicle.

Havent comprovat que l'augment en l'expressió de Serpina3 que presenten els cors DKO es correlaciona amb una disminució en l'expressió d'aquest gen en els cardiomiòcits neonatals que sobre-exprésen les caspases 3 i 7 i que, per tant, les diferències observades en els cors es deuen realment a alteracions en els cardiomiòcits, hem cregut convenient anar un pas més enllà en l'estudi de la funció d'aquest gen en el nostre model.

Per tal de comprovar si en els cardiomiòcits, tal com passa amb els hepatòcits [318], Serpina3 està implicada en la inhibició de la proliferació, hem sobre-exprésat la forma humana de Serpina3 en cardiomiòcits neonatals (figura 56 A,B) i hem analitzat mitjançant real time l'expressió de Pold1, NdrG4 i CycE, que presenten menys expressió en els cors DKO, i de Mef2a, no alterat en el nostre model. Els resultats indiquen com la sobre-expressió de Serpina3 en cardiomiòcits neonatals comporta una disminució modesta però significativa d'entre un 8 i un 10% dels gens implicats en la proliferació i regulació del cicle cel·lular (figura 56 C).

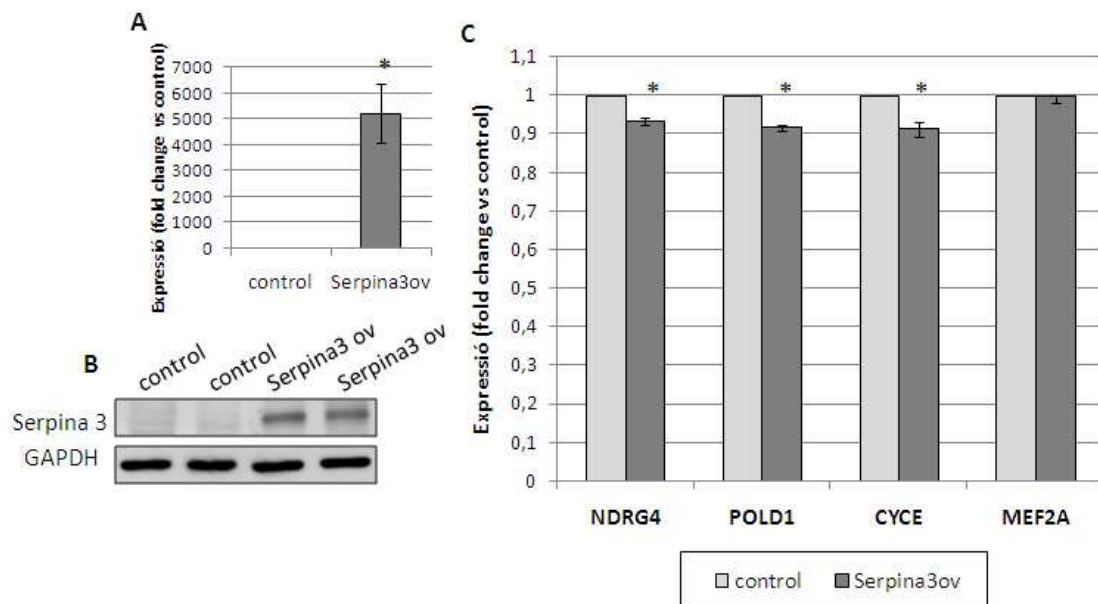


Figura 56: La sobre-expressió de Serpina3 en cardiomiòcits neonatals implica una disminució en l'expressió de gens de cicle. A) nivells de mRNA de la forma de Serpina3 humana mesurats per Real time en cardiomiòcits P1-P2 transduïts amb plàsmid control i de sobre-expressió de Serpina3 humana *P<0.05 n=3. **B)** western blots d'extractes totals de proteïna de cardiomiòcits. **C)** nivells de mRNA mesurats per Real time en cardiomiòcits P1-P2 control i sobre-expressors de Serpina3. *P<0.05, n=3.

Aquests resultats coincideixen i donen força al que hem anat mostrant. És a dir, la manca de Caspasa 3 i Caspasa 7 comporta el desenvolupament d'una resposta inflamatòria, que va associada a una inducció de l'expressió de gens, com per exemple Serpina3, que tenen un paper en la inhibició de la proliferació. Tal i com es veu amb l'efecte que comporta la sobre-expressió de Serpina3, que dóna lloc a una lleugera caiguda en l'expressió dels gens de cicle, Serpina3 és un dels gens que participa en el desenvolupament del fenotip que nosaltres observem però no és l'únic, altres gens i/o altres vies hi estan també implicats.

7.2- Ni la sobre-expressió ni la manca de caspases en els cardiomiòcits comporten canvis en els nivells d'activitat caspasa.

Amb l'objectiu de saber si les alteracions en l'expressió dels gens de cicle, i totes les conseqüències i adaptacions que comporta, causades per la sobre-expressió o delecció de les caspases en els cardiomiòcits es deuen a una variació en els nivells d'activitat de les caspases, és a dir, es deuen a un increment o disminució de la forma activa de les caspases i per tant a variacions en la seva activitat típica (tall de proteïnes) o no, hem realitzat un assaig d'activitat caspasa DEVD.

Hem analitzat cardiomiòcits control i cardiomiòcits que sobre-expressen Caspasa 3 i Caspasa 7 (C3C7ov), cors neonatals WT i cors neonatals DKO, i com a control positiu hem utilitzat cèl·lules HEK293T control i cèl·lules HEK293T tractades amb Staurosporina (STS), que és un inductor d'apoptosi i, per tant, comporta una activació de les caspases (figura 57).

El fort augment en l'activitat caspasa de les HEK293T tractades amb STS en comparació a l'activitat caspasa que presenten les mateixes cèl·lules en condicions normals indica que l'assaig s'ha portat a terme correctament i que és capaç de detectar variacions en l'activitat de les caspases efectores 3 i 7. Una altra prova que demostra que l'assaig s'ha executat correctament és que els valors que presenten els cardiomiòcits i els cors total són equivalents, desitjable ja que són el mateix tipus de cèl·lules. Pel que fa als cardiomiòcits C3C7ov, presenten només un 3% d'increment en l'activitat caspasa respecte els cardiomiòcits control; per la seva banda, els cors DKO tenen només un 1% menys d'activitat que els cors WT de la mateixa camada; sense ser en cap dels dos casos significatiu.

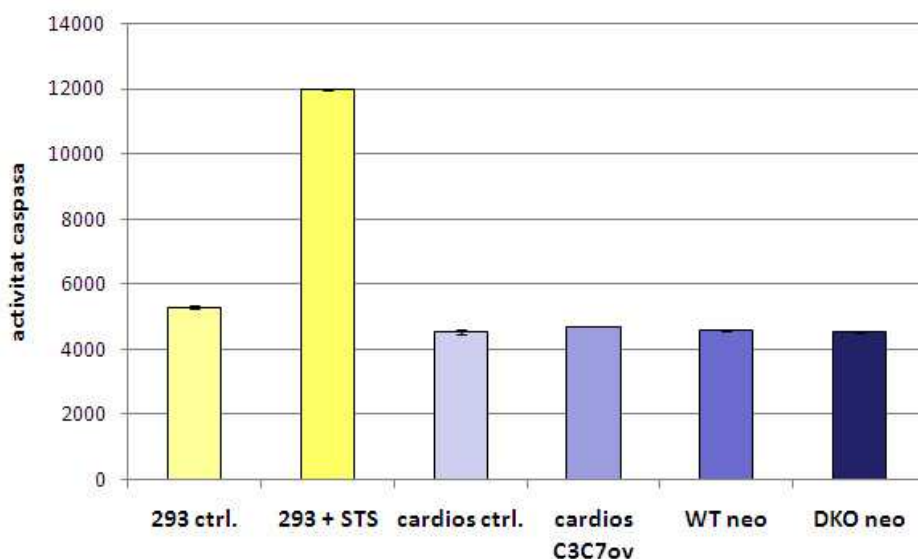


Figura 57: El fenotip observat no es deu a alteracions en l'activitat caspasa. Assaig caspasa DEVD d'extractes totals de cèl·lules HEK293T control i tractades amb STS 12h, cardiomiòcits transduïts amb lentivirus control i sobre-expressors de Caspasa 3 i 7 i cors neonatals WT i DKO. n=3.

Aquests resultats indiquen primer que la manca o sobre-expressió de les caspases 3 i 7 per sí sola no comporta canvis en els nivells d'activitat caspasa, sinó que fa falta una activació d'aquestes; i segon, que els canvis en l'expressió gènica i el fenotip que observem tant en els cors mancats de caspases 3 i 7 com en els cardiomiòcits que sobre-expressen les mateixes caspases no es deuen a una alteració de l'activitat caspasa, sinó que es deuen possiblement a l'excés o manca d'aquestes caspases en la seva forma de pro-caspasa. No es pot descartar del tot, però, que els canvis en els nivells d'activitat caspasa siguin massa petits per a poder ser detectats amb un assaig, però suficients per a tallar una proteïna diana clau que ho desencadeni tot.

7.3- La funció de les caspases 3 i 7 és independent de la seva activitat catalítica.

Per tal de determinar si la funció que porten a terme les caspases 3 i 7 en el desenvolupament cardíac, i que hem verificat *in vitro* amb cultius de cardiomiòcits, es deu a l'activitat proteolítica d'aquestes, o bé, com sembla indicar l'assaig d'activitat caspasa, és independent de l'activitat enzimàtica i es deu a la seva activitat en forma de pro-caspasa, hem fet una mutació en el centre catalític de les caspases 3 i 7

canviant la cisteïna (Cys) del centre actiu per una serina (Ser), i ho hem verificat per seqüenciació (figura 58A, B). El que hem fet amb aquestes caspases mutades és sobre-expressar-les en cardiomiòcits neonatals de rata P2, en paral·lel a la sobre-expressió de les caspases en la seva forma natural. Per mitjà de western blot hem determinat que les caspases mutades se sobre-expressen correctament assolint uns nivells d'expressió comparables als que s'assoleixen amb la sobre-expressió de les caspases en la seva forma natural, de manera que els resultats són comparables (figura 58C).

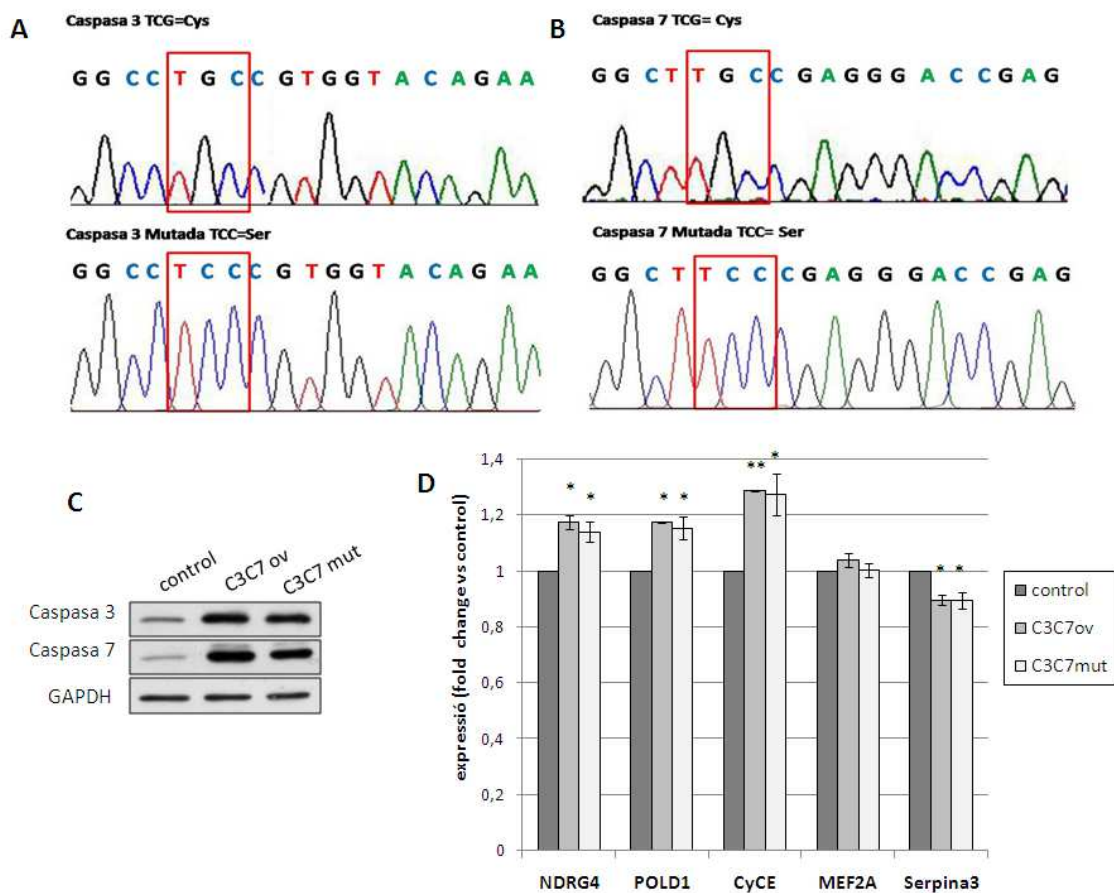


Figura 58: La funció de les caspases 3 i 7 és independent de la seva activitat proteolítica. A) seqüència que demostra la mutació del centre actiu de Caspasa 3. **B)** seqüència que demostra la mutació del centre actiu de Caspasa 7. **C)** western blots d'extractes totals de proteïna de cardiomiòcits P1-P2 transduïts amb lentivirus amb plàsmid control, plàsmids sobre-expressors de Caspasa 3 i Caspasa 7 (C3C7ov) o plàsmids sobre-expressors de Caspasa 3 i Caspasa 7 mutades (C3C7mut). **D)** Nivells de mRNA mesurats per Real Time en cardiomiòcits P1-P2 sobre-expressors de Caspasa 3 i Caspasa 7 (C3C7ov) o Caspasa 3 i Caspasa 7 mutades (C3C7mut). *P<0.05, **P<0.01 n=3.

Mitjançant real time hem analitzat els nivells d'expressió d'alguns dels gens de cicle alterats degut a la manca de les caspases 3 i 7, així com de Mef2a, que no varia en els DKO, i Serpina3, importantment sobre-expressada en els cors DKO (figura 58D). Els resultats indiquen com la sobre-expressió de les caspases amb el centre catalític mutat té el mateix efecte en l'expressió dels gens analitzats que la sobre-expressió de les caspases en la seva forma natural. Així doncs, es produeix un augment d'aproximadament el 15-20% en l'expressió de NdrG4 i PolD1 i del 30% en CycE. Pel que fa a l'expressió de Mef2a no es veu alterada, i la de Serpina3 disminueix aproximadament un 13% degut a la sobre-expressió tant de les caspases 3 i 7 en la seva forma natural com en la seva forma mutada.

En conclusió, aquests resultats indiquen que la funció no apoptòtica que hem descrit i que porten a terme les caspases 3 i 7 en el teixit cardíac és independent de la seva activitat enzimàtica, de manera que depèn de la seva forma sencera com a pro-caspasa i no és necessària cap activació d'aquesta.

Discussió

1- El fenotip cardíac que suposa la manca global de les caspases 3 i 7 no està causat directament per la manca d'aquestes caspases en els cardiomiòcits.

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada sense resposta inflamatòria [47] les principals responsables de l'execució de la qual són les caspases, unes proteases que un cop activades mitjançant l'alliberació del seu prodomini actuen tallant els seus substrats [49, 53]. L'apoptosi i en concret les caspases són essencials per al desenvolupament, tal com demostra per exemple l'estudi de Kuida et al. on els ratolins deficientes en Caspasa 3 moren després del naixement degut a una hiperplàsia en el cervell [110]. A més de ser les responsables d'executar l'apoptosi, les caspases i altres membres apoptòtics són importants per les funcions no apoptòtiques que porten a terme, entre les quals trobem les funcions en el desenvolupament cardíac [117, 187, 191, 194]; a més, hi ha força tendència a considerar que la diferenciació és un procés específic de cada teixit, però cada cop més estudis demostren que aquesta pot dependre de l'activitat d'una via de senyalització o proteïna comuna, un factor que sembla força conservat en la inducció de la diferenciació és la Caspasa 3 [332], implicada per exemple en la diferenciació dels mioblasts C2C12 mitjançant l'activació de la DNAsa CAD, que al seu torn indueix els talls al DNA necessaris per a promoure la diferenciació d'aquestes cèl·lules [147].

La manca global de les caspases executores 3 i 7 comporta una mort prematura durant els primers dies de vida, deguda principalment a un fenotip cardíac molt important caracteritzat per una dilatació de les aurícules i una mala organització i compactació de la musculatura ventricular [194]. Al tractar-se, però, d'un Doble *Knock Out* global, no es pot determinar si les caspases 3 i 7 participen directament en l'execució d'aquest fenotip o bé si és una conseqüència de la manca d'aquestes caspases a un altre teixit o tipus cel·lular. Aquí és on entra la importància dels *Knock Out* específics de teixit i del nostre estudi. Nkx2.5 és un gen cardíac que comença a expressar-se a partir de E7.5 i que manté la seva expressió durant tot el desenvolupament i el cor adult [18], això fa que sigui el millor candidat per a controlar l'expressió de Cre en un *Knock Out* cardio-específic i que hagi estat el nostre elegit per

a generar una soca deficient en Caspasa 3 i Caspasa 7 únicament en els cardiomiòcits (DKO). El nostre estudi demostra com la manca de les caspases 3 i 7 específicament en els cardiomiòcits no suposa un problema de viabilitat, com sí que ho és la seva manca global [194], els ratolins neixen en les proporcions esperades i arriben a estadis adults amb normalitat. Importantment, els ratolins del nostre estudi no presenten el mateix fenotip cardíac que els ratolins de l'estudi de Lakhani et al., estudis histològics revelen una morfologia cardíaca normal, en particular a l'inici de la vida postnatal, demostrant que el desenvolupament cardíac anormal del cor dels ratolins amb la deleció global de les caspases 3 i 7 no es deu a la manca específica d'aquestes caspases al miocardi, sinó que es tracta d'una conseqüència secundària a la manca d'aquestes proteases en un altre tipus cel·lular o teixit; aquest fet no és únic, sinó que a més, és similar al cas de la Caspasa 8, ja que mitjançant el cultiu d'embrions sencers deficientes en Caspasa 8 [116] es reverteix el desenvolupament cardíac anormal que presenten els ratolins amb una manca global d'aquest gen [117], indicant que la manca de Caspasa 8 no està directament involucrada en el desenvolupament d'aquest fenotip cardíac i que aquest es deu a les malformacions causades per la manca de Caspasa 8 a la placenta [116].

2-Les caspases participen en la regulació post-transcripcional de PTB, i per tant, en la diferenciació del múscul cardíac.

La Polypyrimidine tract binding protein (PTB) és una proteïna d'interacció al RNA coneguda sobretot per la seva funció en la regulació del *splicing* alternatiu de diversos trànscrips, incloent els que codifiquen per proteïnes del sarcòmer [33, 34], a més, participa en la traducció de proteïnes apoptòtiques durant la diferenciació dels cardiomiòcits [35]; suggerint una contribució important de PTB en el control post-transcripcional durant la diferenciació muscular. Tot i la seva importància, el coneixement sobre la regulació de les vies de senyalització que controlen l'expressió de PTB en les cèl·lules musculars és limitat i deriva sobretot d'estudis en la línia cel·lular de mioblasts C2C12 [333]. Estudis del nostre grup demostren que PTB està regulada post-transcripcionalment, ja que mentre que els nivells de proteïna disminueixen durant el desenvolupament cardíac, els nivells de mRNA es mantenen

[35, 334]. Un treball amb línies cel·lulars mostra com les caspases estan implicades en el tall de PTB [323], indicant un possible rol de les caspases en aquesta regulació post-transcripcional. Els nostres resultats *in vivo* amb ratolins deficientes en Caspasa 3 i Caspasa 7 en el miocardi mostren com la manca d'aquestes caspases executores suposa un augment en els nivells de proteïna de PTB, mentre que el seu transcrit es manté constant, demostrant la funció de les caspases en la regulació post-transcripcional de PTB i suggerint una implicació de les caspases en el control del *splicing* dependent de PTB que es porta a terme durant el període embrional del desenvolupament cardíac.

Els factors de transcripció Myocyte-enhancer factor-2 (Mef2) estan implicats en la diferenciació de les cèl·lules musculars [24], i en concret, són necessaris per a la diferenciació i creixement dels cardiomiòcits [25]. La manca de Mef2a i Mef2c suposa alteracions greus en la morfologia cardíaca [26, 29], mentre que Mef2d està implicat en la resposta del miocardi adult a l'estrès [30]. L'exó β és un exó dels gens Mef2 que els converteix en una variant transcripcionalment més forta [335] i que la seva inclusió augmenta amb la diferenciació [28]. Resultats previs del nostre grup demostren que PTB participa en el *splicing* alternatiu dels gens Mef2, tot evitant la inclusió d'aquest exó i potenciant la forma de Mef2 més embrionària [32]. Aquest treball mostra com la manca de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits *in vivo* suposa una reducció en la inclusió de l'exó β en els transcrits de Mef2a i Mef2d i un augment en l'expressió de la seva forma embrionària, en concordança amb el fet que l'absència de caspases suposa un augment en l'abundància de PTB. En resum, els resultats d'aquest estudi demostren que les caspases regulen post-transcripcionalment l'abundància de PTB *in vivo*, la reducció de l'expressió del qual permet la inclusió de l'exó β en els transcrits de Mef2a i Mef2d, donant lloc a una forma madura i més activa dels transcrits; i per tant, indica un rol de les caspases, independent de l'apoptosi, en la diferenciació del múscul cardíac.

3-Els cors sense Caspasa 3 i Caspasa 7 tenen menys cardiomiòcits i compensen aquest dèficit desenvolupant hipertròfia.

Les caspases, tal com mostrem en l'inici d'aquest estudi i com mostren també altres estudis ja publicats [95, 97-99], són silenciades durant el desenvolupament en el teixit cardíac, això significa que la funció que porten a terme en els cardiomiòcits té lloc durant els estadis embrionals o neonatals, quan les caspases encara s'expressen; en conseqüència, qualsevol fenotip cardíac que presenti un ratolí KO per qualsevol caspasa deriva de la manca de dit gen durant l'inici del desenvolupament, ja que en estadis adults es podria considerar que els animals WT són "KO naturals" per les caspases.

El nostre estudi mostra que els cors dels ratolins neonatals DKO són més petits que els WT degut a un inferior nombre de cardiomiòcits, justificat per una disminució en la proliferació, com mostra l'inferior percentatge de cèl·lules positives per PCNA en aquests cors i la disminució en l'expressió de gens implicats en els processos de replicació del DNA i divisió cel·lular; implicant, doncs, una funció d'aquestes caspases en la proliferació dels cardiomiòcits. El nostre estudi, a més, mostra com els cors adults tenen pràcticament un 50% més de cardiomiòcits que els cors neonatals, això va en contra del dogma de l'aturada de la proliferació just després del naixement [8, 9, 280], però un estudi recent va en línia dels nostres resultats, ja que demostra com a P15 es produeix un pic de proliferació que augmenta pràcticament en un 40% el nombre de cardiomiòcits, i que determina el nombre final de cardiomiòcits en el cor adult [336].

L'efecte observat en els DKO és semblant al de l'estudi d'Abdul-Ghani et al. en el sentit que la inhibició de Caspasa 3 o de Caspasa 8 en cors embrionals en desenvolupament comporta una disminució en el nombre de cardiomiòcits diferenciats [149]; aquest estudi demostra que la via no-canònica de Wnt promou la diferenciació dels cardiomiòcits suprimint la via canònica tot tallant β -catenina mitjançant l'activació de la via extrínseca d'apoptosi. Els nivells de β -catenina dels nostres cors neonatals i joves deficients en Caspasa 3 i Caspasa 7 no mostren diferències respecte els dels cors WT, en concordança amb els nostres resultats *in vitro* amb cardiomiòcits neonatals transduïts amb lentivirus que sobre-expressen Caspasa 3

i Caspasa 7, que tampoc mostren diferències en els nivells d'aquesta proteïna quan són comparats amb els dels cardiomiòcits control. Per contra, els nivells de β -catenina en les cèl·lules P19 de l'estudi d'Abdul-Ghani et al. tractades amb inhibidors de les Caspases 3 o 8 són més elevats [149], demostrant que el fenomen observat no és el mateix. D'una banda l'estudi d'Abdul-Ghani mostra com Caspasa 8 i Caspasa 3 són necessàries per a la diferenciació dels cardiomiòcits perquè intervenen en el procés de la inactivació de β -catenina, l'excés de la qual suposa una disminució en la diferenciació i, per tant, en el nombre de cardiomiòcits totalment diferenciats que formaran el cor, sense demostració evident de canvis reals en el nombre de cèl·lules i per tant, en la proliferació [149]. D'altra banda, el nostre estudi demostra com la manca de les caspases executores 3 i 7 suposa la formació d'un cor més petit degut a un inferior nombre de cardiomiòcits, implicant doncs, un rol de les caspases 3 i 7 en la proliferació dels cardiomiòcits, i no, a priori, en la completa diferenciació d'aquests.

A mesura que els ratolins del nostre treball es fan adults, les diferències en el pes dels cors entre DKO i WT s'eliminen, això és degut a la hipertròfia que desenvolupen els cardiomiòcits DKO, en animals joves només els del septo i en els adults també els del ventricle esquerre. La disminució en el nombre de cardiomiòcits, i inferior mida del cor, causada per la manca de Caspasa 3 i Caspasa 7, és compensada per un augment en la mida d'aquests, que acaba donant lloc a un cor adult amb les mateixes dimensions que el WT. El que es produeix, doncs, és una hipertròfia adaptativa per fer front al dèficit de cardiomiòcits i que no es pot considerar directament relacionada amb l'activitat caspasa ja que succeeix a edats en que les caspases han desaparegut al cor normal. Aquesta forma d'hipertròfia que desenvolupen no suposa canvis en la funció cardíaca dels animals DKO ni en la seva resposta a l'inductor hipertròfic isoproterenol, que després de 7 dies d'administració provoca el mateix grau d'hipertròfia en cors WT i DKO, i els valors coincideixen amb els dels estudis publicats utilitzant les mateixes condicions [30]. Per contra, un estudi amb cardiomiòcits primaris neonatals *in vitro* demostra com el tractament amb agonistes hipertròfics comporta una activació de les caspases 3 i 9, la inhibició de les quals mitjançant inhibidors químics (*z-DEVD-fmk* per Caspasa 3 i *z-LEHD-fmk* per Caspasa 9) suposa una mida més petita de les cèl·lules quan són tractades amb el mateix agonista en comparació a les cèl·lules control [148]. El mateix estudi demostra com la sobre-

expressió de p35, una proteïna potencialment inhibidora de les caspases [176], en cors tractats amb inductors d'hipertròfia comporta una disminució en el grau d'hipertròfia desenvolupat i en els nivells d'expressió del marcador prohipertròfic NPPA [148], cal tenir en compte, però, que és probable que p35 porti a terme altres funcions a més de la inhibició de les caspases i l'efecte observat no es degui únicament a la inhibició de les caspases. Els nostres resultats, per contra, demostren que la manca de les caspases 3 i 7 des de les primeres fases de la cardiogènesi, assegurada pel control de la recombinasa Cre pel promotor del gen cardiogènic Nkx-2.5, comporta el desenvolupament d'una hipertròfia adaptativa en els cors adults, acompanyat d'un augment important en l'expressió de NPPA, que a més de ser un marcador hipertròfic, diversos estudis l'identifiquen com un marcador de la fallada cardíaca, que pot ser causada, entre d'altres, per una cardiomiopatia hipertròfica, hipertensió o cardiomiopatia dilatada [337]. En el nostre estudi, la hipertròfia que desenvolupen els cors DKO no és una conseqüència directa de la manca de les caspases, sinó que es produeix segurament en resposta a l'inferior nombre de cèl·lules i per a poder portar a terme la funció cardíaca de manera normal, a més, la hipertròfia comença a desenvolupar-se quan el ratolí és jove i, com mostrem, ja no expressa de manera natural les caspases, confirmant que no hi ha vincle directe entre les caspases i la hipertròfia i que ve de fets que s'han desencadenat abans. Per contra, en l'estudi de Putinski et al. la inhibició de les caspases sí que afecta directament la resposta als inductors hipertròfics, però el fet de treballar amb inhibidors suposa una diferència respecte el nostre estudi, ja que el miocardi dels cors DKO no ha expressat mai les caspases 3 i 7 i la seva manca ha alterat vies de senyalització i processos que el tractament amb inhibidors no pot imitar.

Estudis anteriors amb altres tipus cel·lulars ja havien demostrat la implicació de la Caspasa 3 en la proliferació, tot i que existeix certa discrepància sobre si la funció és inhibidora o estimuladora de la proliferació. Així doncs, per exemple mentre que un estudi amb cèl·lules limfoides demostra que la Caspasa 3 és necessària per a la proliferació mitjançant el tall que fa de p27 [134], un altre amb cèl·lules B defensa que la Caspasa 3 actua com a regulador negatiu de la proliferació [131]. El que està clar, però, i la gran quantitat d'estudis publicats sobre el tema ho demostra, és que les

caspases porten a terme un ampli ventall de funcions que no tenen relació amb l'apoptosi, i que en molts casos són funcions específiques de teixit o tipus cel·lular.

4-Els estudis transcriptòmics i proteòmics evidencien alteracions en l'expressió de gens implicats en la proliferació cel·lular en neonatals, probablement degut a l'activació de processos inflamatoris en els cors deficients en caspases executores.

Els nostres resultats demostren que el problema en la proliferació que presenten els cardiomiòcits mancats de les caspases 3 i 7 està associat a una caiguda en l'expressió dels gens implicats en la replicació del DNA i en processos de regulació i progressió del cicle cel·lular, tals com la CycE, Cdc6 o PolD1, més evident en els animals neonatals que en els adults, degut a que aquests gens durant el desenvolupament dels cardiomiòcits són silenciats postnatalment perquè s'atura la seva proliferació [278-280]. La manca en el peix zebra de NdrG4, un gen que s'expressa únicament en el sistema nerviós central i teixit cardíac, suposa una reducció en la proliferació dels cardiomiòcits i resulta en un mal desenvolupament cardíac [327], l'expressió d'aquest gen també es troba molt disminuïda en els cors DKO, suggerint la seva implicació en la proliferació dels cardiomiòcits. Fam107a, un inhibidor de cicle cel·lular, s'ha trobat, a més, implicat en la resposta a l'estrès en el cervell [338]; en el nostre model, aquest gen es troba sobre-expressat en els cors adults DKO, demostrant possiblement l'estrès al que es troben sotmesos per a poder desenvolupar la funció cardíaca amb menys cèl·lules.

El nostre treball mostra com l'expressió de gens de diversos grups funcionals presenta una tendència diferent segons el genotip. Així doncs, com s'ha comentat, els gens de progressió del cicle cel·lular i gens implicats en la replicació, recombinació i reparació del DNA es troben menys expressats en els cors DKO neonatals, en resposta directa a la manca de les caspases efectores 3 i 7. Per contra, els gens d'inhibició de cicle cel·lular es troben més expressats en els DKO joves, confirmant un alentiment del cicle i una inferior proliferació. Els gens del sarcòmer i estructurals es troben importantment menys expressats en els DKO, mostrant un canvi adaptatiu important

en els cors DKO que es desenvolupa amb l'edat per tal de fer front al nombre insuficient de cardiomiòcits i que va associat al desenvolupament de la hipertròfia. El fet que en animals neonatals l'expressió d'aquests gens sigui similar en els dos genotips mostra com no és una conseqüència directa de la manca de caspases sinó que és un efecte secundari adaptatiu que es desenvolupa degut al dèficit en la proliferació causat per la manca de les caspases 3 i 7. L'expressió més elevada en els cors joves DKO de gens implicats en el desenvolupament i formació cardíaca, com Hand2 i Gata5, la funció dels quals és essencial durant el període embrional [23, 41], dóna força a la idea que els cors DKO es troben sotmesos a un procés d'adaptació que comporta una alteració en l'expressió de gens implicats en el desenvolupament, així com gens estructurals; adaptació que acaba donant lloc a un cor hipertròfic capaç d'assolir les dimensions normals que li corresponen i funcionar correctament.

En el nostre estudi, la manca d'una de les dues caspases genera efectes diferents en funció de quina sigui la caspasa absent. Això demostra primer que totes dues caspases són responsables del fenotip que observem en els ratolins DKO. D'altra banda, observem que Caspasa 3 pot compensar la manca de Caspasa 7, tal com l'estudi del KO global de Caspasa 7 havia demostrat [194]; per contra, en el nostre model Caspasa 7 només és capaç de compensar part de la funció de Caspasa 3, mentre que un estudi demostra que, en el cervell dels ratolins C57/BL6, Caspasa 7 és capaç de portar a terme completament la funció apoptòtica de Caspasa 3 [115]. Una possibilitat és que donada la diferent expressió subcel·lular que tenen les dues caspases [322] i que també hem observat nosaltres, Caspasa 7 només és capaç de suplir la funció de la part de Caspasa 3 al citosol, on comparteixen localització, mentre que és incapaç de suplir la funció de la Caspasa 3 mitocondrial, on la 7 pràcticament no està expressada.

L'estudi proteòmic per iTRAQ que hem portat a terme ens ha permès identificar quines són les proteïnes expressades més diferentment entre els cors WT i DKO neonatals, edat més important a analitzar donat que és quan les caspases encara s'expressen de forma natural. La proteïna amb més canvi en l'expressió és α 1-ACT, codificada pel gen *Serpina3* [339]. Es tracta d'una proteïna típicament extracel·lular, que s'ha descrit que és produïda i secretada a la circulació pel fetge en resposta a la inflamació, on inhibeix proteases derivades dels leucòcits per tal de limitar el dany tissular [339]. Tot i això, s'ha demostrat *in vitro* que té capacitat per unir-se al DNA i

s'ha detectat en el nucli de cèl·lules de mamífers, on la seva funció és força desconeguda [340, 341]. Un estudi molt recent amb hepatòcits demostra com $\alpha 1$ -ACT està implicada en la proliferació cel·lular, ja que la seva sobre-expressió comporta una disminució en la proliferació, evidenciada per una disminució en l'expressió de CycD i en el marcatge de PCNA i Ki-67 [318]. Aquest estudi, doncs, concorda amb els nostres resultats, on els cardiomiòcits DKO, amb un defecte de proliferació, expressen més $\alpha 1$ -ACT, que és un inhibidor de la proliferació en el fetge [318]. A més, el nostre treball *in vitro* amb cardiomiòcits neonatals sobre-expressors de Serpina3 demostra com aquesta està implicada en la inhibició de la proliferació en aquest tipus cel·lular, tot i no ser la única responsable del fenotip presentat en aquest treball. Els nivells de mRNA de Serpina3 en els cors DKO també són més abundants que en els WT, indicant que no es produeix cap regulació post-transcripcional per part de les caspases, sinó que ja es troba alterada la seva transcripció. El treball amb cardiomiòcits *in vitro*, a més de confirmar el paper de les caspases en la regulació de la seva expressió, aporta informació nova sobre la localització de Serpina3, ja que demostra la seva presència en els cardiomiòcits. A més a més, Serpina3 ha estat identificada, igual que NPPA, per diversos estudis com un marcador de fallada cardíaca, associada amb diverses alteracions moleculars i cel·lulars, com l'estrès oxidatiu o una senyalització anormal de les citoquines [337].

Com s'ha comentat, l'expressió de Serpina3 s'indueix en resposta a la inflamació, en concret, s'ha publicat que sobretot respon a IL-1, OSM i TNF- α [331]. Els nostres resultats proteòmics i de l'array de citoquines demostren com la IL-1 α , una de les principals mediadores de la resposta inflamatòria [342], i que en els fibroblasts cardíacs estimula l'expressió d'altres citoquines proinflamatòries [343], està força més expressada en els cors DKO neonatals que en els WT; C5/C5a és una altra de les proteïnes que es troba expressada de forma més abundant en els cors DKO neonatals, amb una funció important en la mediació de la resposta inflamatòria, altres patologies com la resposta a la isquèmia-reperfusió [344], i l'absència de la qual suposa una predisposició a una disfunció cardíaca [345]. Aquesta alteració en l'expressió de les citoquines que presenten els cors neonatals DKO en resposta a la manca de les caspases 3 i 7 podria estar induint l'expressió de proteïnes amb efectes anti-proliferatius, com és el cas de $\alpha 1$ -ACT. A més, la implicació de les caspases en la

resposta inflamatòria no és nova, ja que hi ha força estudis que demostren com per exemple Caspasa 1 o Caspasa 8 participen en la seva activació [123-125, 128, 129].

A més d'aportar informació sobre quines són les proteïnes l'expressió de les quals varia més entre els cors neonatals WT i DKO, l'estudi proteòmic per iTRAQ demostra que els cors DKO i WT presenten una tendència diferent en l'expressió de diverses proteïnes, és a dir, mentre que una proteïna augmenta clarament amb l'edat en el WT, en el DKO disminueix, i viceversa. Aquest és el cas de la NAD(P) transhidrogenasa, una proteïna que s'expressa de manera similar en l'edat neonatal en els dos genotips, però que la seva expressió augmenta clarament amb l'edat en el cor WT mentre que en el DKO disminueix. De manera important, en concordança amb els nostres resultats que demostren el desenvolupament d'una hipertròfia adaptativa amb l'edat en els cors DKO, un estudi demostra com la NAD(P) transhidrogenasa s'inactiva en resposta a un desenvolupament hipertròfic [346]. Un altre estudi va més enllà i demostra com la disminució en l'expressió de NAD(P) a més de tractar-se d'un marcador d'hipertròfia és un marcador d'estrès oxidatiu, res estrany tenint en compte que aquesta proteïna és una reguladora de l'estat redox i l'energia mitocondrial [347]. Aquest estudi, juntament amb l'estudi de Dai et al. que mostra com l'estrès oxidatiu causat per l'acumulació de ROS mitocondrial participa en el desenvolupament hipertròfic [348], indica que possiblement valdria la pena estudiar si en el nostre model el desenvolupament de la hipertròfia va acompanyat d'una alteració en la producció de ROS.

El treball *in vitro* amb cardiomiòcits neonatals de rata ens ha ajudat a confirmar els resultats observats *in vivo*, ja que la sobre-expressió de les caspases 3 i 7 en els cardiomiòcits produeix l'efecte contrari a la seva manca en els cors neonatals, un augment en l'expressió dels gens de cicle. Mitjançant la mutació del centre catalític de les caspases i, per tant, eliminant la seva activitat proteolítica, hem pogut anar més enllà en l'estudi del mecanisme molecular mitjançant el qual les caspases participen en la proliferació i comporten el fenotip observat. Els nostres resultats demostren com l'efecte en l'expressió dels gens implicats en la regulació del cicle cel·lular causat per la sobre-expressió de les caspases amb el centre catalític mutat és el mateix que el que comporta la sobre-expressió de les caspases 3 i 7 en la seva forma natural, demostrant que aquesta funció no apoptòtica de les caspases 3 i 7 en el desenvolupament cardíac

és independent de la seva activitat proteolítica i depèn de la seva activitat en forma pro-caspasa.

Les interaccions entre dominis de proteïna-proteïna juguen un paper important en moltes vies de transducció de senyals intracel·lulars [349]. D'entre els principals dominis d'interacció proteïna-proteïna es troben el motiu CARD (Caspase-Activation Recruitment Domain), present per exemple en el prodomini de les caspases 1 i 2, i el motiu DED (Death Effector Domain), present en el prodomini de les caspases 8 i 10 [55]. Cada cop més estudis demostren la importància de les caspases en processos més enllà de la mort cel·lular; ara alguns estudis comencen a descriure mecanismes iniciats per les caspases independentment de la seva activitat proteolítica. És el cas de Caspasa 1, que a més d'activar la IL-1 β mitjançant el tall proteolític de la seva forma inactiva pro-IL-1 β [123, 124] s'ha trobat que és capaç d'activar la via NF- κ B i p38 MAPK independentment de la seva activitat enzimàtica [350]. El mateix s'ha descrit per la Caspasa 2, capaç d'activar la via NF- κ B independentment de la seva activitat enzimàtica i gràcies al domini CARD N-terminal [351]. En la mateixa línia, la Caspasa 8 i la Caspasa 10, dues caspases típicament iniciadores de l'apoptosi, són capaces d'interaccionar amb múltiples proteïnes involucrades en l'activació de la via NF- κ B gràcies als seus dominis DED i independentment de la seva funció proteolítica [352, 353]. En resum, el que aquests estudis demostren és que les caspases de prodomini llarg, amb dominis CARD o DED, són capaces de portar a terme funcions més enllà de la seva activitat enzimàtica gràcies a la interacció proteïna-proteïna dels seus dominis. Les caspases 3 i 7, per contra, són dues caspases de prodomini curt, el qual no inclou cap domini CARD o DED [55] i, per tant, la funció no apoptòtica que nosaltres observem i que sembla independent de l'activitat enzimàtica, no pot explicar-se pel mateix principi que les funcions de per exemple Caspasa 8 o Caspasa 1. Molt recentment, però, un estudi demostra com la Caspasa 3 en la seva forma de pro-caspasa i independentment de la seva activitat catalítica controla l'adhesió cel·lular dels MEFs tot regulant la secreció de fibronectina, necessària per a l'adhesió de les cèl·lules [354]. El que aquest estudi demostra, juntament amb els nostres resultats, és que més enllà de les funcions típiques de les caspases existeixen altres funcions, possiblement encara desconegudes, que sovint no requereixen els mateixos dominis o el mateix tipus d'activitat.

5-La mort dels cardiomiòcits en processos d'Isquèmia / Reperfusió és independent de caspases.

El debat sobre la implicació de l'apoptosi i la via dependent de caspases en el dany per processos isquèmics és viu. Mentre que alguns estudis demostren que la mort que es produeix en els cardiomiòcits és dependent de caspases [234-236], altres defensen que té lloc una mort necròtica on les caspases no hi tenen cap implicació [238-240]. El mateix passa amb la mort cel·lular causada per la reperfusió i coneguda com a dany per reperfusió, on sembla que la teoria de la mort per necrosi executada per les calpaïnes i la disrupció de l'homeòstasi del Ca^{2+} , independent de l'apoptosi dependent de caspases, va guanyant terreny [242, 243, 247]. Els nostres resultats demostren que després de 45min d'isquèmia *in situ* seguits de 24h o 28 dies de reperfusió, els cors deficientes en Caspasa 3 i Caspasa 7 presenten la mateixa àrea d'infart respecte l'àrea de risc i la mateixa àrea fibròtica que els cors WT. La tinció per Pricosirius Red, a més, revela que no hi ha diferències entre els cors WT i DKO en el grau de dilatació ventricular, severa en tots dos casos, ni en el remodelat ventricular que es produeix després de la isquèmia i que es caracteritza, sobretot, per un aprimament important de la paret. Tot això demostra de manera directa i per primera vegada *in vivo* que les caspases no estan implicades en la mort dels cardiomiòcits causada per processos d'isquèmia/reperfusió (I/R), ja que si fos així, els cors DKO serien més resistents al dany causat per la I/R. El nostre estudi, doncs, és una mostra *in vivo* que l'apoptosi dependent de caspases no està implicada en la mort dels cardiomiòcits deguda a processos d'I/R, confirmant estudis previs del nostre grup que demostren *in vitro* que les caspases no es reactiven durant la isquèmia i que, per tant, la mort dels cardiomiòcits que segueix els processos isquèmics és independent de les caspases [103, 104].

6- La diferència de pes entre els cors de diferent sexe es deu a un inferior nombre de cardiomiòcits en les femelles.

Es considera que el nombre de cardiomiòcits es determina durant el primer any de vida en humans [7], o la primera setmana de vida en rosegadors, quan la seva activitat de proliferar es para [8, 9]. L'augment en la mida del cor que es produeix a partir d'aquí es deu a canvis en la mida dels cardiomiòcits, un procés conegut com hipertròfia. Diferents estudis demostren diferències estructurals i d'adaptació entre els cors dels mascles i femelles [355], una de les diferències és el 30% de més massa ventricular que presenten els mascles adults respecte les femelles [356], que tenen, per tant, un cor més petit. Tot i que hi ha força controvèrsia sobre la manera de fer les mesures i la seva fiabilitat [357], en adults la diferència sembla clara i és estadísticament significativa; els estudis en nens, per contra, no són tan clars, tot i això però, els resultats semblen indicar que hi ha una tendència en que els nens presenten més massa ventricular que les nenes: entre un 6-8% segons l'estudi de de Simone et al. [356] i un 10% segons Goble et al. [358]. Alguns estudis, assumint que els cors dels nens i nenes no tenen diferències importants en el pes, apunten a que aquesta diferència segons el sexe en la massa dels cors adults es deu a una hipertròfia més accentuada en les cèl·lules dels mascles en condicions normals després de la pubertat [355, 356]. Els nostres resultats en ratolins, però, indiquen que les cèl·lules dels cors de mascles i femelles, tant adults com neonatals, tenen la mateixa mida, a més, el mètode que hem utilitzat per a la mesura de l'àrea de les cèl·lules ha demostrat ser prou sensible per a mostrar diferències, ja que sí que mostra diferències segons el genotip i segons l'edat dels ratolins. El fet que alguns estudis indiquen que els cors dels nens ja pesen més que els de les nenes [358], mostra que la causa no pot ser la hipertròfia que es desenvolupa després de la pubertat, i que ha d'originar-se abans. Els nostres resultats indiquen que les femelles neonatals tenen aproximadament un 10% menys de cardiomiòcits que els mascles de la mateixa edat, una diferència que es manté amb l'edat. Això explica que els cors dels mascles pesin més que els cors de les femelles ja des del començament.

Aquesta diferència en el nombre de cardiomiòcits suggereix que en els mascles la proliferació va més ràpida que en femelles, una possible causa és l'efecte de les hormones, les quals diversos estudis impliquen en la proliferació, és per exemple el cas de l'estudi de Cai et al. que demostra com l'androgen estimula la proliferació de les cèl·lules endotelials [359] o diversos estudis com el de Järvinen et al. que relacionen els receptors d'estrogen amb la proliferació de les cèl·lules tumorals en el càncer de mama [360]. A més, existeix un dimorfisme sexual en el fenotip cardíac de diversos models de ratolí [361], la causa del qual apunta molts cops al paper de les hormones, sobretot l'hormona sexual femenina, l'estrogen, que sembla tenir un paper protector davant diverses patologies cardíques [361, 362]. Es tracta, doncs, d'un tema molt interessant i el qual cal explorar ja que podria explicar l'origen d'algunes cardiomiopaties hipertròfiques de les que no es coneix l'origen i que podrien estar fonamentades en un inferior nombre de cardiomiòcits al néixer.

7-Comentaris finals.

En resum, aquest treball demostra com el fet que les caspases se silenciïn amb l'edat en el miocardi es deu a que la seva funció té importància durant el desenvolupament, en concret, les caspases 3 i 7 estan implicades en una correcta proliferació dels cardiomiòcits. La manca de dites caspases, que, en contra del dogma, no representa un avantatge de supervivència en situació d'isquèmia / reperfusió, comporta la formació d'un cor més petit, amb menys cardiomiòcits, que per a poder portar a terme la funció correctament pateix una adaptació compensatòria a mesura que es fa adult en forma d'hipertròfia, acompanyada d'un canvi en l'expressió de diverses famílies de gens. Molecularment, el nostre estudi demostra com la manca de les caspases 3 i 7 suposa un augment en l'expressió de citoquines inflamatòries, que podrien comportar un augment en l'expressió de reguladors negatius de la proliferació, com Serpina3. A més, els nostres resultats demostren com aquesta funció no apoptòtica de les caspases 3 i 7 és independent de la seva activitat catalítica.

Conclusions

Conclusió general: Les caspases estan implicades en el correcte desenvolupament del miocardi, on influencien el procés de divisió cel·lular. En canvi, els nostres resultats descarten una funció de les caspases en el procés de mort per isquèmia/reperfusió.

En concret, els nostres resultats permeten definir les següents conclusions:

Primera: Les caspases regulen l'abundància de PTB post-transcripcionalment en el cor influenciant la maduració de mRNAs afectant els canvis durant el desenvolupament.

Segona: La letalitat i l'alteració en la compactació ventricular durant el desenvolupament cardíac causats per la manca global de les caspases 3 i 7 no es deu a la manca de dits gens en el miocardi.

Tercera: Els ratolins deficientes en Caspasa3 i Caspasa7 en els cardiomiòcits tenen cors més petits degut a un inferior nombre de cèl·lules, que compensen desenvolupant una hipertròfia lleu que dona lloc a un cor adult amb les mateixes dimensions que el cor WT.

Quarta: La manca de caspases executores en el miocardi en desenvolupament indueix una reducció en l'expressió de gens relacionats amb la proliferació i replicació del DNA, i alteracions en l'expressió de gens estructurals.

Cinquena: Caspasa 3 pot compensar la manca de Caspasa 7, però Caspasa 7 només pot compensar parcialment la manca de Caspasa 3 en el miocardi en desenvolupament.

Sisena: La funció de les caspases 3 i 7 en el desenvolupament cardíac és independent de la seva activitat catalítica, requerida per les seves funcions com a proteases apoptòtiques.

Setena: Els cors dels ratolins deficientes en Caspasa 3 i Caspasa 7 tenen un augment en l'expressió d'algunes citoquines que s'associa amb un augment en l'expressió de gens com Serpina3, que en els cardiomiòcits influencia l'expressió de gens implicats en la proliferació.

Vuitena: Els cardiomiòcits dels cors de les femelles tenen la mateixa mida que els dels mascles, mentre que el cor té una massa menor. Els nostres resultats mostren que, en

ratolins, els cors de les femelles tenen menys cardiomiòcits que els dels mascles, justificant la diferència en el pes del cor.

Novena: La mort dels cardiomiòcits per processos d'isquèmia/reperfusió en els cors de ratolí és independent de caspases.

Bibliografia

1. Xin, M., E.N. Olson, and R. Bassel-Duby, *Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013.
2. Sommer, J.R. and R.A. Waugh, *Ultrastructure of heart muscle*. Environ Health Perspect, 1978. **26**: p. 159-67.
3. Severs, N.J., *The cardiac muscle cell*. Bioessays, 2000. **22**(2): p. 188-99.
4. Beyer, E.C., D.L. Paul, and D.A. Goodenough, *Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2621-9.
5. Huxley, A.F., *Muscular contraction*. J Physiol, 1974. **243**(1): p. 1-43.
6. Brilla, C.G., J.S. Janicki, and K.T. Weber, *Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries*. Circ Res, 1991. **69**(1): p. 107-15.
7. Zak, R., *Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells*. Circ Res, 1974. **35**(2): p. suppl II:17-26.
8. Li, F., et al., *Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(8): p. 1737-46.
9. Leu, M., E. Ehler, and J.C. Perriard, *Characterisation of postnatal growth of the murine heart*. Anat Embryol (Berl), 2001. **204**(3): p. 217-24.
10. Srivastava, D., *Genetic assembly of the heart: implications for congenital heart disease*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 451-69.
11. Harvey, R.P., *NK-2 homeobox genes and heart development*. Dev Biol, 1996. **178**(2): p. 203-16.
12. Fishman, M.C. and E.N. Olson, *Parsing the heart: genetic modules for organ assembly*. Cell, 1997. **91**(2): p. 153-6.
13. Olson, E.N., *A decade of discoveries in cardiac biology*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 467-74.
14. Buckingham, M., S. Meilhac, and S. Zaffran, *Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(11): p. 826-35.
15. Cai, C.L., et al., *Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart*. Dev Cell, 2003. **5**(6): p. 877-89.
16. Srivastava, D., *Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1037-48.
17. Olson, E.N., *Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1922-7.
18. Lien, C.L., et al., *Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer*. Development, 1999. **126**(1): p. 75-84.
19. Lyons, I., et al., *Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1654-66.
20. Bruneau, B.G., *Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 509-19.
21. Charron, F. and M. Nemer, *GATA transcription factors and cardiac development*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(1): p. 85-91.
22. Narita, N., M. Bielinska, and D.B. Wilson, *Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells*. Development, 1997. **124**(19): p. 3755-64.
23. Reiter, J.F., et al., *Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2983-95.
24. Black, B.L. and E.N. Olson, *Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 167-96.
25. Potthoff, M.J. and E.N. Olson, *MEF2: a central regulator of diverse developmental programs*. Development, 2007. **134**(23): p. 4131-40.
26. Lin, Q., et al., *Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1404-7.
27. Vong, L.H., M.J. Ragusa, and J.J. Schwarz, *Generation of conditional Mef2^{loxP}/loxP mice for temporal- and tissue-specific analyses*. Genesis, 2005. **43**(1): p. 43-8.
28. Yu, Y.T., et al., *Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors*. Genes Dev, 1992. **6**(9): p. 1783-98.
29. Naya, F.J., et al., *Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1303-9.
30. Kim, Y., et al., *The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 124-32.

31. Stewart, A.A., et al., *Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80)*. FEBS Lett, 1982. **137**(1): p. 80-4.
32. Ye, J., et al., *Translation of Myocyte Enhancer Factor-2 is induced by hypertrophic stimuli in cardiomyocytes through a Calcineurin-dependent pathway*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(4): p. 578-87.
33. Keppetipola, N., et al., *Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(4): p. 360-78.
34. Mulligan, G.J., et al., *Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25480-7.
35. Zhang, J., et al., *Polypyrimidine tract binding proteins (PTB) regulate the expression of apoptotic genes and susceptibility to caspase-dependent apoptosis in differentiating cardiomyocytes*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1460-8.
36. Ye, J., et al., *A pathway involving HDAC5, cFLIP and caspases regulates expression of the splicing regulator polypyrimidine tract binding protein in the heart*. J Cell Sci. **126**(Pt 7): p. 1682-91.
37. Bruneau, B.G., et al., *A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease*. Cell, 2001. **106**(6): p. 709-21.
38. Moorman, A.F. and V.M. Christoffels, *Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1223-67.
39. Srivastava, D. and E.N. Olson, *A genetic blueprint for cardiac development*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 221-6.
40. Yelon, D., et al., *The bHLH transcription factor hand2 plays parallel roles in zebrafish heart and pectoral fin development*. Development, 2000. **127**(12): p. 2573-82.
41. Srivastava, D., et al., *Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND*. Nat Genet, 1997. **16**(2): p. 154-60.
42. Riley, P.R., et al., *Early exclusion of hand1-deficient cells from distinct regions of the left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos*. Dev Biol, 2000. **227**(1): p. 156-68.
43. Yamagishi, H., et al., *The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation*. Dev Biol, 2001. **239**(2): p. 190-203.
44. Dodou, E., et al., *Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development*. Development, 2004. **131**(16): p. 3931-42.
45. von Both, I., et al., *Foxh1 is essential for development of the anterior heart field*. Dev Cell, 2004. **7**(3): p. 331-45.
46. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
47. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1463-7.
48. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
49. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
50. Yuan, J., et al., *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. Cell, 1993. **75**(4): p. 641-52.
51. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
52. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
53. Thornberry, N.A., et al., *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17907-11.
54. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3179-84.
55. Lamkanfi, M., et al., *Caspases in cell survival, proliferation and differentiation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 44-55.
56. Hofmann, K., *The modular nature of apoptotic signaling proteins*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(8-9): p. 1113-28.
57. Muzio, M., et al., *An induced proximity model for caspase-8 activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2926-30.
58. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 897-907.

59. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
60. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
61. Fesik, S.W. and Y. Shi, *Structural biology. Controlling the caspases*. Science, 2001. **294**(5546): p. 1477-8.
62. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
63. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
64. Widlak, P. and W.T. Garrard, *Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G*. J Cell Biochem, 2005. **94**(6): p. 1078-87.
65. Irmmler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
66. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 2001. **15**(22): p. 2922-33.
67. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
68. Zou, H., et al., *An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
69. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
70. Chai, J., et al., *Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 855-62.
71. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
72. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
73. Tsujimoto, Y., et al., *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma*. Science, 1985. **228**(4706): p. 1440-3.
74. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
75. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**(4): p. 609-19.
76. Zhang, L.N., J.Y. Li, and W. Xu, *A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Gene Ther. **20**(1): p. 1-7.
77. Sattler, M., et al., *Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 983-6.
78. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
79. Chipuk, J.E., L. Bouchier-Hayes, and D.R. Green, *Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1396-402.
80. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 617-25.
81. Willis, S.N., et al., *Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak*. Science, 2007. **315**(5813): p. 856-9.
82. Youle, R.J., *Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement*. Science, 2007. **315**(5813): p. 776-7.
83. Kroemer, G. and S.J. Martin, *Caspase-independent cell death*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 725-30.
84. Susin, S.A., et al., *Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 571-80.
85. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 268-75.
86. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
87. Garrido, C., et al., *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1423-33.

88. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
89. Vahsen, N., et al., *AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation*. EMBO J, 2004. **23**(23): p. 4679-89.
90. Cote, J. and A. Ruiz-Carrillo, *Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G*. Science, 1993. **261**(5122): p. 765-9.
91. Tiranti, V., et al., *Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis*. Genomics, 1995. **25**(2): p. 559-64.
92. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
93. Suzuki, Y., et al., *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 613-21.
94. Jones, J.M., et al., *Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 721-7.
95. Zhang, J., et al., *Developmental silencing and independency from E2F of apoptotic gene expression in postmitotic tissues*. FEBS Lett, 2007. **581**(30): p. 5781-6.
96. Doss, M.X., et al., *Global transcriptome analysis of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Genome Biol, 2007. **8**(4): p. R56.
97. Hedhli, N., M. Pelat, and C. Depre, *Protein turnover in cardiac cell growth and survival*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(2): p. 186-96.
98. Madden, S.D., M. Donovan, and T.G. Cotter, *Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development*. Int J Dev Biol, 2007. **51**(5): p. 415-23.
99. Yakovlev, A.G., et al., *Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury*. J Neurosci, 2001. **21**(19): p. 7439-46.
100. Donovan, M. and T.G. Cotter, *Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development*. Cell Death Differ, 2002. **9**(11): p. 1220-31.
101. Donovan, M., F. Doonan, and T.G. Cotter, *Decreased expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members during retinal development and differential sensitivity to cell death*. Dev Biol, 2006. **291**(1): p. 154-69.
102. Yakovlev, A.G., et al., *Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury*. J Neurosci, 1997. **17**(19): p. 7415-24.
103. Bahi, N., et al., *Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22943-52.
104. Sanchis, D., et al., *An alternative view of apoptosis in heart development and disease*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(3): p. 448-51.
105. Glucksmann, A., *Cell death in normal development*. Arch Biol (Liege), 1965. **76**(2): p. 419-37.
106. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed cell death in animal development*. Cell, 1997. **88**(3): p. 347-54.
107. Baehrecke, E.H., *How death shapes life during development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 779-87.
108. Cecconi, F., et al., *Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development*. Cell, 1998. **94**(6): p. 727-37.
109. Yoshida, H., et al., *Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development*. Cell, 1998. **94**(6): p. 739-50.
110. Kuida, K., et al., *Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 368-72.
111. Kuida, K., et al., *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9*. Cell, 1998. **94**(3): p. 325-37.
112. Motoyama, N., et al., *Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1506-10.
113. Knudson, C.M., et al., *Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death*. Science, 1995. **270**(5233): p. 96-9.

114. Lindsten, T., et al., *The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1389-99.
115. Houde, C., et al., *Caspase-7 expanded function and intrinsic expression level underlies strain-specific brain phenotype of caspase-3-null mice*. J Neurosci, 2004. **24**(44): p. 9977-84.
116. Sakamaki, K., et al., *Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart*. Cell Death Differ, 2002. **9**(11): p. 1196-206.
117. Varfolomeev, E.E., et al., *Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 267-76.
118. Ya, J., et al., *Normal development of the outflow tract in the rat*. Circ Res, 1998. **82**(4): p. 464-72.
119. Hurle, J.M. and J.L. Ojeda, *Cell death during the development of the truncus and conus of the chick embryo heart*. J Anat, 1979. **129**(Pt 2): p. 427-39.
120. Watanabe, M., et al., *Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death*. Development, 1998. **125**(19): p. 3809-20.
121. Watanabe, M., A. Jafri, and S.A. Fisher, *Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections*. Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 274-88.
122. Yi, C.H. and J. Yuan, *The Jekyll and Hyde functions of caspases*. Dev Cell, 2009. **16**(1): p. 21-34.
123. Cerretti, D.P., et al., *Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Science, 1992. **256**(5053): p. 97-100.
124. Thornberry, N.A. and S.M. Molineaux, *Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death*. Protein Sci, 1995. **4**(1): p. 3-12.
125. Nadiri, A., M.K. Wolinski, and M. Saleh, *The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4239-45.
126. Wang, S., et al., *Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE*. Cell, 1998. **92**(4): p. 501-9.
127. Keller, M., et al., *Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion*. Cell, 2008. **132**(5): p. 818-31.
128. Salmena, L., et al., *Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity*. Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 883-95.
129. Su, H., et al., *Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor*. Science, 2005. **307**(5714): p. 1465-8.
130. Chun, H.J., et al., *Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 395-9.
131. Woo, M., et al., *Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 1016-22.
132. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
133. Yan, X.X., et al., *Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain*. J Comp Neurol, 2001. **433**(1): p. 4-22.
134. Frost, V., et al., *Regulation of p27KIP1 in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines involves non-apoptotic caspase cleavage*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 12): p. 3057-66.
135. Waga, S., et al., *The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA*. Nature, 1994. **369**(6481): p. 574-8.
136. Gervais, J.L., P. Seth, and H. Zhang, *Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 19207-12.
137. De Botton, S., et al., *Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1310-7.
138. Lippens, S., et al., *Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1218-24.
139. Black, S., et al., *Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8*. Cell Death Differ, 2004. **11**(1): p. 90-8.
140. Fernando, P., S. Brunette, and L.A. Megeney, *Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity*. FASEB J, 2005. **19**(12): p. 1671-3.

141. Miura, M., et al., *A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1704-13.
142. Williams, D.W., et al., *Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning*. Nat Neurosci, 2006. **9**(10): p. 1234-6.
143. Nikolaev, A., et al., *APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 981-9.
144. Wang, J.Y., et al., *Caspase-3 cleavage of dishevelled induces elimination of postsynaptic structures*. Dev Cell, 2014. **28**(6): p. 670-84.
145. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. Cell, 2005. **122**(6): p. 947-56.
146. Fujita, J., et al., *Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(6): p. 595-601.
147. Larsen, B.D., et al., *Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4230-5.
148. Putinski, C., et al., *Intrinsic-mediated caspase activation is essential for cardiomyocyte hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013.
149. Abdul-Ghani, M., et al., *Wnt11 promotes cardiomyocyte development by caspase-mediated suppression of canonical Wnt signals*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(1): p. 163-78.
150. Peter, M.E., et al., *The CD95 receptor: apoptosis revisited*. Cell, 2007. **129**(3): p. 447-50.
151. Alderson, M.R., et al., *Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2231-5.
152. Hao, Z., et al., *T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1355-65.
153. Desbarats, J. and M.K. Newell, *Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 920-3.
154. Shinohara, H., et al., *Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1766-72.
155. Desbarats, J., et al., *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 118-25.
156. Zhang, J., et al., *Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 296-300.
157. Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang, *BCL2 family in DNA damage and cell cycle control*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1351-9.
158. Marvel, J., et al., *Growth factor starvation of bcl-2 overexpressing murine bone marrow cells induced refractoriness to IL-3 stimulation of proliferation*. Oncogene, 1994. **9**(4): p. 1117-22.
159. O'Reilly, L.A., D.C. Huang, and A. Strasser, *The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 6979-90.
160. Vairo, G., K.M. Innes, and J.M. Adams, *Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival*. Oncogene, 1996. **13**(7): p. 1511-9.
161. Huang, D.C., et al., *The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry*. EMBO J, 1997. **16**(15): p. 4628-38.
162. Brady, H.J., et al., *Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells*. EMBO J, 1996. **15**(24): p. 6991-7001.
163. Lind, E.F., et al., *Bcl-2-induced changes in E2F regulatory complexes reveal the potential for integrated cell cycle and cell death functions*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5374-9.
164. Linette, G.P., et al., *Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9545-52.
165. Vairo, G., et al., *Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4745-53.
166. Greider, C., et al., *BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases*. Oncogene, 2002. **21**(51): p. 7765-75.
167. Cheng, N., et al., *Bcl-2 inhibition of T-cell proliferation is related to prolonged T-cell survival*. Oncogene, 2004. **23**(21): p. 3770-80.
168. Gil-Gomez, G., A. Berns, and H.J. Brady, *A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis*. EMBO J, 1998. **17**(24): p. 7209-18.
169. Knudson, C.M., et al., *Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 659-65.

170. Yin, X.M., et al., *Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis*. Nature, 1999. **400**(6747): p. 886-91.
171. Zinkel, S.S., et al., *Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression*. Genes Dev, 2003. **17**(2): p. 229-39.
172. Zinkel, S.S., et al., *A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response*. Cell, 2005. **122**(4): p. 579-91.
173. Nagata, S., et al., *Degradation of chromosomal DNA during apoptosis*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 108-16.
174. Steinhilber, U., et al., *Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16345-53.
175. Nagy, I., et al., *Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium development by patterning N-cadherin and beta-catenin expression*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 100-9.
176. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
177. Malinin, N.L., et al., *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. Nature, 1997. **385**(6616): p. 540-4.
178. Okamoto, K., et al., *Selective activation of the JNK/AP-1 pathway in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synoviocytes*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(5): p. 919-26.
179. Ponton, A., M.V. Clement, and I. Stamenkovic, *The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8991-5.
180. Wollert, K.C., et al., *The cardiac Fas (APO-1/CD95) Receptor/Fas ligand system : relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes*. Circulation, 2000. **101**(10): p. 1172-8.
181. Kovacic-Milivojevic, B., V.S. Wong, and D.G. Gardner, *Selective regulation of the atrial natriuretic peptide gene by individual components of the activator protein-1 complex*. Endocrinology, 1996. **137**(3): p. 1108-17.
182. Paradis, P., et al., *Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal alpha-actin promoter in ventricular myocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10827-33.
183. Nelson, D.P., et al., *Proinflammatory consequences of transgenic fas ligand expression in the heart*. J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1199-208.
184. Badorff, C., et al., *Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 373-81.
185. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
186. Haq, S., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy*. J Cell Biol, 2000. **151**(1): p. 117-30.
187. Yeh, W.C., et al., *FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis*. Science, 1998. **279**(5358): p. 1954-8.
188. Adachi, M., et al., *Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver*. Nat Genet, 1995. **11**(3): p. 294-300.
189. Pfeffer, K., et al., *Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection*. Cell, 1993. **73**(3): p. 457-67.
190. Rasper, D.M., et al., *Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex*. Cell Death Differ, 1998. **5**(4): p. 271-88.
191. Yeh, W.C., et al., *Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 633-42.
192. Copp, A.J., *Death before birth: clues from gene knockouts and mutations*. Trends Genet, 1995. **11**(3): p. 87-93.
193. Osumi-Yamashita, N., Y. Ninomiya, and K. Eto, *Mammalian craniofacial embryology in vitro*. Int J Dev Biol, 1997. **41**(2): p. 187-94.
194. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
195. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-9.

196. Halestrap, A.P., G.P. McStay, and S.J. Clarke, *The permeability transition pore complex: another view*. *Biochimie*, 2002. **84**(2-3): p. 153-66.
197. Russell, B., D. Motlagh, and W.W. Ashley, *Form follows function: how muscle shape is regulated by work*. *J Appl Physiol* (1985), 2000. **88**(3): p. 1127-32.
198. Sadoshima, J. and S. Izumo, *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. *Annu Rev Physiol*, 1997. **59**: p. 551-71.
199. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(8): p. 589-600.
200. Dorn, G.W., 2nd, *The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy*. *Hypertension*, 2007. **49**(5): p. 962-70.
201. Maillet, M., J.H. van Berlo, and J.D. Molkentin, *Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(1): p. 38-48.
202. Janz, K.F., J.D. Dawson, and L.T. Mahoney, *Predicting heart growth during puberty: The Muscatine Study*. *Pediatrics*, 2000. **105**(5): p. E63.
203. van Berlo, J.H., M. Maillet, and J.D. Molkentin, *Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(1): p. 37-45.
204. McKinsey, T.A. and E.N. Olson, *Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 538-46.
205. Sarquella-Brugada, G., et al., *Genetics of sudden cardiac death in children and young athletes*. *Cardiol Young*, 2013. **23**(2): p. 159-73.
206. Gertz, E.W., et al., *Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(6): p. 2017-25.
207. Abel, E.D. and T. Doenst, *Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy*. *Cardiovasc Res*, 2011. **90**(2): p. 234-42.
208. Olson, E.N. and M.D. Schneider, *Sizing up the heart: development redux in disease*. *Genes Dev*, 2003. **17**(16): p. 1937-56.
209. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. *Pharmacol Ther*, 2010. **128**(1): p. 191-227.
210. Selvetella, G., et al., *Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence*. *Cardiovasc Res*, 2004. **63**(3): p. 373-80.
211. Jin, H., et al., *Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(6): p. H2994-3002.
212. Shiojima, I. and K. Walsh, *Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway*. *Genes Dev*, 2006. **20**(24): p. 3347-65.
213. Neri Serneri, G.G., et al., *Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes*. *Circ Res*, 2001. **89**(11): p. 977-82.
214. Matsui, T., et al., *Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22896-901.
215. Shioi, T., et al., *The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice*. *EMBO J*, 2000. **19**(11): p. 2537-48.
216. Frame, S. and P. Cohen, *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*. *Biochem J*, 2001. **359**(Pt 1): p. 1-16.
217. Hirota, H., et al., *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress*. *Cell*, 1999. **97**(2): p. 189-98.
218. Bueno, O.F., et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. *EMBO J*, 2000. **19**(23): p. 6341-50.
219. Purcell, N.H., et al., *Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(35): p. 14074-9.
220. Kehat, I., et al., *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth*. *Circ Res*, 2011. **108**(2): p. 176-83.
221. Kehat, I. and J.D. Molkentin, *Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy*. *Ann N Y Acad Sci*. **1188**: p. 96-102.
222. Zhang, W., *Old and new tools to dissect calcineurin's role in pressure-overload cardiac hypertrophy*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(2): p. 294-303.

223. Crabtree, G.R., *Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT*. Cell, 1999. **96**(5): p. 611-4.
224. Molkentin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
225. Maruyama, Y., et al., *Galpha(12/13) mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2002. **91**(10): p. 961-9.
226. Sadoshima, J., et al., *Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro*. Cell, 1993. **75**(5): p. 977-84.
227. Shubeita, H.E., et al., *Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): p. 20555-62.
228. Sakata, Y., et al., *Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice*. Circulation, 1998. **97**(15): p. 1488-95.
229. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
230. Asai, K., et al., *Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpha) mouse*. J Clin Invest, 1999. **104**(5): p. 551-8.
231. Maass, A., et al., *From sarcomeric mutations to heart disease: understanding familial hypertrophic cardiomyopathy*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 409-15.
232. Herman, D.S., et al., *Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(7): p. 619-28.
233. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
234. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
235. Saraste, A., et al., *Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(5): p. 380-6.
236. Wencker, D., et al., *A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure*. J Clin Invest, 2003. **111**(10): p. 1497-504.
237. Kung, G., K. Konstantinidis, and R.N. Kitsis, *Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart*. Circ Res, 2011. **108**(8): p. 1017-36.
238. Nakayama, H., et al., *Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2431-44.
239. Baines, C.P., et al., *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 658-62.
240. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 652-8.
241. Piper, H.M., Y. Abdallah, and C. Schafer, *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 365-71.
242. Garcia-Dorado, D., M. Ruiz-Meana, and H.M. Piper, *Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 165-8.
243. Inserte, J., et al., *Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(1): p. 105-14.
244. Inserte, J., et al., *Effect of inhibition of Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(4): p. 739-48.
245. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications*. Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 763-854.
246. Imahashi, K., et al., *Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury*. Circ Res, 1999. **84**(12): p. 1401-6.
247. Inserte, J., V. Hernando, and D. Garcia-Dorado, *Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(1): p. 23-31.
248. Zhao, X., et al., *pH dependency of mu-calpain and m-calpain activity assayed by casein zymography following traumatic brain injury in the rat*. Neurosci Lett, 1998. **247**(1): p. 53-7.
249. Inserte, J., et al., *Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia*. Circ Res, 2005. **97**(5): p. 465-73.

250. Mora, C., et al., *How many species are there on Earth and in the ocean?* PLoS Biol, 2011. **9**(8): p. e1001127.
251. Harashima, H., N. Dissmeyer, and A. Schnittger, *Cell cycle control across the eukaryotic kingdom.* Trends Cell Biol, 2013. **23**(7): p. 345-56.
252. Jakoby, M. and A. Schnittger, *Cell cycle and differentiation.* Curr Opin Plant Biol, 2004. **7**(6): p. 661-9.
253. Edgar, B.A. and C.F. Lehner, *Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective.* Science, 1996. **274**(5293): p. 1646-52.
254. De Veylder, L., J.C. Larkin, and A. Schnittger, *Molecular control and function of endoreplication in development and physiology.* Trends Plant Sci, 2011. **16**(11): p. 624-34.
255. Morgan, D.O., *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 261-91.
256. Furuno, N., N. den Elzen, and J. Pines, *Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase.* J Cell Biol, 1999. **147**(2): p. 295-306.
257. Riabowol, K., et al., *The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells.* Cell, 1989. **57**(3): p. 393-401.
258. Pines, J., *Four-dimensional control of the cell cycle.* Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. E73-9.
259. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins.* Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
260. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.* Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
261. Peters, J.M., *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 644-56.
262. Lundgren, K., et al., *mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2.* Cell, 1991. **64**(6): p. 1111-22.
263. Sebastian, B., A. Kakizuka, and T. Hunter, *Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3521-4.
264. Rhind, N. and P. Russell, *Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1499-508.
265. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation.* Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
266. Matsushime, H., et al., *D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 2066-76.
267. Peeper, D.S., et al., *A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes.* EMBO J, 1993. **12**(5): p. 1947-54.
268. Pagliuca, F.W., et al., *Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery.* Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 406-17.
269. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.* Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
270. Hannon, G.J. and D. Beach, *p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.* Nature, 1994. **371**(6494): p. 257-61.
271. Guan, K.L., et al., *Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function.* Genes Dev, 1994. **8**(24): p. 2939-52.
272. Chan, F.K., et al., *Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2682-8.
273. Gu, Y., C.W. Turck, and D.O. Morgan, *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit.* Nature, 1993. **366**(6456): p. 707-10.
274. Polyak, K., et al., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.* Genes Dev, 1994. **8**(1): p. 9-22.
275. Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massague, *Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution.* Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 639-49.
276. Clubb, F.J., Jr. and S.P. Bishop, *Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy.* Lab Invest, 1984. **50**(5): p. 571-7.
277. Soonpaa, M.H., et al., *Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development.* Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2183-9.
278. Pasumarthi, K.B. and L.J. Field, *Cardiomyocyte cell cycle regulation.* Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1044-54.

279. Ikenishi, A., et al., *Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages*. Dev Growth Differ, 2012. **54**(8): p. 731-8.
280. Kang, M.J. and G.Y. Koh, *Differential and dramatic changes of cyclin-dependent kinase activities in cardiomyocytes during the neonatal period*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(7): p. 1767-77.
281. Claycomb, W.C., *Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Deoxyribonucleic acid synthesis and nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerase activity*. J Biol Chem, 1975. **250**(9): p. 3229-35.
282. Liao, H.S., et al., *Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes*. Circ Res, 2001. **88**(4): p. 443-50.
283. Pasumarthi, K.B., E. Kardami, and P.A. Cattini, *High and low molecular weight fibroblast growth factor-2 increase proliferation of neonatal rat cardiac myocytes but have differential effects on binucleation and nuclear morphology. Evidence for both paracrine and intracrine actions of fibroblast growth factor-2*. Circ Res, 1996. **78**(1): p. 126-36.
284. Sheikh, F., et al., *Overexpression of long or short FGFR-1 results in FGF-2-mediated proliferation in neonatal cardiac myocyte cultures*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(3): p. 696-705.
285. Engel, F.B., et al., *p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes*. Genes Dev, 2005. **19**(10): p. 1175-87.
286. Kubin, T., et al., *Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(5): p. 420-32.
287. Cuevas, P., et al., *Fibroblast growth factor-1 prevents myocardial apoptosis triggered by ischemia reperfusion injury*. Eur J Med Res, 1997. **2**(11): p. 465-8.
288. Bersell, K., et al., *Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury*. Cell, 2009. **138**(2): p. 257-70.
289. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
290. Poss, K.D., L.G. Wilson, and M.T. Keating, *Heart regeneration in zebrafish*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2188-90.
291. Poss, K.D., *Getting to the heart of regeneration in zebrafish*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(1): p. 36-45.
292. Ahuja, P., et al., *Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 15): p. 3295-306.
293. Lee, I.H. and T. Finkel, *Metabolic regulation of the cell cycle*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(6): p. 724-9.
294. Tu, B.P., et al., *Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1152-8.
295. Naaz, A., et al., *Loss of cyclin-dependent kinase inhibitors produces adipocyte hyperplasia and obesity*. FASEB J, 2004. **18**(15): p. 1925-7.
296. Blanchet, E., et al., *E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(9): p. 1146-52.
297. Raimundo, N., et al., *Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness*. Cell, 2012. **148**(4): p. 716-26.
298. Agathocleous, M. and W.A. Harris, *Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation*. Trends Cell Biol, 2013.
299. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
300. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(9): p. 1016-23.
301. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 283-93.
302. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
303. Holley, R.W. and J.A. Kiernan, *Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular weight nutrients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(8): p. 2942-5.
304. Mandal, S., et al., *Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in Drosophila*. Dev Cell, 2005. **9**(6): p. 843-54.
305. Owusu-Ansah, E., et al., *Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 356-61.

306. Crider, D.G., et al., *Rad53 is essential for a mitochondrial DNA inheritance checkpoint regulating G1 to S progression*. J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 793-8.
307. Cai, L., et al., *Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes*. Mol Cell, 2011. **42**(4): p. 426-37.
308. Chen, Z., et al., *Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity*. Science, 2007. **316**(5833): p. 1916-9.
309. Tu, B.P., et al., *Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 16886-91.
310. Wellen, K.E. and C.B. Thompson, *A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 270-6.
311. Chan, D.C., *Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health*. Annu Rev Genet, 2012. **46**: p. 265-87.
312. Schieke, S.M., J.P. McCoy, Jr., and T. Finkel, *Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression*. Cell Cycle, 2008. **7**(12): p. 1782-7.
313. Mitra, K., et al., *A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 11960-5.
314. McFadden, D.G., et al., *The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner*. Development, 2005. **132**(1): p. 189-201.
315. Shin, C.H., et al., *Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein*. Cell, 2002. **110**(6): p. 725-35.
316. Tamura, T., et al., *Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(11): p. 2175-81.
317. Widlak, P., et al., *Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26915-22.
318. Santamaria, M., et al., *Nuclear alpha1-antichymotrypsin promotes chromatin condensation and inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma cells*. Gastroenterology, 2013. **144**(4): p. 818-828 e4.
319. Bonzon-Kulichenko, E., et al., *A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(1): p. M110 003335.
320. Wiese, S., et al., *Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research*. Proteomics, 2007. **7**(3): p. 340-50.
321. Hiroko Kozuka-Hata, Y.G.a.M.O. (2013) *Phosphoproteomics-Based Characterization of Cancer Cell Signaling Networks*. InTech, DOI: 10.5772/52915.
322. Zhivotovsky, B., et al., *Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(7): p. 644-51.
323. Back, S.H., S. Shin, and S.K. Jang, *Polypyrimidine tract-binding proteins are cleaved by caspase-3 during apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27200-9.
324. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. Histochem J, 1979. **11**(4): p. 447-55.
325. Abel, E.D., et al., *Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart*. J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. 1703-14.
326. Heidebreder, M., et al., *Non-hypoxic induction of HIF-3alpha by 2-deoxy-D-glucose and insulin*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(2): p. 437-43.
327. Qu, X., et al., *Ndr4 is required for normal myocyte proliferation during early cardiac development in zebrafish*. Dev Biol, 2008. **317**(2): p. 486-96.
328. Day, M.L., et al., *Ventricular atriopentin. Unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone*. Hypertension, 1987. **9**(5): p. 485-91.
329. Morrish, F., et al., *Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 36267-74.
330. Hood, J.M., et al., *Liver transplantation for advanced liver disease with alpha-1-antitrypsin deficiency*. N Engl J Med, 1980. **302**(5): p. 272-5.
331. Kalsheker, N., S. Morley, and K. Morgan, *Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(2): p. 93-8.
332. Fernando, P. and L.A. Megeney, *Is caspase-dependent apoptosis only cell differentiation taken to the extreme?* FASEB J, 2007. **21**(1): p. 8-17.

333. Boutz, P.L., et al., *MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development*. *Genes Dev*, 2007. **21**(1): p. 71-84.
334. Ye, J., et al., *A pathway involving HDAC5, cFLIP and caspases regulates expression of the splicing regulator polypyrimidine tract binding protein in the heart*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 7): p. 1682-91.
335. Zhu, B., B. Ramachandran, and T. Gulick, *Alternative pre-mRNA splicing governs expression of a conserved acidic transactivation domain in myocyte enhancer factor 2 factors of striated muscle and brain*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(31): p. 28749-60.
336. Naqvi, N., et al., *A Proliferative Burst during Preadolescence Establishes the Final Cardiomyocyte Number*. *Cell*, 2014. **157**(4): p. 795-807.
337. Asakura, M. and M. Kitakaze, *Global gene expression profiling in the failing myocardium*. *Circ J*, 2009. **73**(9): p. 1568-76.
338. Schmidt, M.V., et al., *Tumor suppressor down-regulated in renal cell carcinoma 1 (DRR1) is a stress-induced actin bundling factor that modulates synaptic efficacy and cognition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(41): p. 17213-8.
339. Roessler, S., et al., *A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients*. *Cancer Res*, 2010. **70**(24): p. 10202-12.
340. Jia, H.L., et al., *Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1133-9.
341. Ye, Q.H., et al., *Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning*. *Nat Med*, 2003. **9**(4): p. 416-23.
342. Dinarello, C.A., A. Simon, and J.W. van der Meer, *Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(8): p. 633-52.
343. Aksentijevich, I., et al., *An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(23): p. 2426-37.
344. Manthey, H.D., et al., *Complement component 5a (C5a)*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(11): p. 2114-7.
345. Mullick, A., et al., *A novel role for the fifth component of complement (C5) in cardiac physiology*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e22919.
346. Benderdour, M., et al., *Cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45154-9.
347. Benderdour, M., et al., *Decreased cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(5): p. H2122-31.
348. Dai, D.F., et al., *Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure*. *Circ Res*, 2011. **108**(7): p. 837-46.
349. Pawson, T. and P. Nash, *Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains*. *Science*, 2003. **300**(5618): p. 445-52.
350. Lamkanfi, M., et al., *Caspase-1 activates nuclear factor of the kappa-enhancer in B cells independently of its enzymatic activity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24785-93.
351. Lamkanfi, M., et al., *A novel caspase-2 complex containing TRAF2 and RIP1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6923-32.
352. Chaudhary, P.M., et al., *Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs*. *Oncogene*, 2000. **19**(39): p. 4451-60.
353. Hu, W.H., H. Johnson, and H.B. Shu, *Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(15): p. 10838-44.
354. Brentnall, M., et al., *Procaspase-3 regulates fibronectin secretion and influences adhesion, migration and survival independently of catalytic function*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 10): p. 2217-26.
355. Stauffer Brian, L.L., *Sex differences in cardiac muscle and remodeling*. *Advances in Molecular and Cell biology*, 2004. **34**: p. 131-145.
356. de Simone, G., et al., *Gender differences in left ventricular growth*. *Hypertension*, 1995. **26**(6 Pt 1): p. 979-83.
357. Hammond, I.W., et al., *Relation of blood pressure and body build to left ventricular mass in normotensive and hypertensive employed adults*. *J Am Coll Cardiol*, 1988. **12**(4): p. 996-1004.

358. Goble, M.M., et al., *Sex differences in the determinants of left ventricular mass in childhood. The Medical College of Virginia Twin Study.* Circulation, 1992. **85**(5): p. 1661-5.
359. Cai, J., et al., *Androgen stimulates endothelial cell proliferation via an androgen receptor/VEGF/cyclin A-mediated mechanism.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(4): p. H1210-21.
360. Jarvinen, T.A., et al., *Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer.* Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 29-35.
361. Du, X.J., *Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice.* Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 510-9.
362. Pham, T.V., *Gender differences in cardiac development: are hormones at the heart of the matter?* Cardiovasc Res, 2003. **57**(3): p. 591-3.

Annex

Publicacions

- 1- A pathway involving HDAC5, cFLIP and caspases regulates expression of the splicing regulator polypyrimidine tract binding protein in the heart.
Ye J, Llorian M, **Cardona M**, Rongvaux A, Moubarak RS, Comella JX, Bassel-Duby R, Flavell RA, Olson EN, Smith CW, Sanchis D.
Journal of Cell Science 126, 1682-91. 19 Feb. 2013.

- 2- Translation of Myocyte Enhancer Factor-2 is induced by hypertrophic stimuli in cardiomyocytes through a Calcineurin-dependent pathway.
Junmei Ye, **Maria Cardona**, Marta Llovera, Joan X. Comella, Daniel Sanchis.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 53 (2012) 578–587. 28 Jul. 2012.

- 3- Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function.
McDermott-Roe C, Ye J, Ahmed R, Sun XM, Serafín A, Ware J, Bottolo L, Muckett P, Cañas X, Zhang J, Rowe GC, Buchan R, Lu H, Braithwaite A, Mancini M, Hauton D, Martí R, García-Arumí E, Hubner N, Jacob H, Serikawa T, Zidek V, Papousek F, Kolar F, **Cardona M**, Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Comella JX, Felkin LE, Barton PJ, Arany Z, Pravenec M, Petretto E, Sanchis D, Cook SA.
Nature **478**(7367): 114-8. 6 Oct. 2011.

- 4- EndoG links Bnip3-induced mitochondrial damage and caspase-independent DNA fragmentation.
Zhang J, Ye J, Altafaj A, **Cardona M**, Bahi N, Llovera M, Cañas X, Cook SA, Comella JX, Sanchis D.
PLoS One **6**(3): e17998. 17 Mar. 2011.

