



Universitat de Lleida

## EndoG influye en el crecimiento y la proliferación celular con impacto en el desarrollo de tejidos y la progresión tumoral

Natividad Blasco Angulo

<http://hdl.handle.net/10803/482215>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

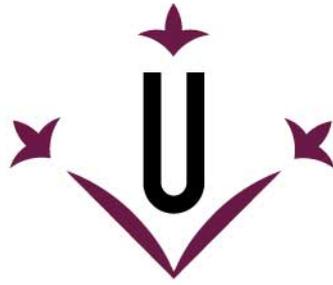
**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida  
Departament de Ciències  
Mèdiques Bàsiques

# **ENDOG influye en el crecimiento y la proliferación celular con impacto en el desarrollo de tejidos y la progresión tumoral**

**Natividad Blasco Angulo  
2017**



**Universitat de Lleida**

**TESIS DOCTORAL**

**ENDOG influye en el crecimiento y la  
proliferación celular con impacto en el desarrollo  
de tejidos y la progresión tumoral**

Natividad Blasco Angulo

**Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la Universidad de Lleida**

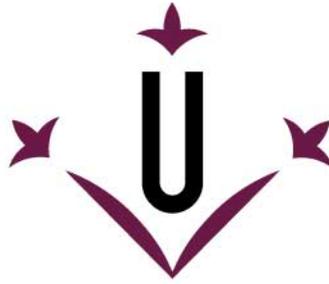
**Programa de Doctorado en Salud**

Director

Daniel Sanchis Morales

2017





## Universitat de Lleida

**Daniel Sanchis Morales**, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador y profesor agregado del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universitat de Lleida, en calidad de director de la presente tesis.

Manifiesta que,

La licenciada en Bioquímica por la Universitat de Valencia **Natividad Blasco Angulo**, ha realizado bajo mi dirección y supervisión, en el grupo de Señalización Celular y Apoptosis del Departamento de Ciencias Médicas Básicas, en el trabajo experimental que lleva por título “ENDOG influye en el crecimiento y la proliferación celular con impacto en el desarrollo de tejidos y la progresión tumoral”.

El trabajo reúne las condiciones científicas necesarias para ser defendido y juzgado por el Tribunal de Tesis correspondiente con el fin de optar al grado de **Doctor** por la Universitat de Lleida.

Y para que así conste y a los efectos oportunos firmo el presente documento en Lleida a de septiembre de 2017

Dr. Daniel Sanchis Morales



*A mis padres,  
a mi hermana,  
por estar siempre a mi lado.*



HOW DO I LOVE YOU, THESIS?  
LET ME COUNT THE WAYS...



JORGE CHAM © 2011







Durante estos años de tesis he tenido la oportunidad de compartir muchos momentos con personas que han sido y son, sin duda alguna, una parte muy importante de este trabajo. Sin ellas nada de lo que aquí os presento habría sido posible o, al menos, nada habría sido lo mismo.

Me gustaría dedicar este trabajo al grupo de Señalización celular y Apoptosis del IRB Lleida, al equipo al que pertenezco, porque parte de esta tesis también es vuestra. En primer lugar, quiero agradecer a Daniel Sanchis el haberme dejado formar parte de este proyecto, por seguirme y guiarme durante el doctorado, por las críticas constructivas y los conocimientos adquiridos. Gracias por tu infinita paciencia, especialmente al principio y, porque, aunque no me oirás repetirlo otra vez, sé que han habido momentos en los que me ha salido la vena guerrera (la vena Blasco como diríamos en casa) y no he sido siempre una becaria dócil :):) Muchas gracias por estos años, Dani.

Mi más profundo agradecimiento a Marta Llovera, a quien admiro como científica y aprecio como persona, por su determinación en el trabajo y por su rigor científico pero, sobre todo, por su enorme integridad y calidad humana. Gracias por tu generosidad, por facilitarme siempre las cosas y darme buenos consejos en el laboratorio.

A Cristina Girón, alias "CrisCas", "Chuck Norris"...gracias por todo el tiempo que has dedicado a este trabajo, por implicarte desde el principio y solucionar muchos de los problemas que han ido surgiendo, pero principalmente tengo que agradecerte tu prioridad para guardar y cuidar nuestra amistad. Gracias por preocuparte por mí y ser una amiga.

A "Las virtudes", Aida Beà y Gisel Barès, las nuevas incorporaciones del grupo, por vuestra ayuda constante en el laboratorio, por los buenos momentos y por haber compartido también los no tan buenos, porque a pesar de que seamos las tres tan distintas y haber necesitado tiempo en conocernos, me llevo lo mejor de cada una, las risas infinitas de Gisel en sus momentos "bajada de azúcar", y el equilibrio tenaz, "el todo en su justa medida" de Aida. Dani es muy afortunado porque tiene a 3 tipos de becarias trabajando en su laboratorio: una sensata (Aida), una loca (Gisel) y una obsesiva compulsiva (yo :):).

Me gustaría agradecer a todos aquellos que, directa o indirectamente, se han visto implicados en el desarrollo de esta tesis en algún momento y han contribuido para

que este trabajo saliera adelante. Al Biobanco del IRB Lleida, por todas las muestras de tejido tumoral humano cedidas para nuestro estudio. Al servicio de Citometría del IRB Lleida y, particularmente, a Anaís Panosa por su trabajo, ayuda y consejos acerca de las sondas ROS. Al grupo de Patología Oncológica del IRB Lleida liderado por el Dr. Xavier Dolçet, por el conocimiento, la atención prestada y por dejar a nuestra libre disposición su material para poder implantar en nuestro laboratorio la tecnología CRISPR/Cas9. Al grupo de Proteómica Cardiovascular del CNIC liderado por el Dr. Jesús Vázquez, por sus estudios proteómicos realizados en los corazones de ratones *Endog<sup>+/+</sup>* y *Endog<sup>-/-</sup>*. Al grupo de Patología Neuromuscular y Mitocondrial del instituto de investigación de la Vall d'Hebron liderado por el Dr. Ramón Martí, a todo el personal que lo integra por abrirme las puertas de su laboratorio durante mi estancia y, particularmente, a Yolanda Cámara, una de las personas más dedicadas y entregadas que he conocido, siempre disponible para lo que necesitara y que ha sabido solucionar muchas de mis dudas (que no han sido pocas!!!), contribuyendo enormemente a este trabajo. También a todas aquellas personas del IRB Lleida que han estado a diario trabajando y compartiendo momentos conmigo, en especial a Sara por ser tan simpática y por sus continuas visitas al laboratorio, y a Raúl, por el buen humor que le pone a todo y por darle vida al IRB algunos domingos.

A nuestras vecinas de Señalización Celular por Calcio, Mireia Nàger, Marta Crespi y Anna Visa, y a los vecinos que ya no están Anna Macià, Oscar Maiques y Carla Barcelo, por tantos años compartiendo espacios y mezclando material como si formásemos parte de un mismo grupo pero, sobre todo, por las bromas continuas, las charlas y las experiencias compartidas que han hecho nuestros largos días más entretenidos.

A Maria Crespo, Pau Marfull, Tania Cemeli, Isidre Felip, Marta Cornago y David Alsina por intentar ser el punto de desconexión en mi mundo loco del laboratorio, por abrirme siempre la puerta y lograr que me sienta a gusto en vuestra compañía, sois un grupo genial. En especial, a Isidre por su empeño constante en conseguir que fuera una persona "sociable" y no una ratita de laboratorio (te debo muchos fines de fiesta!!!), pero también por toda tu ayuda en el estabulario con los ratones SCID. A Marta, mi compañera del alma, paño de lágrimas y confidente, gracias por tu apoyo y compañía los primeros años en Lleida, y porque a pesar del paso del tiempo y la distancia sigues pendiente de mis avances. David, se te va a echar mucho de menos pero estoy seguro

que te espera un futuro brillante, pronto nos vemos, tenemos una cita importante en Cintruéñigo :) :).

A mis "pavas", Amparo Royo, Sandra Cortina, Loles Iñesta, Marta Peris, Raquel Gargallo, Elvira Baviera, Estefanía Fernández, Noelia Hurtado, Elisa Nuñez e Inma Hueso y, por supuesto, a los peques Lucia, Alejandra, Aitana, Carlos, Gonzalo, Carlitos, Ángel y Martina, por lograr detener el tiempo y sentir cada vez que vuelvo a Valencia que nada ha cambiado pese a la distancia, por hacerme reír tanto, por los buenísimos momentos que hemos pasado y seguiremos pasando juntas. Estoy deseando que esto termine para poder celebrarlo con vosotras y hacer ese viaje que tenemos pendiente juntas.

A los David-Botet, a Encarna, Paco, Fran, Mapi, Pablete y, por supuesto, a Pablito Junior, por ser tan divertidos, originales, leales y humildes, y por hacerme sentir una más de esta familia. Os debo muchas cenas, y espero que después de esta tesis podamos reunirnos más para tener encendidas conversaciones en la sobremesa junto a unos *gyntonics*.

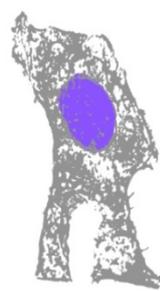
A pablo, por quererme como soy y porque sin ti nada de esto tendría sentido. Porque me ayudas tanto, por entenderlo todo, por poner siempre el punto positivo a las cosas cuando yo no lo encuentro, por aguantarme y apoyarme en la peor etapa de todo esto. Gracias por hacerme tan tan feliz y compartir todo conmigo a pesar de no estar cerca.

No puedo terminar estos agradecimientos por otras personas que no sean mis padres y mi hermana. Mamá, Papá, gracias por todas las cosas que hacéis por mí cada día, por todo vuestro amor y vuestra entrega, por justificar mis largas ausencias en momentos familiares importantes, por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones. Sois mi ejemplo de trabajo constante y perseverancia. A mi hermana, por ser mi otro yo, por estar ahí y ayudarme siempre. Por comprender mis agobios y confiar siempre en mí. Eres la persona más fuerte y luchadora que he conocido, un ejemplo de superación personal, y estoy segura que al final las cosas van a salir como esperas. Te admiro y te quiero. También a Pablo III, por cuidar de ella y estar a su lado. GRACIAS.

*a los que buscan aunque no encuentren,  
a los que avanzan aunque se pierdan,  
a los que viven aunque se mueran.*

*Mario Benedetti*





# Resúmenes



## RESUMEN

La endonucleasa G (ENDOG) es una nucleasa mitocondrial específica de ADN/ARN que se expresa de forma ubicua, y que parece estar implicada en procesos de recombinación y de degradación del ADN independiente de caspasas. Estudios de genómica funcional han permitido establecer una asociación entre la hipertrofia cardiaca independiente de la presión arterial y la falta de ENDOG. Resultados anteriores publicados por nuestro grupo demostraban que la deficiencia en ENDOG induce un aumento en la producción de radicales libres del oxígeno (ROS) y en el tamaño de los cardiomiocitos *in vivo* e *in vitro*; sin embargo, todavía no se ha esclarecido la señalización que conduce a este crecimiento anormal de los miocitos en ausencia de ENDOG. Debido a que el corazón responde a la pérdida de cardiomiocitos induciendo una hipertrofia en las células restantes, pensamos que el aumento de tamaño de los cardiomiocitos en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> podía ser debido a un menor número de células. En este estudio demostramos que los corazones neonatales de ratones *Endog*<sup>-/-</sup> están formados por un menor número de cardiomiocitos de mayor tamaño respecto a los corazones de tipo salvaje, y presentan una expresión disminuida de genes implicados en la replicación del ADN y la división celular, que se asocia a una reducida capacidad proliferativa de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> durante el desarrollo del corazón. También demostramos que ENDOG es necesaria para la proliferación *in vitro* de células de roedores y humanas, incluidas líneas celulares tumorales, en las que la falta de ENDOG restringe su capacidad para generar tumores *in vivo*. El aumento en la producción de ROS en células deficientes en ENDOG sugiere que éstas podrían mediar en el rol que ENDOG ejerce sobre el crecimiento y la proliferación celular. La neutralización de ROS reduce el crecimiento anormal de los cardiomiocitos neonatales, y recupera parcialmente la proliferación en células de roedores y humanas con una reducida expresión de ENDOG *in vitro*. Por esta razón, nos hemos centrado en la identificación de los mediadores y reguladores que influyen en la producción de ROS en ausencia de ENDOG. Las mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup> tienen una reducida capacidad de síntesis del ADNmit, y los fibroblastos embrionarios *Endog*<sup>-/-</sup> no consiguen recuperar los niveles normales de ADNmit tras un proceso de depleción transitoria con bromuro de etidio (BrEt), lo que sugiere una disminución de la replicación del ADNmit debido a la falta de ENDOG; asimismo, en células Rho(0) que carecen de ADNmit la ausencia de ENDOG no dificulta la proliferación celular,

confirmando su función en la replicación del ADNmit por encima de los efectos observados sobre la proliferación celular. En conjunto, nuestros resultados demuestran que ENDOG es necesaria para la replicación del ADNmit, influyendo en la producción mitocondrial de ROS y la señalización dependiente de ROS para regular la proliferación y el crecimiento en cardiomiocitos, así como en otros tipos celulares, contribuyendo al desarrollo de los tejidos y el crecimiento tumoral.

## RESUM

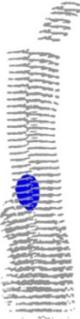
La endonucleasa G (ENDOG) és una nucleasa mitocondrial específica d'ADN/ARN que s'expressa de manera ubíqua i sembla que està implicada en processos de recombinació i de degradació de l'ADN independent de caspases. Estudis de genòmica funcional han permès establir una associació entre la hipertrofia cardíaca independentment de la pressió arterial i la manca d'ENDOG. Resultats anteriors publicats pel nostre grup demostraven que la deficiència d'ENDOG induïx un augment en la producció de radicals lliures d'oxigen (ROS) i de la mida dels cardiomiòcits *in vivo* i *in vitro*; no obstant, encara no està clara la senyalització que comporta aquest creixement anormal dels miòcits en absència d'ENDOG. Degut a que el cor respon a la pèrdua de cardiomiòcits induïnt hipertrofia en les cèl·lules restants, creiem que l'augment de mida dels cardiomiòcits en els cors *Endog*<sup>-/-</sup> podria ser degut a un menor nombre de cèl·lules. En aquest estudi demostrem que els cors neonatals de ratolins *Endog*<sup>-/-</sup> estan formats per un menor nombre de cardiomiòcits de major grandària respecte als cors de tipus salvatge, i presenten una expressió disminuïda de gens implicats en la replicació de l'ADN i la divisió cel·lular que s'associa a una reduïda capacitat proliferativa dels cardiomiòcits *Endog*<sup>-/-</sup> durant el desenvolupament del cor. També demostrem que ENDOG és necessària per la proliferació *in vitro* de cèl·lules de rosegadors i humanes, incloses línies cel·lulars tumorals, en les quals la manca d'ENDOG restringeix la capacitat per generar tumors *in vivo*. L'augment en la producció de ROS en cèl·lules deficientes en ENDOG suggereix que aquestes podrien estar implicades en el rol d'ENDOG en el creixement i la proliferació cel·lular. La neutralització de ROS redueix el creixement anormal dels cardiomiòcits neonatals i es recupera parcialment la proliferació en cèl·lules de rosegadors i humanes amb una expressió reduïda d'ENDOG *in vitro*. Per aquesta raó, ens hem centrat en la identificació dels mediadors i reguladors que influeixen en la producció de ROS en absència d'ENDOG. Les mitocondries aïllades

de cors *Endog*<sup>-/-</sup> tenen una reduïda capacitat de síntesi del ADNmit, i els fibroblasts embrionaris *Endog*<sup>-/-</sup> no aconsegueixen recuperar els nivells normals de ADNmit després d'un procés de depleció transitòria amb bromur d'etidi (BrEt), el que suggereix una disminució de la replicació d'ADNmit degut a la manca d'ENDOG; així mateix, en cèl·lules Rho(0) que no tenen ADNmit la falta d'ENDOG no dificulta la proliferació cel·lular, confirmant la seva funció en la replicació de l'ADNmit per damunt dels efectes observats sobre la proliferació cel·lular. En conjunt, els nostres resultats demostren que ENDOG és necessària per la replicació de l'ADNmit, influint en la producció mitocondrial de ROS i la senyalització dependent de ROS per regular la proliferació i el creixement en cardiomiòcits, així com en altres tipus cel·lulars, contribuint al desenvolupament dels teixits i el creixement tumoral.

## ABSTRACT

Endonuclease G (ENDOG) is a mitochondrial DNA/RNA-nuclease ubiquitously expressed, which may be involved in DNA recombination and caspase-independent DNA degradation. Functional genomics established an association between blood pressure-independent heart hypertrophy and the lack of ENDOG. Our previous results showed that ENDOG deficiency increases oxygen free radical production (ROS) and induces cardiomyocyte enlargement *in vivo* and *in vitro*. However, the signaling leading to abnormal myocyte growth in the absence of ENDOG has not been yet elucidated. Because the heart responds to the loss of cardiomyocytes by inducing hypertrophy of the remaining cells, we speculated that the increased cardiomyocyte size in *Endog*<sup>-/-</sup> hearts could be due to a reduced number of cells. Indeed, we found that hearts of neonatal *Endog*<sup>-/-</sup> deficient mice had fewer and bigger cardiomyocytes than wild type hearts with a decreased expression of genes involved in DNA replication and cell division, which means a reduction in *Endog*<sup>-/-</sup> cardiomyocyte proliferation during heart development. We also found that ENDOG is required for cell proliferation of other rodent and human cells, including tumor cell lines, in which ENDOG deficiency restrains their capacity to generate tumors *in vivo*. Increased ROS production in ENDOG deficient cells suggested that ROS could mediate ENDOG roles in cell growth and proliferation. ROS scavenging reduced abnormal growth of neonatal cardiomyocytes and partially recovered the proliferation of rodent and human cells with reduced ENDOG expression *in vitro*. For this reason, we focused on identifying the mediators and regulators

influencing ROS production in the absence of ENDOG. Isolated *Endog*<sup>-/-</sup> cardiac mitochondria had reduced capacity to synthesize mtDNA and *Endog*<sup>-/-</sup> embryonic fibroblasts fail to recover normal mtDNA levels after a transient depletion with ethidium bromide (BrEt), which suggested a reduced mtDNA replication due to lack of ENDOG; likewise, in Rho (0) cells lacking mtDNA the absence of ENDOG does not hinder cell proliferation, confirming that its function in mtDNA replication is upstream of the effects on cell proliferation. Together, our results show that ENDOG is required for mtDNA replication influencing mitochondrial ROS production and ROS-dependent signaling to control proliferation and growth in cardiomyocytes and other cell types, contributing to tissue development and tumor growth.



# ndice



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Anatomía y fisiología del corazón .....</b>	<b>9</b>
1.1. Estructura y función del corazón	
1.2. Estructura del cardiomiocito y del músculo cardiaco	
<b>2. Cardiogénesis: desarrollo embrionario del corazón .....</b>	<b>14</b>
2.1. Visión general de la morfogénesis cardiaca	
2.2. Principales redes de regulación génica en el desarrollo cardiaco	
<b>3. Crecimiento y desarrollo postnatal del corazón .....</b>	<b>19</b>
3.1. Proliferación de los cardiomiocitos en el período postnatal	
3.2. Diferenciación y salida del ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales	
3.3. Factores que regulan el proceso proliferativo de los cardiomiocitos	
3.4. Implicaciones de la limitada capacidad regenerativa: la regeneración cardiaca	
<b>4. La hipertrofia cardiaca como respuesta fisio-patológica .....</b>	<b>33</b>
4.1. La hipertrofia cardiaca: crecimiento del corazón adulto	
4.2. Vías de inducción de la hipertrofia cardiaca	
4.2.1. Mecanismos de inducción de la hipertrofia fisiológica	
4.2.2. Mecanismos de inducción de la hipertrofia patológica	
4.3. La señalización redox en la hipertrofia cardiaca	
4.4. Regulación epigenética de la hipertrofia cardiaca	
<b>5. La mitocondria .....</b>	<b>46</b>
5.1. Estructura de la mitocondria	
5.2. Estructura y herencia del ADN mitocondrial (ADNmit)	
5.3. Replicación, transcripción y traducción del ADNmit	
5.4. Cadena de transporte electrónico. Fosforilación oxidativa (OXPHOS)	
5.5. Producción de ROS en la mitocondria	
5.6. La biogénesis mitocondrial	
5.7. Papel de la mitocondria en la apoptosis	
<b>6. El estado redox celular .....</b>	<b>60</b>
6.1. Conceptos básicos	
6.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	
6.3. Defensa antioxidante frente a las ROS	
6.4. Fuentes celulares de las ROS	
6.5. La señalización celular por ROS	

6.6. Regulación redox del ciclo celular	
<b>7. Caracterización y función de la endonucleasa G .....</b>	<b>72</b>
7.1. Estructura de ENDOG	
7.2. Función biológica de ENDOG	
7.2.1. En el proceso apoptótico	
7.2.2. En la proliferación celular	
7.2.3. En la recombinación del ADNn y ADNmit	
7.2.4. En la reparación del ADNmit	
7.2.5. En la replicación del ADNmit	
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>81</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>1. Animales de experimentación .....</b>	<b>87</b>
<b>2. Técnicas de biología celular .....</b>	<b>88</b>
2.1. Cultivos Celulares	
2.1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata	
2.1.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón	
2.1.3. Cultivo primario y mantenimiento de fibroblastos dérmicos de ratón	
2.1.4. Cultivo primario y mantenimiento de MEFs	
2.1.5. Mantenimiento de células Rat-2	
2.1.6. Generación y mantenimiento de células Rat2-Rho(0)	
2.1.7. Mantenimiento de células HEK293T	
2.1.8. Mantenimiento de células tumorales endometriales	
2.2. Desarrollo de tumores subcutáneos en ratones SCID	
2.3. Producción de partículas lentivirales y transducción lentiviral	
2.4. Análisis de la proliferación celular	
2.5. Recuento de cardiomiocitos procedentes de tejido cardiaco	
2.6. Replicación del ADNmit <i>in organello</i>	
2.7. Subfraccionamiento Celular	
2.8. Inmunofluorescencia (IF)	
2.9. Inmunohistoquímica (IQ)	
2.10. Citometría de flujo (CMF)	
2.11. Análisis de la producción de ROS	
2.12. Cuantificación de los niveles intracelulares de GSH	
<b>3. Técnicas de biología molecular y bioquímica .....</b>	<b>103</b>
3.1. Extracción de ARN, síntesis de cADN y PCR en tiempo real (qPCR)	
3.1.1. Extracción de ARN	
3.1.2. Síntesis de cADN	
3.1.3. PCR en tiempo real (qPCR)	
3.2. Cuantificación del número de copias de ADNmit por mitocondrial	

3.2.1. Extracción del ADN genómico	
3.2.2. PCR en tiempo real (qPCR)	
3.3. CRISPR/Cas9 como herramienta de modificación génica	
3.3.1. Diseño de los sgRNAs	
3.3.2. Clonaje de los sgRNAs	
3.3.3. Cribado de colonias recombinantes	
3.3.4. Diseño y producción del molde de reparación	
3.3.5. Transfección de la línea HEK293T con los sgRNA y el molde de reparación	
3.4. Extracción de proteína y <i>Western Blot</i> (WB)	
3.4.1. Extracción de proteína	
3.4.2. Electroforesis SDS-PAGE	
3.4.3. Transferencia de proteínas	
3.4.4. Inmunodetección	
3.5. Secuenciación del genoma mitocondrial	
3.6. Recolección de datos proteómicos mitocondriales y análisis cuantitativo de iTRAQ	
<b>4. Herramientas informáticas .....</b>	<b>120</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>121</b>
<b>1. Estudio del rol biológico de ENDOG .....</b>	<b>123</b>
1.1. En el crecimiento y proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo del corazón	
1.2. En la proliferación de células de roedores y humanas en división	
1.3. En la proliferación de células tumorales humanas <i>in vitro</i> y su capacidad de generar tumores <i>in vivo</i>	
<b>2. Caracterización de la expresión de ENDOG en las líneas tumorales <i>in vitro</i> y tejido tumoral humano <i>in vivo</i> .....</b>	<b>130</b>
<b>3. Detección de ROS y sus posibles efectos sobre las funciones alteradas en ausencia de ENDOG .....</b>	<b>133</b>
3.1. En células de roedores postmitóticas: cardiomiocitos primarios de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> , y cardiomiocitos primarios de rata	
3.2. En células de roedores en división: fibroblastos primarios de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> y fibroblastos de rata, Rat-2	
3.3. En células humanas en división: HEK293T e Ishikawa	
<b>4. Caracterización de las vías de señalización implicadas en el fenotipo observado de los cardiomiocitos <i>Endog</i><sup>-/-</sup> .....</b>	<b>140</b>
4.1. La reducida proliferación de los cardiomiocitos en corazones <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> en desarrollo	

4.2. El incremento de tamaño de los cardiomiocitos neonatales primarios <i>Endog</i> <sup>-/-</sup>	
4.3. La activación de la respuesta del daño en el ADN (DDR) en corazones <i>Endog</i> <sup>-/-</sup>	
<b>5. Estudio de los efectos de la disminución de ROS sobre las vías de señalización alteradas por la falta de ENDOG .....</b>	<b>147</b>
5.1. En los cardiomiocitos primarios de rata con reducida expresión de ENDOG	
5.2. En células humanas HEK293T – <i>Endog</i> <sup>-/-</sup>	
5.3. En células tumorales humanas Ishikawa (IK) con reducida expresión de ENDOG	
<b>6. Función mitocondrial de ENDOG .....</b>	<b>154</b>
6.1. En la reparación del ADNmit	
6.2. En la replicación del ADNmit	
6.3. En la expresión del ADNmit y en la función respiratoria mitocondrial	
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>163</b>
1. La falta de ENDOG incrementa el tamaño de los cardiomiocitos y frena la proliferación de los mismos durante el desarrollo del corazón en ratones <i>Endog</i> <sup>-/-</sup>	
2. La deficiencia en ENDOG limita la proliferación de células de roedores y humanas en división	
3. La reducida expresión de ENDOG frena la división de células tumorales <i>in vitro</i> y la formación de tumores sólidos <i>in vivo</i>	
4. La abundancia de ROS regula los cambios en el crecimiento y proliferación celular asociados a la falta de ENDOG	
5. La deficiencia de ENDOG provoca cambios en las vías de señalización que regulan el crecimiento y la división celular a través de ROS	
6. ENDOG es necesaria para el mantenimiento del genoma mitocondrial mediante su participación en la replicación del ADNmit	
7. ENDOG no es necesaria para la expresión de los péptidos estructurales codificados por el genoma mitocondrial	
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>191</b>

## LISTADO FIGURAS INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1:</b> Estructura del corazón .....	10
<b>Figura 2:</b> Estructura del músculo cardiaco .....	12
<b>Figura 3:</b> Representación esquemática de los estadios iniciales del desarrollo embrionario del corazón .....	15
<b>Figura 4:</b> Red de factores y rutas de señalización implicados en la cardiogénesis ....	18
<b>Figura 5:</b> Cambio en el número (●), volumen (○) y el % de nucleación (▽) de los cardiomiocitos aislados de corazones de rata neonatal durante los primeros 12 días de vida .....	20
<b>Figura 6:</b> Modelo representativo de la regulación de la progresión del ciclo celular a través de las ciclinas y sus correspondientes quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) .....	23
<b>Figura 7:</b> Patrón de expresión de las principales ciclinas y Cdks en corazones de ratón durante el desarrollo embrionario y postnatal .....	24
<b>Figura 8:</b> Regulación de la proliferación en cardiomiocitos por la vía de señalización Hippo .....	26
<b>Figura 9:</b> Regulación de la proliferación en cardiomiocitos por microARNs (miARN) .....	28
<b>Figura 10:</b> Modelo de los efectos del oxígeno y ROS en la proliferación de cardiomiocitos .....	30
<b>Figura 11:</b> Tipos de hipertrofia cardiaca .....	34
<b>Figura 12:</b> Principales vías de señalización implicadas en la hipertrofia cardiaca .....	37
<b>Figura 13:</b> Activación de la calcineurina mediante la unión de $Ca^{2+}$ y CaM .....	38
<b>Figura 14:</b> Principales dianas de las especies reactivas del oxígeno (ROS) implicadas en la hipertrofia patológica del miocardio .....	42
<b>Figura 15:</b> Regulación de la expresión génica cardiaca por las HDAC clase II en respuesta a un estímulo hipertrofico .....	44
<b>Figura 16:</b> Genoma mitocondrial humano .....	48
<b>Figura 17:</b> Origen genético e interacción funcional de los complejos de la OXPHOS .....	52
<b>Figura 18:</b> Esquema de la reducción secuencial del oxígeno molecular para dar lugar a las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) .....	61
<b>Figura 19:</b> Esquema de las principales defensas antioxidantes y lesiones a biomoléculas .....	63
<b>Figura 20:</b> Ciclo de óxido-reducción del glutatión .....	64
<b>Figura 21:</b> Representación de la relación entre los niveles intracelulares de ROS y la proliferación celular .....	65
<b>Figura 22:</b> Representación esquemática del control redox del ciclo celular .....	69

## LISTADO TABLAS INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1:</b> Principales diferencias entre la hipertrofia fisiológica y la hipertrofia cardiaca .....	34
--	----

## LISTADO TABLAS MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 1:</b> Plásmidos utilizados para la transfección .....	95
<b>Tabla 2:</b> Plásmidos utilizados para la obtención de lentivirus .....	96
<b>Tabla 3:</b> Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia (IF) .....	100
<b>Tabla 4:</b> Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica (IQ) .....	101
<b>Tabla 5:</b> Ensayos TaqMan para la PCR en tiempo real .....	105
<b>Tabla 6:</b> Diluciones de las muestras estándar .....	108
<b>Tabla 7:</b> Condiciones de PCR para los genes mitocondriales 16S y ND4, y el nuclear ANG1 .....	109
<b>Tabla 8:</b> Condiciones de digestión de los plásmidos PX458- <i>sgRNAs</i> .....	113
<b>Tabla 9:</b> Condiciones de PCR del fragmento de brazos de homología cortos .....	114
<b>Tabla 10:</b> Anticuerpos primarios utilizados en <i>western blot</i> (WB) .....	118
<b>Tabla 11:</b> Anticuerpos secundarios utilizados en <i>western blot</i> (WB) .....	119

## LISTADO FIGURAS MATERIALES Y MÉTODOS

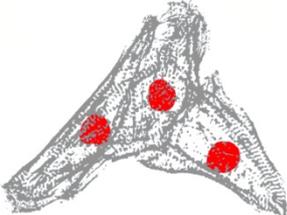
<b>Figura 1.</b> Cebadores diseñados para la realización del clonaje de las secuencias específicas de genoma de los <i>sgRNAs</i> en el vector PX458 .....	112
<b>Figura 2.</b> Esquema del fragmento de brazos de homología cortos .....	114

## LISTADO FIGURAS RESULTADOS

<b>Figura 1:</b> Análisis del tamaño y número de cardiomiocitos presentes en corazones neonatales (P3-P4) de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> .....	125
<b>Figura 2:</b> Análisis del efecto de la falta de ENDOG en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular de diferentes líneas celulares en división .....	127
<b>Figura 3:</b> Efecto de la expresión reducida de ENDOG en la división celular de células tumorales humanas Ishikawa <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	129
<b>Figura 4:</b> Análisis de la expresión de ENDOG en diferentes líneas tumorales derivadas de un carcinoma de endometrio humano con distinto potencial metastásico, así como en muestras humanas de diferentes tejidos no tumorales y tumorales cedidas por el biobanco del HUAV-IRBLleida .....	132
<b>Figura 5:</b> Cuantificación de la producción de ROS asociada a la falta de ENDOG, y análisis del efecto del tratamiento con un agente neutralizador de radicales libres, NAC, en el tamaño celular de cardiomiocitos deficientes en ENDOG .....	135
<b>Figura 6:</b> Cuantificación de la producción de ROS asociada a la falta de ENDOG, y análisis del efecto del tratamiento con NAC, en la proliferación celular de células deficientes en ENDOG .....	137
<b>Figura 7:</b> Cuantificación de la producción de ROS asociada a la falta de ENDOG, y análisis del efecto del tratamiento con NAC, en la proliferación celular de células .....	139

deficientes en ENDOG .....	
<b>Figura 8:</b> Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$ y de los reguladores del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CycB1 y CDK1, en corazones neonatales (P0-P3) de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> .....	141
<b>Figura 9:</b> Localización subcelular de ENDOG y HDAC4 en cardiomiocitos neonatales primarios de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> .....	144
<b>Figura 10:</b> Análisis de la expresión de proteínas de respuesta al daño en el ADN (DDR) en corazones neonatales (E17-P0-P3) de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> .....	146
<b>Figura 11:</b> Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$ que termina en el control de la expresión de ciclina D1 (CycD1), así como del regulador del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CDK1, en cardiomiocitos neonatales primarios de rata transducidos lentiviralmente con el <i>shRNA</i> control, <i>Scr shRNA</i> , y los <i>shRNA</i> de <i>Endog 1 y 2</i> .....	148
<b>Figura 12:</b> Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$ que termina en el control de la expresión de ciclina E1 (CycE1), así como de los reguladores del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CycB1 y CDK1, en células humanas HEK293T y HEK293T- <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> .....	151
<b>Figura 13:</b> Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$ que termina en el control de la expresión de ciclina D1 (CycD1), así como de los reguladores del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CycB1 y CDK1, en células IK con una reducida expresión de ENDOG .....	153
<b>Figura 14:</b> Secuenciación del genoma mitocondrial completo a partir 8 corazones neonatales de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> mediante la plataforma MiSeq de Illumina .....	155
<b>Figura 15:</b> Cuantificación de la incorporación de (metil- <sup>3</sup> H)dTTP a la cadena de ADNmit naciente de mitocondrias aisladas de 7 corazones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> (fmoles de (metil- <sup>3</sup> H)dTTP por ng de ADNmit) .....	155
<b>Figura 16:</b> Recuperación del número de copias de ADNmit en fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> tras su depleción transitoria con Bromuro de Etidio (BrEt) .....	156
<b>Figura 17:</b> Estudio de los efectos de la falta de ENDOG en la producción de ROS y la proliferación de células que carecen de ADNmit, Rat2-Rho(0) .....	159
<b>Figura 18:</b> Estudio de la expresión del ADNmit y de la función respiratoria mitocondrial en corazones adultos de ratones <i>Endog</i> <sup>+/+</sup> y <i>Endog</i> <sup>-/-</sup> .....	161





breviaturas



**ACTC1:** actina alfa del músculo cardiaco 1

**$\alpha$ -actinin:** alfa actinina

**ADNds:** ADN de doble cadena

**ADNmit:** ADN mitocondrial

**ADNss:** ADN de simple cadena

**AIF:** factor inductor de la apoptosis

**AKT:** proteína quinasa B

**AMPK:** proteína quinasa activada por adenosina monofosfato

**Ang II:** angiotensina II

**ANP:** péptido natriurético atrial

**Apaf-1:** del inglés *Apoptosis proteasa activating factor-1*

**AP-1:** proteína activadora 1

**ARNm:** AEN mensajero

**AS:** asa cardiaca

**ASK-1:** del inglés *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*

**ATM:** ataxia telangiectasia mutada

**$\beta$ -MHC:** cadena pesada de la  $\beta$  miosina

**BrdU:** 5-bromo-2'desoxiuridina

**C:** cabeza

**CaM:** calmodulina

**CAMKII:** Ca<sup>2+</sup>/calmodulina II

**CAT:** catalasa

**CT-1:** cardiotrofina 1

**CCS:** campo cardiaco secundario

**CDKs:** quinasas dependientes de ciclinas

**CHEK1:** quinasa del punto de control 1

**CLIC5:** canal intracelular de cloruro 5

**cTNC:** troponina cardiaca C

**cTNL:** troponina cardiaca I

**COXIV:** citocromo C oxidasa

**CRM1:** receptor de exportación nuclear

**Cu/Zn-SOD:** superóxido dismutasa de cobre y zinc

**CycB1:** ciclina B1

**CycD1:** ciclina D1

**Cytb:** citocromo b

**DAG:** diacilglicerol

**D-bucle:** del inglés *D-loop*

**DHE:** del inglés *Dihydroethidium*

**DKO:** del inglés *double-knockout*

**DP:** del inglés *dimerization partner*

**DREF:** del inglés *DNA replication-related element binding factor*

**DTT:** ditioneitol

**EFG:** factor de crecimiento epidérmico

**EFG1/2:** factor de elongación de la traducción mitocondrial

**EFT4/5:** factor de elongación de la traducción mitocondrial

**EMT:** transición epitelio-mesénquima

**ENDOG:** endonucleasa G

**ERK1/2:** quinasa 1 y 2 activadas por señales extracelulares

**ERR $\alpha$ :** receptor de estrógenos alfa

**ET-1:** endotelina 1

**FAK:** quinasa de adhesión focal

**FMN:** flavina mononucleótido

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos

**G6FD:** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

**GATA:** del inglés *globin transcription factor*

**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GH:** hormona de crecimiento

**GPCR:** receptor acoplado a la proteína G

**GSH:** glutatión

**GSH-PX:** glutatión peroxidasa

**GSH-R:** glutatión reductasa

**GSK3β:** glucógeno sintasa quinasa 3 beta

**HAND:** del inglés *heart and neural crest derivatives expressed*

**HAT:** histonas acetil-transferasas

**HDAC:** histonas deacetilasas

**HE:** hidroetina

**HFR:** región de formación del corazón

**Hif1α:** factor de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**IF2/3:** Factor de inicio de la traducción

**IGF1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1

**IL-6:** interleuquina 6

**IP3:** inositol 1,4,5-trifosfato

**ISO:** isoprenalina

**JAK:** quinasa Janus

**LATS1-2:** supresor de tumores grande 1 y 2

**LIF:** factor inhibidor de la leucemia

**LP:** línea primitiva

**LTCC:** canales de calcio de tipo L sensibles a voltaje

**LVM:** masa ventricular izquierda

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos

**MEF2:** del inglés *myocyte-specific enhancer factor*

**MEFs:** del inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*

**miRNA:** micro ARNs

**MYH6:** cadena pesada de la alfa miosina cardiaca

**MLS:** señal de localización mitocondrial

**Mn-SOD:** superóxido dismutasa de manganeso

**MRP:** del inglés *mitochondrial RNA processing endoribonuclease*

**MST1-2:** proteínas quinasa de mamífero 1 y 2 similares a STE20

**mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero

**NAC:** N-acetil-L-cisteína

**NCX:** intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

**NFAT:** factor de transcripción nuclear de las células T activadas

**NF-κB:** factor nuclear kappa β

**NLS:** señal de localización nuclear

**NH:** nódulo de Hensen

**NHE-1:** intercambiador de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$

**NOX:** NADPH oxidasa

**NPPA:** gen que codifica para el péptido natriurético atrial

**NRF1/2:** factores respiratorios nucleares 1 y 2

**NRG1:** neuregulina 1

**Omi/HtrA2:** del inglés *high temperatura requirement inducing factor*

**OXPHOS:** fosforilación oxidativa

**pRb:** proteína del retinoblastoma

**p90RSK:** proteína quinasa S6 ribosomal p90

**P110 $\alpha$ :** isoforma 1 alfa de la PI3K

**PC:** primordios cardiacos

**PCNA:** antígeno nuclear de células proliferantes

**PDH:** piruvato deshidrogenasa

**PE:** fenilefrina

**PI3K:** fosfoinositol 3 quinasa

**PGC1 $\alpha$ :**coactivador de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas 1 $\alpha$

**PIP2:** fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

**PKA:** proteína quinasa A

**PLC $\beta$ :** isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C

**PKC:** proteína quinasa C

**PKD:** proteína quinasa D

**POLD1:** ADN polimerasa delta 1

**POLG:** ADN polimerasa gamma

**PPAR $\alpha$ :** receptor activado por proliferadores peroxisomales  $\alpha$

**PP2A:** serina-treonina fosfatasa 2A

**PP2B:** serina-treonina fosfatasa 2B

**PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**PTPS:** proteína tirosina fosfatasa

**RIRR:** del inglés *ROS-induced ROS release*

**RF1:** factor de liberación de la traducción

**RPOL:** ARN polimerasa mitocondrial

**RRF:** factor de liberación de la traducción

**RS:** retículo sarcoplásmico

**RYR2:** receptores de rianodina

**S:** somita

**SAV:** proteína de anclaje Salvador

**Serca2:** ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$

**SH:** sulfhidrilo

**SHR:** rata espontáneamente hipertensa

**SKA:** alfa actina esquelética

**SOD:** superóxido dismutasa

**Sp1:** del inglés *specificity protein 1*

**SRC:** coactivador del receptor de esteroides

**SRF:** factor de respuesta al suero

**SSB:** proteína de unión al ADNmit de hebra única

**STAT:** factor transductor de señales y activador de la transcripción

**TBX:** del inglés T-box

**TC:** tubo cardiaco

**TEAD:** del inglés *TEA domain family members*

**TERF:** factor de terminación de la transcripción mitocondrial

**TFAM:** factor de transcripción mitocondrial A

**TFA1B:** Factor de inicio de la transcripción mitocondrial

**TGFβ:** factor de crecimiento transformante beta

**Tyr:** tirosina

**Trx1:** tiorredoxina 1

**um:** micras

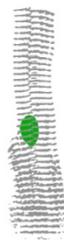
**UQ:** ubiquinona

**UTR:** región no traducida

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

**WNT:** del inglés *wingless-type MMTV integration site family member*

**Yap:** del inglés *Yes-associated protein*



# ntroducción

*En algún lugar algo increíble espera ser descubierto*

*Carl Sagan*



# 1. Anatomía y fisiología del corazón

## 1.1. Estructura y función del corazón

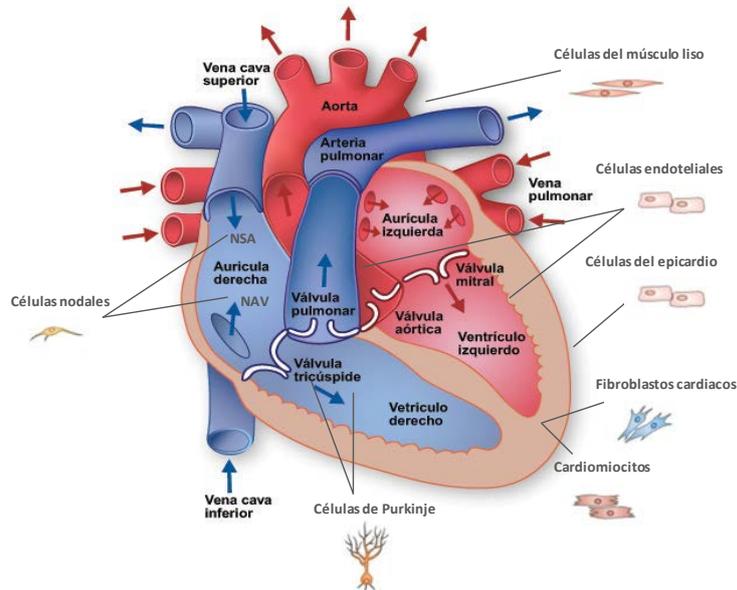
El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio y su importancia es tal que es uno de los primeros órganos en formarse y empezar a ejercer su función, ya que es el encargado de bombear la sangre a todos los rincones del organismo a través de los vasos sanguíneos.

El corazón está situado dentro de un saco fibroso que lo envuelve, el pericardio, el cual impide que se desplace de su posición y que al mismo tiempo tenga la suficiente libertad para que se pueda contraer. La capa más externa del corazón, el epicardio, está en contacto directo con el pericardio visceral. El epicardio se compone de mesotelio y tejido conectivo delgado, que confiere textura lisa y resbaladiza a la superficie externa. El miocardio o capa muscular intermedia consta de haces entrelazados de fibras musculares cardíacas y es, por tanto, la que le confiere la capacidad de contracción al corazón. Por último, la capa interna o endocardio reviste las cavidades del corazón, cubre las válvulas y se continúa con la membrana de revestimiento de los grandes vasos sanguíneos<sup>1</sup>.

A nivel celular, el corazón está formado por diferentes tipos celulares que contribuyen a las propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas del mismo. De entre ellos destacan los cardiomiocitos, que ocupan la mayor parte del volumen tisular y, sin embargo, contribuyen sólo al 30% del número total de células. Los cardiomiocitos se pueden clasificar en dos grupos: los auriculares y ventriculares, responsables de la contracción muscular, y los de conducción y excitación, fibras de Purkinje y células nodales que forman el haz de His y los nódulos sinoauricular y auriculoventricular respectivamente, especializados en conducir el potencial de acción y excitar a los cardiomiocitos anteriores. El 70% de células restantes corresponde a fibroblastos cardíacos, la inmensa mayoría, así como a células endoteliales que forman el endocardio, las válvulas cardíacas y los conductos sanguíneos, y células del músculo liso que contribuyen al sistema vascular de entrada y salida del corazón, y a las arterias coronarias<sup>2</sup> (figura 1).

El corazón está formado por cuatro cámaras huecas: dos ventrículos y dos aurículas. Los primeros sirven para expulsar la sangre fuera del corazón a través de las arterias; las últimas, para recibirla desde las venas. El corazón presenta bilateralidad, de forma que tiene una aurícula y un ventrículo a la derecha, y otro par de cámaras a la izquierda. El ventrículo y la aurícula de cada lado están comunicados por válvulas que

permiten el paso de la sangre, mientras que las partes situadas a la izquierda y derecha del corazón no se comunican, estando separadas por una pared muscular denominada septo<sup>2</sup> (figura 1).



**Figura 1: Estructura del corazón.** Corte transversal de un corazón donde se muestran las diferentes partes del mismo y los tipos celulares que lo forman<sup>1</sup>.

El corazón funciona como dos bombas separadas, una derecha que impulsa la sangre hacia los pulmones, y una izquierda que la impulsa hacia los órganos periféricos. La sangre accede al corazón por la aurícula derecha desde las venas cavas inferior y superior, después de pasar por todo el cuerpo oxigenando los tejidos y órganos. A través de la válvula tricúspide, la sangre pasa al ventrículo derecho, desde donde es bombeada a la arteria pulmonar hacia los pulmones. Allí, la sangre descarga el dióxido de carbono procedente del metabolismo celular y se carga de oxígeno, volviendo al corazón a través de las cuatro venas pulmonares, para desembocar en la aurícula izquierda. La sangre ahora pasa al ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral. El ventrículo izquierdo es considerado la cámara principal y se encarga de impulsar la sangre, que saldrá por la válvula aórtica hacia la aorta, con suficiente fuerza para que circule por todo el cuerpo<sup>3</sup>.

La clave de esta circulación de la sangre a través de las cámaras cardíacas es la existencia de movimientos rítmicos y automáticos de contracción y relajación, llamados sístole y diástole. Durante la sístole, los ventrículos se contraen, reduciendo su tamaño y volumen, por lo que la sangre contenida en ellos saldrá hacia sus respectivas arterias; la diástole, por el contrario, consiste en una relajación del músculo cardíaco o miocardio, que provoca un aumento de volumen acompañado de una caída de la presión. Esto

hace que la sangre que hay en las aurículas tienda a pasar libremente hacia los ventrículos para igualar la presión entre ambas cámaras, llenando otra vez los ventrículos y reiniciando de nuevo el ciclo<sup>3</sup>.

## 1.2. Estructura del cardiomiocito y músculo cardiaco

Latir es una función propia del corazón, y se debe a células altamente especializadas, los cardiomiocitos, capaces de generar un impulso eléctrico que se distribuye por todo el músculo cardiaco causando su contracción.

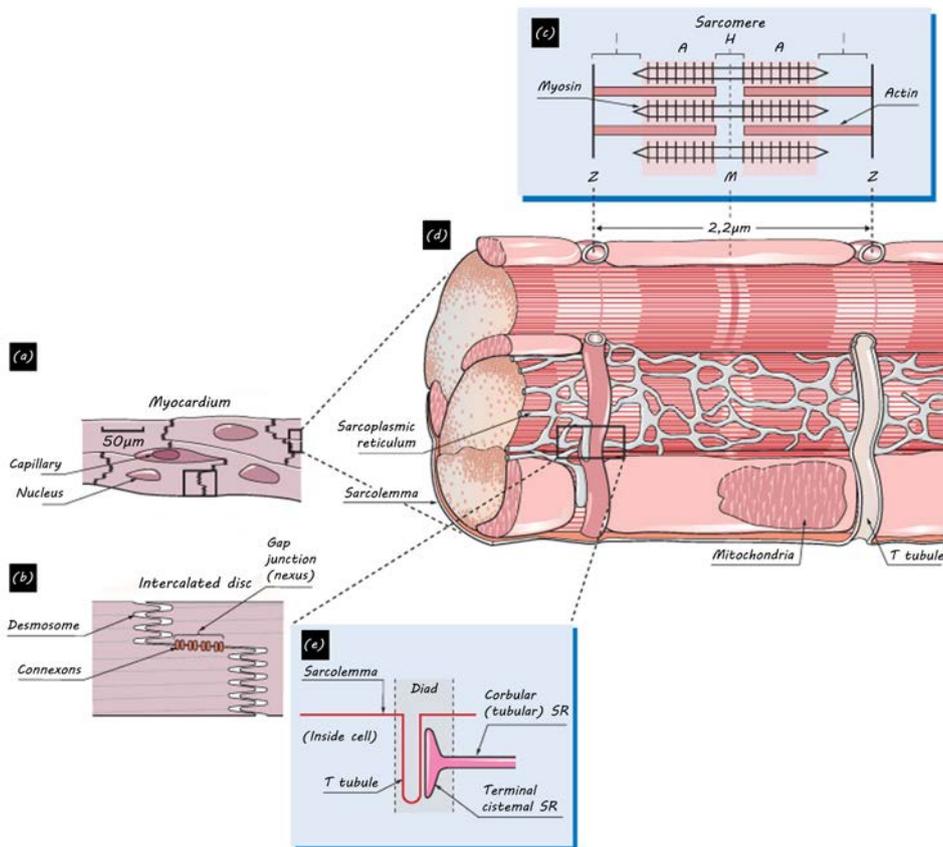
Los cardiomiocitos son células grandes, de unas 25um de diámetro y 100um de longitud, formados por numerosas miofibrillas, que son largas cadenas de proteínas contráctiles compuestas por filamentos gruesos de miosina (bandas A) y filamentos delgados de actina (bandas I) que se superponen. A estas cadenas se asocian un conjunto de proteínas, como troponina y tropomiosina entre otras, que participan en el proceso de contracción muscular, y son esenciales para regular el espaciamiento, unión y alineación precisa de los miofilamentos, constituyendo así los sarcómeros. El sarcómero es, por tanto, la unidad funcional contráctil de la célula<sup>4</sup> (figura 2a y 2c).

A primera vista parece que los cardiomiocitos formen un sincitio, sin embargo, no hay continuidad entre los sarcoplasmas de dos células ya que éstas están separadas por una estructura compleja de unión llamada disco intercalar. Este disco está ubicado a nivel de las líneas Z y permite que las corrientes que se generan en una célula se propaguen a la siguiente. Por esta razón a pesar de que el miocardio no es un sincitio, sí se comporta como tal (figura 2b).

La membrana del cardiomiocito llamada sarcolema, presenta invaginaciones en forma de dedo que se adentran profundamente hacia el interior de la célula formando los túbulos T. La función de los túbulos T es ampliar la superficie de contacto del exterior e interior celular, a fin de facilitar que los intercambios iónicos a través de la membrana se produzcan rápida y sincrónicamente. Es por ello que están en contacto íntimo a través de unas invaginaciones saculares llamadas cisternas terminales con el retículo sarcoplásmico (RS), que es una red tubular en el interior de la célula cuya misión es el almacenamiento de  $Ca^{2+}$  y su liberación durante la contracción muscular<sup>4</sup> (figura 2d y 2e).

Este proceso de contracción se desencadena al producirse cambios de potencial de acción en la membrana del cardiomiocito, que provocan la apertura de canales de calcio de tipo L sensibles a voltaje (LTCC). La entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula es rápida y con

un flujo bajo, lo que causa una activación de los receptores de rianodina (RyR2) que se encuentran en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS). Esta activación resulta en una salida masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS hacia el citoplasma, aumentando su concentración intracelular en 100 veces y provocando una serie de cambios conformacionales en la troponina que permite que la miosina, previa hidrólisis del ATP, se deslice sobre la actina, acortando así la fibra muscular. El proceso termina mediante lo que se denomina "relajación activa": la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Serca2) transporta el  $\text{Ca}^{2+}$  de nuevo al RS mediante hidrólisis de ATP, descendiendo la concentración citosólica de este ión a niveles de reposo<sup>5,6</sup>.



**Figura 2: Estructura del músculo cardíaco**<sup>4</sup>. (A). Dibujo de la sección transversal del miocardio donde se aprecia la posición central de los núcleos en las células cardíacas. (B). Representación de la conectividad entre sarcoplasmas de dos cardiomiocitos. (C). Organización básica de un sarcómero donde se muestra la ubicación centralizada de la miosina (banda A) y la actina (banda I). (D). Disposición del retículo sarcoplásmico y túbulos T en las miofibrillas cardíacas. (E). Dibujo de la sección longitudinal en la zona de contacto entre un túbulo T y el retículo sarcoplásmico.

Desde el punto de vista estructural, el músculo cardíaco es un músculo estriado con características funcionales que lo colocan entre el músculo esquelético y el músculo liso. Se trata de un tejido muscular de contracción involuntaria y rítmica, cuyas fibras presentan en su citoplasma una estriación transversal y se bifurcan formando una red tridimensional compleja.

Existen dos tipos de fibras cardíacas: conductoras y contráctiles. Las fibras conductoras se encargan de la conducción de los impulsos nerviosos y se localizan en los nódulos sinoauricular y auriculoventricular, y continúan por el haz de His. Carecen de túbulos T y de discos intercalares, y presentan escasa cantidad de miofilamentos y gran cantidad de gránulos de glucógeno. Las fibras contráctiles, al igual que las fibras musculares esqueléticas, tienen una estriación transversal, pero solamente presentan uno o dos núcleos ovalados de posición central con uno o dos nucleolos. La constitución de sus miofilamentos es similar al de las fibras musculares estriadas esqueléticas, diferenciándose únicamente en las líneas Z, que se localizan en las bandas escaleriformes (discos intercalares) y parecen cruzar de una célula a otra. En las caras laterales presentan uniones tipo Gap, que permiten transmitir la onda de despolarización para conseguir que todas las fibras musculares cardíacas se contraigan al mismo tiempo<sup>7,8</sup>.

Las fibras cardíacas contráctiles contienen numerosas mitocondrias que se disponen entre las miofibrillas irregulares, bajo la membrana celular y en los extremos del núcleo. Éstas son largas (a veces se extienden a lo largo de varios sarcómeros) y poseen muchas crestas que casi ocultan la matriz. Debido a que el músculo cardíaco no contiene casi reservas energéticas en forma de lípidos o de glucógeno y al alto contenido mitocondrial que posee, constantemente se está produciendo la respiración aeróbica en las células cardíacas, por lo que el aporte de oxígeno y nutrientes a través de la sangre ha de ser continuo para satisfacer la demanda energética ilimitada del corazón<sup>9</sup>.

## 2. Cardiogénesis: desarrollo embrionario del corazón

### 2.1. Visión general de la morfogénesis cardíaca

Desde etapas muy tempranas el corazón tiene un papel vital en la distribución de nutrientes y oxígeno en el embrión, así como en la recogida de productos de desecho procedentes de la actividad metabólica. La rápida tasa de crecimiento del embrión limita muy pronto la toma de oxígeno y nutrientes por difusión, por lo que el sistema cardiovascular debe satisfacer la demanda metabólica embrionaria precozmente<sup>10</sup>.

En aves y mamíferos, los progenitores cardíacos comienzan a generarse durante las etapas iniciales de la gastrulación. Las células de una de las capas embrionarias, el epiblasto, migran convergiendo en la línea primitiva (LP) (figura 3A) e ingresan a través de ésta, dando lugar a un embrión formado por tres capas embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Un subconjunto de células mesodérmicas que ingresa por la línea primitiva migra antero-lateralmente, situándose a ambos lados y formando en ratón de 7,5 días (E7,5) dos regiones separadas y pareadas conocidas como Hfr (del inglés *Heart forming region*) (figura 3B)<sup>11,12,13</sup>. Los precursores cardíacos continúan migrando hacia la región anterior y medial del embrión, formando los primordios cardíacos (PC) (figura 3C), que se sitúan en posición caudal con respecto a la cabeza y se aproximan a la línea media del embrión para fusionarse (figura 3D)<sup>14</sup>. Previo a la fusión de los primordios cardíacos, las células del mesodermo cardíaco se diferencian en progenitores miocárdicos y endocárdicos<sup>15</sup>. En el embrión de ratón de 7,8 días (E7,8) los primordios cardíacos ya fusionados forman el tubo cardíaco lineal (figura 3E), que está conectado al embrión a través del mesocardio dorsal<sup>16</sup>. El tubo está compuesto por una capa externa de miocardio y otra interna de endocardio, conectadas por matriz extracelular<sup>17</sup>. Conforme avanza el desarrollo, el tubo cardíaco se elonga tanto por el polo arterial (porción rostral), como por el polo venoso (porción caudal), y en el embrión de ratón de 8,5 días (E8,5) se curva hacia la derecha para formar el asa cardíaca (figura 3F)<sup>18</sup>. Este plegamiento restringe la presencia del mesocardio dorsal a las regiones anterior y posterior del corazón<sup>19</sup>. Durante la formación del asa cardíaca, las cámaras ventriculares pasan de estar alineadas rostro-caudalmente, a tener un alineamiento izquierda/derecha, generando un corazón tetramérico en aves y mamíferos, que puede soportar una doble circulación sistémica y pulmonar<sup>20</sup>.

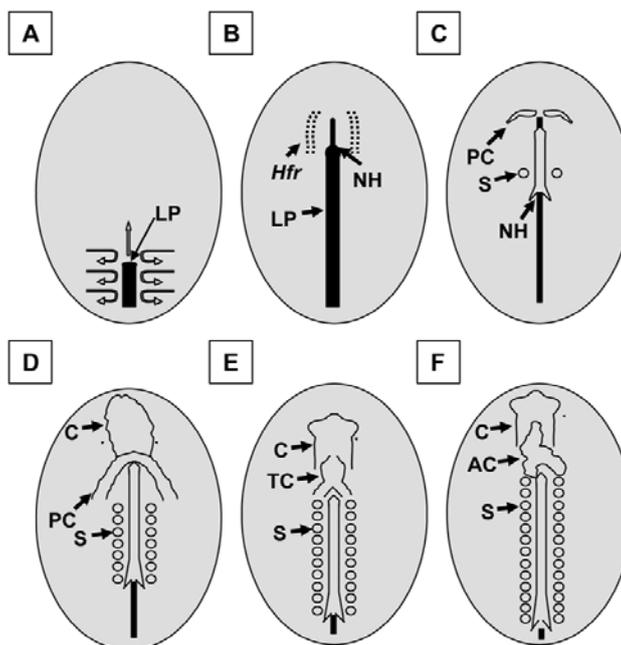
En los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de otra fuente de precursores cardíacos mesodérmicos, procedentes del que ha sido denominado campo

cardíaco secundario (CCS)<sup>21,22</sup>. En el embrión de ratón las células del CCS se localizan en el mesodermo faríngeo y contribuirían a la formación del tracto de salida, el ventrículo derecho, así como determinadas regiones auriculares (Fig. C)<sup>23,24,25,26</sup>. Se trata de un tema controvertido, puesto que para algunos autores sólo existe un único campo cardíaco a partir del cual las células mesodérmicas sufren dos oleadas de diferenciación separadas en el tiempo<sup>27</sup>.

En cualquier caso, la idea importante para este trabajo es que durante el desarrollo embrionario los cardiomiocitos se van a ir incorporando al corazón mediante dos mecanismos básicos: (1) a partir de la diferenciación de precursores cardíacos y (2) a partir de la división de cardiomiocitos ya existentes. Estudios en diferentes especies sugieren que se produce una transición de la diferenciación al crecimiento proliferativo para construir las diversas estructuras del órgano maduro. La dinámica proliferativa es distinta entre las especies y es probable que esto sea la base de las diferencias en la estructura cardíaca entre especies.

**Figura 3: Representación esquemática de los estadios iniciales del desarrollo embrionario del corazón.**

(A). Movimiento de las células del epiblasto en el embrión para formar el mesodermo. (B). Dibujo de las células de la región de formación del corazón (Hfr) como líneas discontinuas. (C). Aproximación de los primordios cardíacos (PC) a la línea media del embrión. (D). Embrión en el que los primordios cardíacos en posición caudal con respecto a la cabeza se han fusionado. (E). Formación del tubo cardíaco (TC) en la posición medial del embrión. (F). Giro del tubo cardíaco hacia la derecha para formar el asa cardíaca (AC). LP: línea primitiva; NH: nódulo de Hensen; S: somita; C: cabeza.



## 2.2. Principales redes de regulación génica en el desarrollo cardíaco

Durante el desarrollo embrionario, las células de los distintos territorios sufren un proceso de especificación, determinación y diferenciación para dar lugar a los diferentes tejidos de un organismo adulto.

Entre las primeras señales responsables de la especificación de los progenitores cardiacos se encuentran las que provienen del endodermo faríngeo y tejidos adyacentes al mesodermo, como el ectodermo y la notocorda (figura 4A)<sup>28,29,30</sup>. El endodermo se encuentra próximo a los campos cardiacos, y la señalización que proviene de éste a través de los miembros de la superfamilia de factores de transformación y crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ; del inglés *transforming growth factor  $\beta$* ), como la subfamilia BMP, junto con la cooperación de miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; del inglés *fibroblast growth factor*), promueven la diferenciación a miocardio<sup>31</sup>.

Los factores WNT (del inglés *wingless-type MMTV integration site family member*), miembros de una familia de glucoproteínas, activan o inhiben la cardiogénesis dependiendo del factor y del momento del desarrollo embrionario. El factor WNT 11 activa la cardiogénesis a través de la vía WNT/JNK<sup>32</sup>. Por el contrario, los factores WNT3a y WNT8c secretados por el ectodermo, actúan a través de la  $\beta$ -catenina (vía canónica) inhibiendo la diferenciación cardiaca<sup>31</sup> (figura 4B). De este modo, la modulación de la actividad de los factores WNT a lo largo del eje antero-posterior del embrión temprano de pollo, establece competencia para formar el corazón o células sanguíneas en respuesta a señales de los miembros BMP<sup>33,34</sup>.

También desde la notocorda se secretan otros factores inhibidores de la cardiogénesis, como NOGINA y CORDINA<sup>30</sup>. La exposición a la secreción de NOGINA, que antagoniza la señalización a través de BMP, inhibe completamente la diferenciación del mesodermo precardiaco<sup>33,35</sup>. De esta manera, en el inicio del proceso de diferenciación cardiaca en vertebrados, es el balance entre señales positivas (como pueden ser BMP o FGF) y negativas (como la vía canónica de WNT) el que define la activación del núcleo central de factores de transcripción que promueven la diferenciación a miocardio (figura 4B).

El núcleo de factores de transcripción cardiacos forma parte de una red génica muy conservada en la evolución y se encuentra distribuido principalmente en cinco grandes familias: NKX2.X, MEF2 (del inglés *myocyte-specific enhancer factor*), GATA (del inglés *globin transcription factor*), TBX (del inglés *T-box*) y HAND (del inglés *heart and neural crest derivatives expressed*) (figura 4B).

El factor NKX2.5 es el primer marcador de diferenciación cardiaca identificado en embriones de vertebrados. En ratón se expresa alrededor del día E7.5, y esta

expresión se mantiene en el corazón adulto<sup>34</sup>. El ratón nulo de *NKX2.5*, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, sí llega a formar el tubo cardiaco, pero muere entre los días E9 y E10, presentando defectos morfogénicos en la formación del tubo cardiaco<sup>36</sup>.

Los factores de transcripción MEF2 son los más antiguos y conservados entre especies, y se expresan en los precursores cardiogénicos, cardiomiocitos, así como en células del músculo liso y esquelético<sup>37</sup>. En vertebrados se han descrito 4 miembros: MEF2 A, B, C y D, siendo MEF2A el más abundante en corazón<sup>38</sup>. MEF2C es necesario para la activación de genes que codifican para proteínas contráctiles y la formación de estructuras cardiacas como el ventrículo derecho<sup>39</sup>; sin embargo, su función no es esencial para el crecimiento postnatal del corazón, ni para la función del músculo estriado<sup>40</sup>. Por otro lado, MEF2A y D son importantes para la biología postnatal del corazón, puesto que ratones deficientes en MEF2A tienen una desorganización importante de las mitocondrias, dilatación del ventrículo derecho, y mueren poco después del nacimiento<sup>41</sup>; mientras que MEF2D está implicado en la respuesta del miocardio adulto al estrés, sin ninguna contribución evidente en el desarrollo cardiaco<sup>42</sup>.

Los factores de transcripción GATA están representados en vertebrados por 6 miembros (GATA1 a GATA6), de los cuales *Gata4/5/6* se expresan en tejidos mesodérmicos y endodérmicos durante el desarrollo del corazón<sup>43</sup>. Recientemente se ha encontrado que los factores GATA regulan directamente la transcripción de genes que codifican para proteínas contráctiles y otros genes reguladores como *MEF2* y *HAND*<sup>34</sup>.

De los 18 genes *TBX* presentes en vertebrados, 6 están implicados en el desarrollo embrionario del corazón: *TBX1*, *TBX2*, *TBX3*, *TBX5*, *TBX18* y *TBX20*. Entre ellos destaca *TBX5*, dado su papel en la proliferación de cardiomiocitos<sup>44</sup> y en la migración de las células del proepicardio<sup>45</sup>. El ratón nulo de *TBX5* presenta alteraciones en la estructura sinoauricular y en la formación del sistema de conducción cardiaca, así como una reducida expresión de *NKX2.5*, y una ausencia en la expresión de otros factores de transcripción como *GATA4* e *IRX4*<sup>46</sup>.

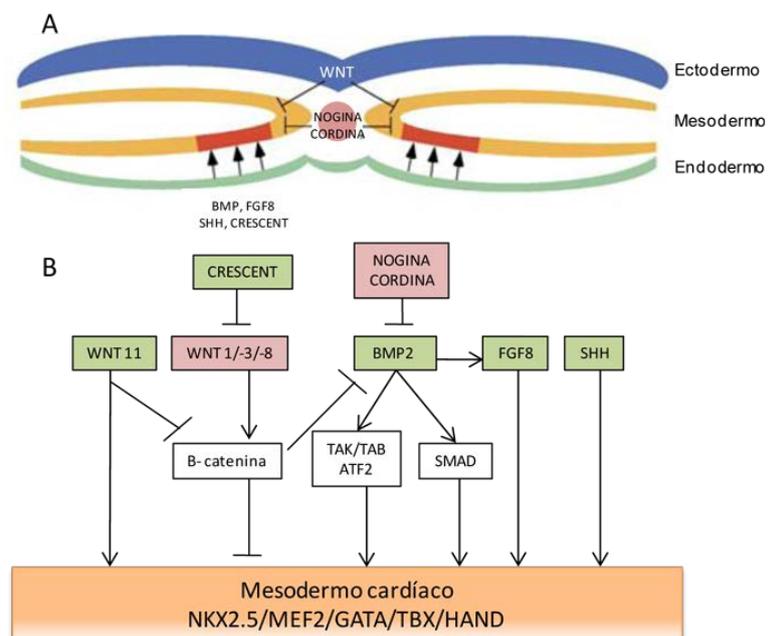
Los factores *HAND* regulan el crecimiento ventricular<sup>47</sup>. En ratón se expresan 2 genes *HAND*, *HAND1* en el campo cardiaco primario y *HAND2* en el campo cardiaco secundario. Los ratones nulos para *HAND2* no forman el ventrículo derecho<sup>48</sup>, y las

células madre embrionales sin *HAND1* son incapaces de contribuir a la curvatura del corazón que forma el ventrículo izquierdo<sup>49</sup>. La delección de *HAND2* y *NKX2.5*, que regula la expresión de *HAND1* en el campo cardíaco primario, elimina las dos cámaras ventriculares produciendo un corazón formado únicamente por una aurícula<sup>50</sup>. De modo que la duplicación de las cámaras ventriculares durante la evolución se corresponde con la duplicación de los genes *HAND*.

Este grupo de factores de transcripción opera sin un único gen maestro, puesto que es la interacción de todos los componentes la que estabiliza y refuerza el programa cardíaco<sup>34,51,21</sup>. Las señales desde el endodermo faríngeo<sup>30,52</sup> activan la expresión temprana del gen *NKX2.5*<sup>53</sup>, que coopera con otros factores de transcripción, como GATA4, el factor de respuesta al suero (SRF; del inglés *serum response factor*) y TBX<sup>54</sup>, regulándose mutuamente mediante bucles de retroalimentación positiva<sup>47</sup>. La activación de *NKX2.5* activa a su vez la expresión de otros genes específicos del miocardio, como *MEF2C*, troponina cardíaca I (*cTNI*; del inglés *cardiac troponine I*), troponina cardíaca C (*cTNC*; del inglés *cardiac troponine C*), actina alfa del músculo cardíaco 1 (*ACTC1*; del inglés *alpha-cardiac actin 1*) o proteínas de los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ <sup>55</sup>. Las señales inductoras del endodermo faríngeo actúan sobre precursores del campo cardíaco primario y secundario, aunque la coordinación en la señalización celular requerida para regular la proliferación, la migración y la diferenciación del campo cardíaco secundario es diferente y más compleja<sup>56,57</sup>.

**Figura 4: Red de factores y rutas de señalización implicados en la cardiogénesis.**

(A). Relación espacial entre los factores de inducción cardíacos segregados por el endodermo faríngeo (verde) y factores inhibitorios secretados por el ectodermo (azul) o la notacorda (rosa). (B). Diagrama que muestra las principales rutas de señalización implicadas en la inducción cardiogénica.



## 3. Crecimiento y desarrollo postnatal del corazón

### 3.1. Proliferación de los cardiomiocitos en el período postnatal

Durante décadas el corazón ha sido considerado un órgano post-mitótico<sup>58</sup>. Como se ha explicado anteriormente, el corazón se forma a partir de células precursoras cuya proliferación disminuye tras diferenciarse en cardiomiocitos. Estos cardiomiocitos forman el tubo cardiaco lineal, una estructura de lenta proliferación que posteriormente se pliega, activándose un programa de aumento en el tamaño celular, que junto al proceso proliferativo dará lugar a la formación de las cámaras<sup>59,60,61</sup>. El crecimiento posterior del corazón fetal se producirá por la proliferación continua de cardiomiocitos; sin embargo, tras el nacimiento el corazón pasa de un crecimiento hiperplásico a uno hipertrófico<sup>62</sup>, o lo que es lo mismo, de la división de cardiomiocitos al simple crecimiento del tamaño de los mismos, ya que éstos entran en un estado de quiescencia o reposo interrumpiendo su ciclo proliferativo. En ratones se ha descrito que esa parada del ciclo celular se acompaña de una última ronda de división nuclear sin citoquinesis o división celular, dando lugar a una gran mayoría de cardiomiocitos binucleados<sup>63,64</sup>.

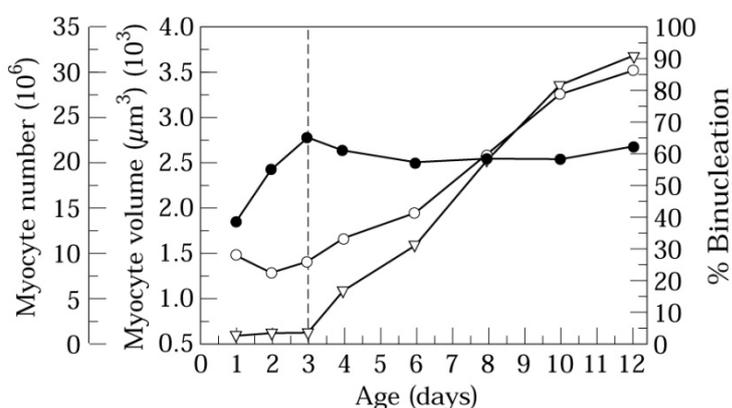
De este modo, el proceso de crecimiento y proliferación de los cardiomiocitos de ratón en el período postnatal se puede dividir en tres fases: una primera fase de hiperplasia o aumento del número de cardiomiocitos mayoritariamente monucleados/diploides, que iría desde el nacimiento hasta el día 6 del periodo perinatal; una segunda fase de transición entre los días 6 y 14 tras el nacimiento, donde tendría lugar simultáneamente la hiperplasia y la hipertrofia; y finalmente, una tercera fase de hipertrofia a partir del día 14, donde los cardiomiocitos mayoritariamente binucleados/poliploides sólo crecerían en tamaño (figura 5)<sup>65,66</sup>.

Recientemente se ha identificado otro pico de proliferación en ratones alrededor de los 15-18 días de edad, lo que extendería la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos, concediéndole un papel significativo en el crecimiento cardiaco<sup>67</sup>. Los autores de este trabajo cuantifican un aumento de 500.000 cardiomiocitos durante la tercera semana de vida, que se correlaciona con un incremento en el marcador nuclear de proliferación 5-bromo-2'desoxiuridina (BrdU) en dichos corazones. Puesto que otros autores no han encontrado esta explosión proliferativa en los corazones de ratones durante las primeras tres semanas de vida, este estudio ha sido objeto de intensos debates utilizando diferentes tipos de técnicas: ensayos de determinación del número de cardiomiocitos o ensayos con marcadores de proliferación como BrdU, anilina, Ki-67,

ciclina B1, ciclina A2, entre otros<sup>68,69,70</sup>. Este debate ha puesto de manifiesto la dificultad de obtener e interpretar correctamente los datos de proliferación en cardiomiocitos, que pueden variar debido a factores técnicos como, por ejemplo, la eficiencia enzimática de la digestión cuando se realiza el aislamiento de los cardiomiocitos, la determinación del área de muestreo y el efecto del número de crías por parto para el desarrollo cardíaco en la etapa preadolescente<sup>71</sup>.

El proceso de binucleación tiene lugar alrededor del cuarto día tras el nacimiento, donde el porcentaje de células binucleadas pasa del 4% al 17% y continúa hasta llegar a ser de un 90% doce días después del nacimiento (figura 5). Esto sugiere que los cardiomiocitos pierden la capacidad de dividirse antes de que se produzca la parada en el ciclo celular, y es esa falta de citoquinesis lo que lleva a la formación de cardiomiocitos binucleados<sup>65,66</sup>. Inicialmente se propuso que el bloqueo en la división celular resultaba de un fallo en los sarcómeros para desmontarse completamente durante la mitosis<sup>63</sup>, ya que los cardiomiocitos debían estar latiendo continuamente, y no estaba nada claro que pudiera producirse al mismo tiempo la contracción y la división celular. A día de hoy no existen evidencias que apoyen esta hipótesis<sup>72</sup>, puesto que los cardiomiocitos fetales, neonatales y adultos en situaciones particulares, que presentan un aparato funcional contráctil, pueden sufrir un proceso de división celular.

Figura 5: Cambio en el número (●), volumen (○) y el % de nucleación (▽) de los cardiomiocitos aislados de corazones de rata neonatal durante los primeros 12 días de vida.<sup>65</sup>



El porcentaje de binucleación en la edad adulta varía entre las distintas especies, siendo sólo del 25% al 60% en humanos, a pesar de que una fracción muy alta de cardiomiocitos mono y binucleados son poliploides como resultado de un proceso de endoreplicación<sup>73,74</sup>.

La observación de una binucleación precoz de los cardiomiocitos en corazones fetales bajo un aumento del estrés hemodinámico sugiere que el porcentaje de

cardiomiocitos binucleados puede ser función de la demanda hemodinámica específica de la especie<sup>75,76</sup>. Pese a que se conoce muy poco acerca de la relación entre el porcentaje de cardiomiocitos binucleados y la demanda hemodinámica, sí que es sabido que (1) el crecimiento hipertrófico es una función de la demanda hemodinámica (como se explicará más adelante en el apartado 4), y que (2) el aumento de este crecimiento hipertrófico en los cardiomiocitos parece estar correlacionado positivamente con el incremento en la ploidía<sup>77,78</sup>. La binucleación tendría un papel ventajoso, ya que permitiría a la célula generar el doble de cantidad de ARN mensajero, y por tanto de proteína, optimizando la respuesta celular en una situación de estrés<sup>79</sup>. De este modo, las variaciones en el porcentaje de cardiomiocitos binucleados entre especies pueden reflejar requisitos específicos de especie en el potencial hipertrófico, para acomodar fluctuaciones en la demanda hemodinámica.

Los mecanismos moleculares responsables del proceso de binucleación en los cardiomiocitos siguen siendo desconocidos. Este proceso parece estar estrechamente asociado con la regulación del ciclo celular, ya que es evidente que un marcado cambio en la actividad del ciclo celular debe ocurrir para lograr la binucleación.

### **3.2. Diferenciación y salida del ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales**

La salida del ciclo celular es con frecuencia un suceso esencial para el proceso de diferenciación celular. Por ejemplo, en el músculo esquelético, la proliferación de mioblastos y su diferenciación en miotubos contráctiles es mutuamente excluyente<sup>80</sup>. Por el contrario, los cardiomiocitos fetales proliferan durante el desarrollo cardiaco aunque ya contienen un aparato contráctil y se contraen activamente<sup>81</sup>. De modo que su función contráctil no requiere realmente de su salida del ciclo celular, lo que dificulta la definición de "cardiomiocitos diferenciados", ya que la diferenciación en este caso parece ser un proceso continuo que se asocia con una disminución progresiva de la capacidad proliferativa.

Tras el nacimiento, el corazón tiene que aumentar el gasto cardiaco para mantener su función contráctil en un ambiente diferente al embrional (con una resistencia vascular aumentada, variaciones en la tasa metabólica y en los suministros de sustratos energéticos, etcétera), lo que lleva a una especialización del cardiomiocito para hacer frente a todas esas nuevas necesidades<sup>82,83</sup>.

Esa diferenciación del cardiomiocito incluye una disminución en la expresión de genes fetales, como el de la cadena pesada de la beta miosina ( $\beta$ -MHC) y el péptido

natriurético atrial (ANP)<sup>84</sup>, y un aumento en la expresión de genes responsables de un fenotipo más adulto. Se produce así un cambio en las isoformas y tipos de proteínas relacionadas con la estructura y la contractibilidad cardíaca<sup>85</sup>, originándose una sarcomerización más desarrollada y compacta que en la edad neonatal. Además, los cardiomiocitos de un corazón adulto utilizan ácidos grasos de cadena larga como principal sustrato para la producción de ATP a partir de la fosforilación oxidativa, mientras que en el corazón fetal, que funciona en un ambiente relativamente hipóxico, éstos obtienen su energía a partir del catabolismo de la glucosa y lactato dado que la producción glicolítica anaeróbica del ATP es más eficiente, lo que conlleva un cambio en las isoformas y tipos de proteínas necesarias para el adaptarse al nuevo metabolismo<sup>86</sup>.

La progresión del ciclo celular implica la transducción de señales mitogénicas, que están estrictamente reguladas, a proteínas que se expresan cíclicamente llamadas ciclinas, y éstas a sus dianas catalíticamente activas, quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Para verificar que los procesos en cada una de las fases del ciclo hayan sido completados con precisión antes de pasar a la siguiente, las células han desarrollado una serie de puntos de control gobernados por los diferentes complejos de ciclinas-Cdks<sup>87,88,89,90</sup>.

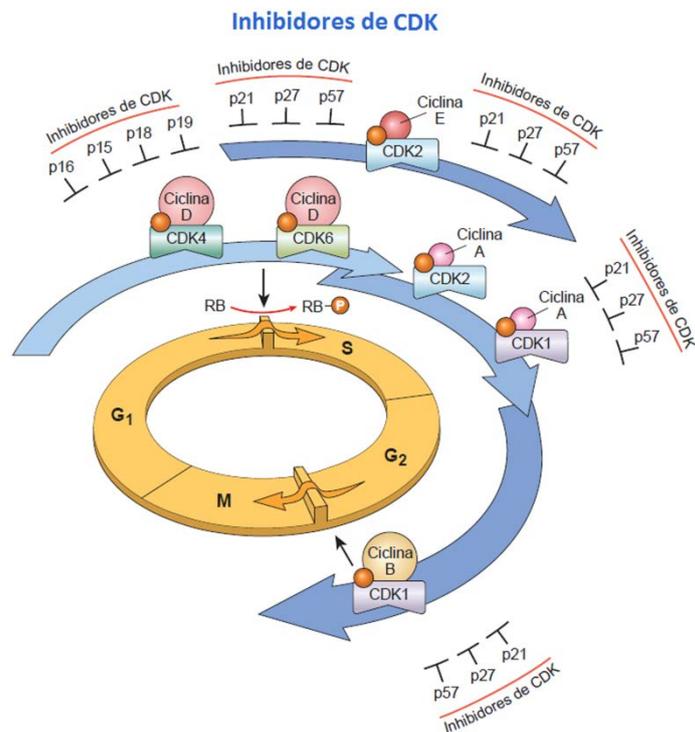
La actividad del complejo ciclina D-Cdk4/6 es máxima en las etapas temprana e intermedia de la fase celular G1 y tiene como función fosforilar e inactivar miembros de la familia del retinoblastoma (pRb, p107 y p130), para que pueda tener lugar la progresión del ciclo. La pRb impide que células con daño en el ADN avancen en el ciclo celular, uniéndose e inhibiendo factores de transcripción de la familia E2F, que forman un complejo con la proteína DP (del inglés *dimerization partner*). El complejo E2F-DP es capaz de activar la transcripción de una serie de genes que inducen la entrada de la célula en la fase S. Mientras este complejo está inactivo, la célula permanece estancada en la fase G1. Es la unión de pRB a E2F la que lo inactiva, de forma que pRb funciona como un supresor de la proliferación celular, al inhibir la progresión del ciclo celular (figura 6)<sup>91,92</sup>.

Otra ciclina asociada a su respectiva quinasa que desempeña un papel crucial en la transición de la fase G1-S es la ciclina E-Cdk2. La expresión de ciclina E ocurre en el núcleo, en una etapa muy temprana de G1, y su sobreexpresión acorta la fase G1<sup>93,94</sup>. Por otro lado, la actividad de la ciclina A contribuye a la transición G1-S, a la progresión

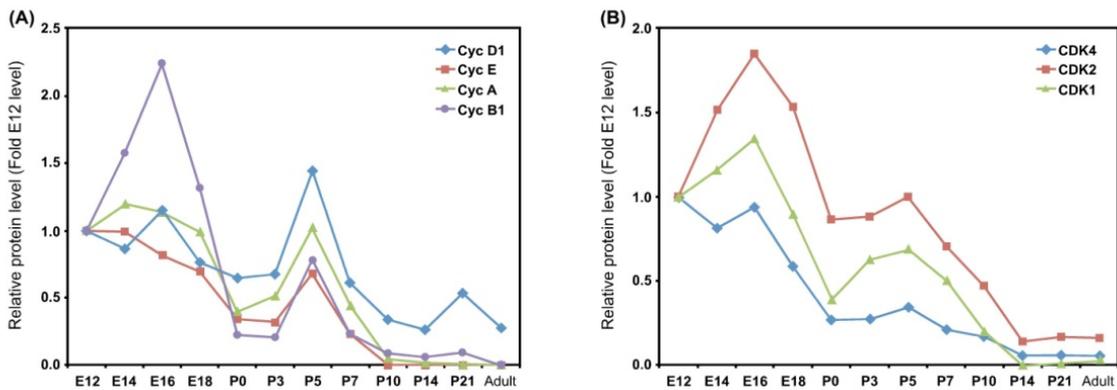
de la fase S y la transición G2-M<sup>95</sup>. Esta ciclina se asocia con dos quinasas: Cdk2 y Cdk1. El complejo ciclina A-Cdk2 es necesario para la progresión de G1-S, mientras que el complejo ciclina A-Cdk1 se requiere para la transición G2-M<sup>96</sup>. Finalmente, la transición G2-M y la progresión de la mitosis están reguladas principalmente por el complejo ciclina B-Cdk1 y ciclina B-Cdk2 (figura 6)<sup>97,98</sup>.

La inhibición de quinasas constituye un poderoso mecanismo de control del ciclo y proporciona un importante enlace con otras vías que participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y senescencia<sup>99,89</sup>. Existen dos familias de inhibidores de Cdk: la INK4 y la Cip/Kip. La familia INK4 (p15, p16, p18 y p19) inhibe específicamente Cdk4/6, la familia Cip/Kip (p21, p27 y p57) tiene una actividad mucho más amplia inhibiendo Cdk4/6, así como Cdk2 y Cdk1 (figura 6)<sup>100,101,102</sup>. El aumento en la expresión de p21 impide la transición de G1/S<sup>103</sup>, y un hecho importante de su regulación es que su síntesis se induce por p53, una proteína supresora de tumores, en respuesta a agentes que dañan el ADN, y por senescencia celular mediante vías dependientes e independientes de p53. Mientras que p21 parece estar controlado por señales internas, se ha demostrado que p27 es un sustrato efector del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), y su incremento en la expresión induce la detención del ciclo en la fase G1<sup>104</sup>.

Figura 6: Modelo representativo de la regulación de la progresión del ciclo celular a través de las ciclinas y sus correspondientes quinasas dependientes de ciclinas (Cdk).



La salida del ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales está relacionada con un cambio en el patrón de expresión de muchas moléculas que participan en la regulación del mismo. El corazón embrionario presenta niveles elevados de expresión de las ciclinas D (D1, D2 y D3) A, E y B1, y de sus correspondientes Cdk. Estos niveles de expresión decrecen gradualmente a partir de los días E12-E16, llegando a alcanzar un mínimo los días P0-P3, e incrementando posteriormente el día P5, para disminuir definitivamente hasta llegar a ser indetectables en cardiomiocitos adultos (figura 7)<sup>105</sup>. El pico de expresión de las ciclinas y Cdk el día postnatal P5 podría explicar un proceso de división nuclear, no seguido de citoquinesis, que generaría la binucleación en los cardiomiocitos postnatales.



**Figura 7: Patrón de expresión de las principales ciclinas y Cdk en corazones de ratón durante el desarrollo embrionario y postnatal.** Los extractos totales de proteína procedentes de los corazones se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra las diferentes ciclinas y Cdk, así como contra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizada como control de carga. La intensidad de cada banda fue cuantificada y normalizada respecto a su control de GAPDH. (A), (B). Representación de la expresión normalizada de las diferentes ciclinas y Cdk con respecto al punto E12, a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal.<sup>105</sup>

Esta regulación negativa en la expresión de ciclinas y sus correspondientes Cdk tras el nacimiento, va acompañada de una disminución en la expresión de genes esenciales para la replicación del ADN como, por ejemplo, la ADN polimerasa delta 1 (*POLD1*)<sup>106</sup> y su cofactor, el antígeno nuclear de células proliferantes (*PCNA*)<sup>106,107</sup>, así como de un incremento en la expresión de inhibidores específicos de las Cdk<sup>108,109,110,111</sup>. El patrón de expresión de algunos de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas también se ha estudiado durante el desarrollo cardiaco. La expresión de los inhibidores de la familia Cip/Kip (p21, p27 y p57) es indetectable durante el desarrollo embrionario, aumenta en la fase perinatal y tiene un pico máximo de expresión en cardiomiocitos adultos<sup>112,113</sup>.

Los resultados obtenidos a partir de ratones deficientes en estas ciclinas y sus quinasas dependientes de ciclinas, argumentan un papel específico para el complejo ciclina D-Cdk4 en el desarrollo cardiaco normal.

Los ratones deficientes en una única ciclina D (D1  $-/-$ ; D2  $-/-$ ; D3  $-/-$ ) no muestran un fenotipo cardiaco; sin embargo, ratones nulos para las 3 ciclinas D mueren durante el período de gestación, presentando anomalías cardiacas como paredes ventriculares muy delgadas y grandes defectos del septo ventricular, así como una hematopoyesis defectuosa<sup>114</sup>. Curiosamente, la progresión del ciclo celular no era irregular en el resto de tejidos de estos embriones, lo que sugiere una función específica de estas proteínas en el desarrollo cardiaco.

De acuerdo con esto, los ratones deficientes para las Cdks 2 y 4 (Cdk2  $-/-$ ; Cdk4  $-/-$ ) mueren durante la embriogénesis (día E15), como resultado de defectos cardiacos<sup>115</sup>. La pérdida de Cdk2 y Cdk4 causa hipofosforilación de proteínas Rb, lo que lleva a la represión de genes diana de E2F implicados en la progresión del ciclo celular a través de la transición G1-S, produciéndose de este modo corazones de tamaño reducido, con paredes ventriculares delgadas y aurículas agrandadas; sin embargo, en los dobles mutantes para Cdk4/6, la progresión del ciclo celular no se ve afectada, lo que sugiere que Cdk2 compensa la falta de quinasas dependientes de ciclina D<sup>116</sup>.

Los inhibidores de Cdks p21, p27 y p57 parecen tener un papel en la detención del ciclo celular de los cardiomiocitos. En cardiomiocitos neonatales y adultos, la disminución de la expresión de p21 y p27 promueve la proliferación y la progresión de las células a través de la fase S del ciclo celular<sup>117</sup>.

### **3.3. Factores que regulan el proceso proliferativo de los cardiomiocitos**

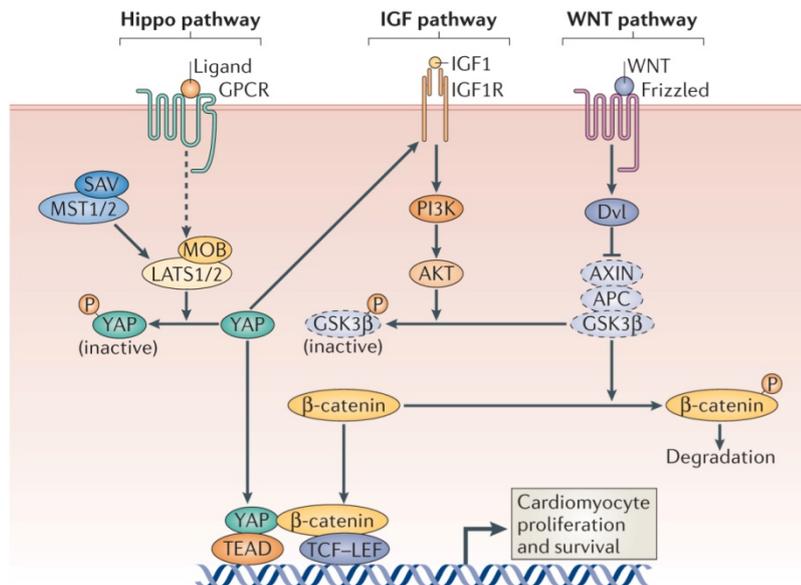
En los últimos años, se ha hecho un gran esfuerzo en tratar de identificar cuáles son los factores intrínsecos y extrínsecos en las células que provocan la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos y, sin embargo, el avance en el conocimiento del control de este proceso proliferativo sigue siendo pequeño.

Aunque se han descrito algunos factores implicados, aún no se conocen bien cuáles son los mecanismos moleculares responsables de la parada permanente de los cardiomiocitos durante la etapa postnatal. Estudiar las vías de señalización implicadas es clave para reactivar la progresión del ciclo celular en ellos, sin que pierdan su potencial de diferenciación.

A continuación se resumen las principales vías de regulación y factores estudiados en los últimos años que han conseguido mejorar el entendimiento acerca del proceso proliferativo de los cardiomiocitos.

**Vía de señalización Hippo.** La señalización Hippo, descubierta recientemente en *Drosophila melanogaster*, regula el tamaño de un órgano mediante la inhibición de la proliferación celular, y en este caso particular, regula negativamente la proliferación de cardiomiocitos durante el desarrollo, así como en la etapa postnatal, de modo que el aumento de tamaño observado en los corazones resultantes de alteraciones en la vía de señalización Hippo, no se debe a una hipertrofia de los cardiomiocitos, sino al aumento de proliferación de los mismos<sup>118</sup>. En esta vía se fosforila al coactivador transcripcional Yap (del inglés *Yes-associated protein*), inactivándolo y excluyéndolo del núcleo, restringiendo así el tamaño del corazón durante el desarrollo fetal en ratones<sup>119,120,121</sup>. El coactivador transcripcional Yap, junto a factores de transcripción de la familia TEAD (del inglés *TEA domain family members*), parece reprimir los genes activados por la vía Wnt/ $\beta$ -catenina durante el desarrollo, para controlar el crecimiento y el tamaño del corazón<sup>119</sup>. Por otro lado, la inducción de la proliferación en cardiomiocitos mediante esta vía implica la activación de la señalización a través del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1), la consiguiente activación de la proteína quinasa B, también llamada AKT, y la inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK-3 $\beta$ ), resultando en la estabilización de la  $\beta$ -catenina que regula positivamente el crecimiento cardiaco (figura 8)<sup>120,122</sup>.

**Figura 8: Regulación de la proliferación en cardiomiocitos por la vía de señalización Hippo<sup>123</sup>.** La eliminación de la proteína de anclaje Salvador (SAV) y las proteínas quinasas de mamífero 1 y 2 similares a STE20 (MST1 y MST2), así como el supresor de tumores grande 1 y 2 (LATS1 y LATS2), promueve la proliferación de cardiomiocitos al no fosforilar a YAP, activándose así la expresión de genes de la vía Wnt a través de la interacción de YAP con la  $\beta$ -catenina.



**Vía de señalización de la MAPK P38.** Las MAPK P38 es un miembro de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que induce la diferenciación y la salida del ciclo celular, y su actividad se correlaciona inversamente con el crecimiento cardiaco<sup>124</sup>. Su activación reduce la proliferación de cardiomiocitos neonatales, mientras que ratones deficientes en la MAPK P38 específicamente en el corazón, muestran un aumento en el número de mitosis de los cardiomiocitos, mediante la activación de genes de ciclo como el que codifica para la ciclina A<sup>125</sup>. La inhibición de la MAPK P38 junto con la adición del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1), puede iniciar la proliferación de cardiomiocitos adultos mononucleados *in vitro* mediante la activación de la vía PI3K/AKT, induciendo un proceso de desdiferenciación transitoria, en el que se eliminan las estructuras sarcoméricas y se completa la citoquinesis<sup>126</sup>. Además, esta combinación de FGF1 e inhibición de la MAPK P38 puede bloquear la apoptosis que se induce en una isquemia de miocardio, aumentando la proliferación de los cardiomiocitos y mejorando la función cardiaca tras un infarto de corazón en ratas adultas<sup>126,127</sup>.

**Vía de señalización Nrg1/ErbB2.** En un estudio nuevo se ha destacado el papel de la regulación de la vía Nrg1/ErbB2 en el control del crecimiento cardiaco postnatal<sup>128</sup>. En ratones, la transición del crecimiento hiperplásico a hipertrófico durante el período neonatal se correlaciona con una reducción en los niveles del coreceptor de la neuregulina 1 (Nrg1), ErbB2. La administración de Nrg1, un miembro de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF), a cardiomiocitos neonatales (P1) aislados de ratón, aumenta rápidamente su proliferación a través de la activación de la vía PI3K-AKT, y este efecto se ve reducido en cardiomiocitos neotales (P7). El mecanismo que explica esta disminución en la sensibilidad de Nrg1 parece ser la regulación negativa de su receptor ErbB2. El número de cardiomiocitos y la proliferación de los mismos se reduce en ratones deficientes en ErbB2 específicamente en el corazón; por el contrario, la expresión constitutivamente activa de ErbB2 conduce a una cardiomegalia patológica con un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos, en la actividad del ciclo celular, la mitosis y la citoquinesis<sup>128</sup>.

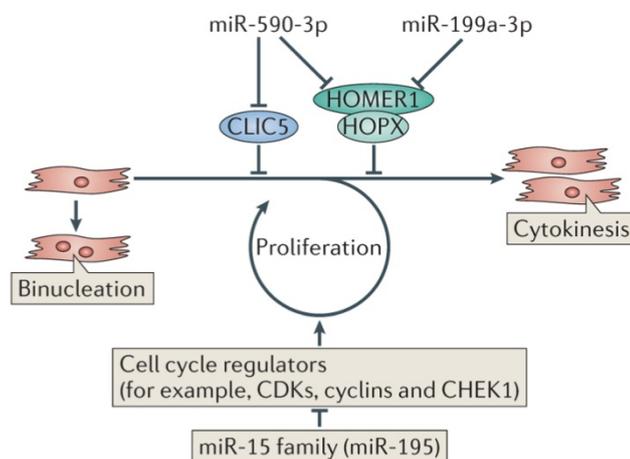
**Regulación por factores de transcripción y miARNs.** En estos últimos años se ha identificado un factor de transcripción llamado Meis1, como un posible regulador clave de la detención del ciclo celular en cardiomiocitos, ya que mantiene niveles altos de los

inhibidores de quinasas dependientes de ciclina Cdkn1a, Cdkn2a y Cdkn2b, y reduce la expresión de los reguladores positivos del ciclo celular<sup>129</sup>.

Además de la regulación a nivel transcripcional, estudios recientes han analizado el papel de los micro ARNs (miARNs) en la regulación post-transcripcional de la proliferación en cardiomiocitos<sup>130</sup>. Los miARNs, una clase de pequeños, no codificantes y conservados evolutivamente ARNs, que regulan negativamente la expresión génica mediante la represión de la traducción de proteínas o mediante la estimulación de la degradación del ARN mensajero (ARNm), parecen estar implicados en la detención de la división celular de los cardiomiocitos posnatales. Uno de ellos, el miR-195, ha sido identificado mediante *microarrays* en los ventrículos neonatales de ratones al estar fuertemente incrementado en corazones de ratones P10, justo cuando los cardiomiocitos han salido del ciclo celular<sup>131</sup>. La sobreexpresión de este miARN durante el desarrollo causa un arresto prematuro del ciclo celular en los cardiomiocitos, generando una hipoplasia congénita cardíaca e impidiendo un proceso de regeneración después de un infarto de miocardio en corazones neonatales P1<sup>132</sup>.

Es razonable pensar que si existen miARNs que fuerzan la salida de los cardiomiocitos del ciclo celular, otros podrían promover su proliferación. Se han identificado 40 miARNs capaces de estimular la duplicación del ADN y la citoquinesis de cardiomiocitos de ratón y rata neonatales en cultivo<sup>133</sup>. De estos 40, los más efectivos son el miR-199a-3p y miR-590-3p, ya que también son capaces de inducir el reingreso de los cardiomiocitos adultos en el ciclo celular y la citoquinesis. *In vivo*, estos miARNs promueven específicamente la proliferación de cardiomiocitos y no la de fibroblastos, tanto en los corazones neonatales como en los adultos tras un infarto de miocardio<sup>133</sup>.

**Figura 9: Regulación de la proliferación en cardiomiocitos por microARNs (miARN).** Los miRNA-590-3p y mi-199a-3p promueven la proliferación inhibiendo la expresión de genes que codifican para proteínas que inhiben la proliferación celular como HOMER1, HOP homeobox (HOPX) y el canal intracelular de cloruro 5 (CLIC5). El miR-195 inhibe la proliferación celular disminuyendo la expresión de genes que codifican para proteínas que activan el ciclo celular como ciclinas, Cdks y la quinasa del punto de control 1 (CHEK1), entre otras.



**Regulación Fisiológica.** En el momento del nacimiento se producen dos situaciones fisiológicas importantes justo cuando los cardiomiocitos se retiran del ciclo celular. Una de ellas es el incremento repentino en la oxigenación como consecuencia del inicio en la respiración; la otra es un aumento repentino de la carga de trabajo en el ventrículo izquierdo, que hace que las células en la superficie interna del corazón, con un mayor estrés mecánico, tengan una proliferación reducida respecto a las de la capa externa y sean las primeras en salir del ciclo celular<sup>134,135</sup>. La respuesta de los cardiomiocitos al aumento en la demanda hemodinámica que ocurre tras el nacimiento será explicada en el apartado 4; a continuación se tratarán las consecuencias para el corazón de realizar su función en un ambiente hiperóxico o con oxígeno.

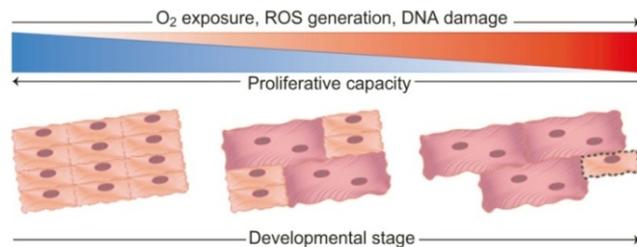
En ratones, la transición de las condiciones relativamente hipóxicas del útero al oxígeno atmosférico tras el nacimiento, se correlaciona con una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un aumento en el daño al ADN de los cardiomiocitos<sup>136</sup>. La ventaja de obtener energía a partir de la fosforilación oxidativa mitocondrial dependiente de oxígeno y no de la glicólisis anaeróbica, no está exenta de consecuencias nocivas, ya que como será explicado en detalle en el apartado 5, la mitocondria es considerada la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno que se generan como consecuencia de la pérdida de electrones por la cadena de transporte electrónico y que pueden causar toxicidad celular promoviendo daño en las proteínas, lípidos o ADN<sup>137,138,139,140</sup>.

Un estudio reciente demuestra que el incremento en la respiración mitocondrial se corresponde temporalmente con un incremento de las ROS en los corazones neonatales y una activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR)<sup>136</sup>. Los autores de este trabajo proponen un mecanismo fisiológico, según el cual, la retirada de los cardiomiocitos del ciclo celular durante el cambio del crecimiento hiperplásico al crecimiento hipertrófico es una respuesta al daño oxidativo en el ADN. El uso de un metabolismo aeróbico que contribuye a la generación y acumulación de ROS conduce a un paro mitótico en los cardiomiocitos para evitar la acumulación de este daño y, por tanto, a la retirada del ciclo celular, manteniéndose la proliferación en la edad adulta sólo en un pequeño grupo de cardiomiocitos que deben residir en un microambiente hipóxico en el epicardio (figura 10)<sup>141</sup>.

El hallazgo de una población de cardiomiocitos hipóxicos que contribuye a la formación de nuevos cardiomiocitos, tras una lesión en el corazón adulto

con características fetales/neonatales, tales como, un menor tamaño celular, mononucleación y ausencia de daño oxidativo en el ADN<sup>142,143,144</sup>, apoya la hipótesis de que el recambio de cardiomiocitos en el corazón postnatal es inhibida por el metabolismo oxidativo y el daño resultante en el ADN.

Figura 10: Modelo de los efectos del oxígeno y ROS en la proliferación de cardiomiocitos<sup>136</sup>.



En pez cebra, que se desarrolla muy bien en condiciones relativamente hipóxicas, los cardiomiocitos no pierden su capacidad proliferativa, sino que la retienen hasta la edad adulta. La recuperación del miocardio tras una lesión por amputación ventricular en el pez cebra a través de la proliferación de cardiomiocitos, se produce mediante una respuesta de hipoxia, es decir, reduciendo la respiración mitocondrial mediante la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa (Hif1 $\alpha$ ), que induce un cambio hacia un metabolismo glicolítico anaeróbico en el citoplasma<sup>145</sup>.

En este sentido, un estudio reciente en el cual se ha examinado la regulación de las vías de estrés celular que activa Hif1 $\alpha$  para impulsar la proliferación de cardiomiocitos fetales, proporciona un apoyo contextual adicional al papel que desempeña la exposición al oxígeno en los cardiomiocitos neonatales con respecto a su salida del ciclo celular<sup>146</sup>.

Del mismo modo, se ha examinado el rol que desempeñan las ROS en la transición postnatal de los cardiomiocitos utilizando un agente neutralizador de especies reactivas de oxígeno, la N-acetil-L-cisteína (NAC). El tratamiento *in vivo* con NAC, seguido del tratamiento *in vitro* de los cardiomiocitos aislados resultó en un incremento en la expresión de PCNA y una disminución en la binucleación de los mismos. Además, estos cardiomiocitos tratados con NAC tenían disminuida la expresión de la MAPK P38, mientras que la exposición de éstos a especies reactivas de oxígeno aumentaba la actividad de la MAPK P38<sup>147</sup>.

Pese a que diferentes estudios enseñan cómo la presencia de especies reactivas de oxígeno también pueden estimular la proliferación de cardiomiocitos, es importante tener presente que la naturaleza, el nivel y el contexto de estas ROS en las células son

factores cruciales que determinan el tipo de efecto, positivo o negativo, en la regulación del proceso proliferativo de los cardiomiocitos<sup>148,149,150</sup>.

### **3.4. Implicaciones de la limitada capacidad regenerativa: la regeneración cardíaca**

El fallo del miocardio adulto para reactivar el ciclo celular es el factor limitante en la función regenerativa de un corazón dañado. La respuesta en mamíferos a la lesión cardíaca es la cicatrización con tejido fibrótico, no contráctil, y la remodelación hipertrófica del miocardio superviviente<sup>151</sup>. De modo que, aunque se sobreviva a la lesión, existe un incremento en la susceptibilidad de padecer enfermedades compensatorias y de desarrollar insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca, que a menudo es la consecuencia de un episodio inicial de un infarto de miocardio, es una causa importante de morbilidad y mortalidad<sup>152</sup>.

Muchos tejidos en mamíferos responden a una lesión activando células madre, células progenitoras comprometidas o mediante la proliferación de células diferenciadas capaces de reentrar en el ciclo celular. Varios grupos de investigación han descrito la presencia de células madre o progenitoras en el corazón que pueden diferenciarse en miocitos cardíacos<sup>153,154,155,156</sup>; sin embargo, todavía hoy existe mucho debate y confusión en el campo con respecto a la identidad exacta de estas células y su posible potencial para diferenciarse en cardiomiocitos y llevar a cabo la función reparadora en el corazón dañado<sup>157,158</sup>.

En los últimos 5 años, los propios cardiomiocitos han resurgido como células diana para la intervención regenerativa. La estimulación de la proliferación de estos cardiomiocitos es, por tanto, un enfoque fuertemente atractivo para regenerar el corazón tras una lesión.

Existe una fuerte correlación positiva entre el porcentaje de cardiomiocitos mononucleados/diploides y la capacidad regenerativa del corazón; el 99% de los cardiomiocitos en corazones con alta capacidad regenerativa como el pez cebra<sup>159</sup>, roedores embrionales y neonatales<sup>65</sup> son mononucleados/diploides, mientras que sólo el 5% de los cardiomiocitos procedentes de corazones no regenerativos son mononucleados/diploides<sup>65,160,161</sup>. Esta correlación positiva ha conducido a la especulación y a la esperanza de que el corazón humano adulto, donde

aproximadamente el 70% de los cardiomiocitos son mononucleados, pueda mantener algún margen en su capacidad regenerativa<sup>73,74</sup>.

Pese a que en la edad adulta el ratón prácticamente no posee capacidad de regenerar el corazón, se ha visto que dicha capacidad sí existe durante el desarrollo embrionario y neonatal; sin embargo, ésta se pierde alrededor de los 7 días de edad, de modo que a partir del día postnatal P14 en adelante, la lesión cardiaca provoca una respuesta de remodelación patológica en el corazón similar a la de ratones adultos<sup>162,132</sup>.

En tejido cardiaco humano se ha cuantificado un pequeño pero continuo recambio de cardiomiocitos que decrece con la edad<sup>163</sup>. Los autores de este estudio han establecido mediante un modelo matemático una tasa de reemplazo del 1% por año a la edad de 25, con una disminución constante de aproximadamente 0,45% a partir de los 75 años. Los datos indican que los cardiomiocitos nuevos sirven para reemplazar en lugar de añadirse a los cardiomiocitos ya existentes, puesto que el número total de células permanece constante durante toda la vida. Estudios recientes en ratones apoyan estos hallazgos: los nuevos cardiomiocitos proceden de la división de cardiomiocitos existentes a una tasa baja pero detectable en ratones jóvenes y adultos<sup>164,165,166</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los investigadores estaría de acuerdo en que la tasa de recambio de los cardiomiocitos es extremadamente limitada, resultando insuficiente para una regeneración sustancial del miocardio dañado tras una lesión cardiaca importante.

Si los cardiomiocitos humanos adultos mononucleados son similares en su potencial a los cardiomiocitos de roedores neonatales P1-P3, identificar los factores que promueven la división de estos cardiomiocitos en lugar de la binucleación puede proporcionar un mejor enfoque que pueda aplicarse en el corazón humano adulto.

## 4. La hipertrofia cardíaca como respuesta fisio-patológica

### 4.1. La hipertrofia cardíaca: crecimiento del corazón adulto

La función del corazón depende del número de cardiomiocitos, así como de la cantidad de sarcómeros por célula. Como se ha explicado en el capítulo anterior, el número de cardiomiocitos en la etapa adulta prácticamente no se modifica de no mediar algún proceso patológico, y queda definido en el momento del nacimiento. Por el contrario, la cantidad de sarcómeros es variable y se modifica dinámicamente en función del estrés hemodinámico. Así, diversas situaciones fisiopatológicas incrementan el número de sarcómeros por cardiomiocito, proceso celular conocido como hipertrofia o aumento del tamaño celular sin proliferación. De modo que la hipertrofia cardíaca podría interpretarse *"a priori"* como una respuesta adaptativa del miocardio frente a la situación que la origina, y a nivel celular y bioquímico se caracteriza por un incremento del tamaño de los cardiomiocitos, aumento de la síntesis proteica total, mayor número de sarcómeros y expresión de genes activos en la etapa fetal que se han silenciado posteriormente en la etapa adulta como, por ejemplo, el péptido natriurético atrial (ANP), la alfa actina esquelética (SKA) y la cadena pesada de la beta miosina ( $\beta$ -MHC)<sup>167,168,169</sup>.

Existen dos tipos de hipertrofia cardíaca: fisiológica y patológica. La hipertrofia fisiológica ocurre como una adaptación a una situación en la que la persona necesita más aporte de sangre en su actividad diaria, por ejemplo, durante el embarazo o la práctica de una actividad física intensa. La respuesta a la sobrecarga hemodinámica se caracteriza por el aumento del tamaño de los cardiomiocitos, con incremento proporcional de los elementos estructurales del miocardio, sin aumento de la fibrosis intersticial y sin compromiso funcional. Este tipo de respuesta cumple realmente una función de adaptación, es reversible y no conduce a una disfunción cardíaca<sup>170,171</sup>. La hipertrofia patológica ocurre cuando se necesita una compensación frente a situaciones que comprometen el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular y el aporte de sangre como, por ejemplo, en casos de hipertensión arterial, estenosis o insuficiencias valvulares, miocardiopatía primaria y/o infarto agudo de miocardio. Esta hipertrofia se acompaña de un aumento de fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica con inducción de genes fetales, y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto; además presenta una reversibilidad sólo parcial y conlleva a una pérdida de la capacidad cardíaca<sup>172,173,174,175</sup>.

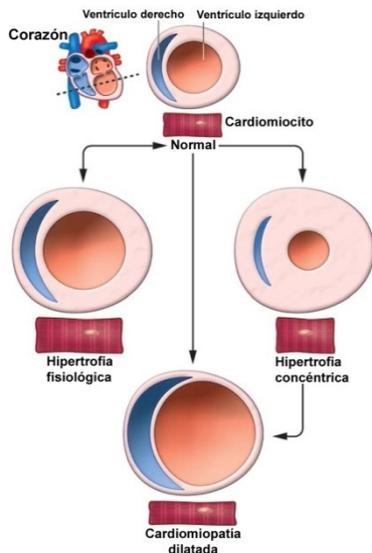


Figura 11: Tipos de hipertrofia cardíaca<sup>175</sup>.

En etapas tempranas de la hipertrofia patológica, el corazón tiene un crecimiento concéntrico, es decir, el engrosamiento de las paredes no está acompañado de un aumento de volumen, por tanto, aumenta el grosor de la pared ventricular pero no la dilatación de la cavidad, de modo que los cardiomiocitos crecen a lo ancho, añadiendo sarcómeros en paralelo; sin embargo, la cronificación de esta situación conduce al desarrollo de una hipertrofia excéntrica con dilatación cardíaca, en la que hay un incremento menor del espesor de la pared

ventricular y un gran aumento en el volumen de la cavidad, es decir, la cámara aumenta su volumen a costa de un crecimiento preferentemente en la longitud del cardiomiocito (figura 11)<sup>175</sup>. La dilatación cardíaca puede producirse directamente sin la existencia previa de una hipertrofia concéntrica, como ocurre a raíz de una cardiopatía isquémica (infarto de miocardio) o debido a determinadas mutaciones genéticas (dilatación cardíaca idiopática)<sup>175</sup>.

Las dos tipos de hipertrofia se diferencian no sólo en sus causas, sino en sus características fenotípicas y en las rutas de señalización intracelular que están implicadas en su desarrollo, tal como se recoge en la siguiente tabla:

Parámetro de estudio	Hipertrofia fisiológica	Hipertrofia patológica	
		Concéntrica	Dilatada
Aumento de masa miocárdica	Aumento del grosor de la pared y del volumen del ventrículo coordinados	Aumento del grosor sin aumento del volumen	Aumento del volumen con adelgazamiento de pared (dilatación cardíaca)
Tamaño del cardiomiocito	Crecimiento a la vez en longitud y grosor, adición de sarcómeros en serie	Crecimiento en grosor, adición de sarcómeros en paralelo	Crecimiento en longitud, adición de sarcómeros en serie
Expresión de genes fetales y de estrés	No	Sí	Sí
Fibrosis	No	Sí	Sí
Función cardíaca	Normal	Normal	Deprimida
Reversibilidad	Sí	Sólo en las primeras fases, no ante estímulos crónicos	No
Tipo de metabolismo	Oxidativo	Glucolítico	Glucolítico
Cambios de expresión de genes que manejan el Ca <sup>2+</sup> intracelular	No	Sí	Sí
Medidores moleculares	Receptores tirosina quinasa, PI3K, AKT.	Proteínas G, receptores $\alpha/\beta$ -andrenérgicos, MAPK, CN/NFAT, PKA, CaMKII.	Proteínas G, receptores $\alpha/\beta$ -andrenérgicos, estrés oxidativo y apoptosis CaMKII, eje PLN-Serca2

Tabla 1: Principales diferencias entre la hipertrofia fisiológica y la hipertrofia cardíaca.

## 4.2. Vías de inducción de la hipertrofia cardiaca

La hipertrofia cardiaca surge como resultado de un número de estímulos diferentes tales como el estiramiento del miocardio, la activación neurohumoral y/o la liberación de factores de crecimiento y citoquinas. Cada uno de estos estímulos generalmente desencadena su efecto a través de la activación de receptores de membrana asociados a un grupo particular de proteínas, que activan a su vez vías de señalización intracelular, regulando una cascada de moléculas ejecutoras responsables del desarrollo de la respuesta hipertrófica.

A continuación se describen de forma resumida las cascadas de señalización intracelular mejor conocidas que están involucradas en esta respuesta hipertrófica.

### 4.2.1. Mecanismos de inducción de la hipertrofia fisiológica

**Activación de receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa (RTyrK):** esta vía es la activada por factores de crecimiento relacionados con el crecimiento hipertrófico fisiológico, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1), la hormona de crecimiento (GH) y la hormona tiroidea<sup>170,176,177</sup>.

Cuando estos receptores tirosina quinasa son activados se inducen al menos dos vías de señalización intracelulares distintas: la vía de la fosfoinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) y la vía de Ras/proteína quinasas activadas por mitógenos (Ras/MAPKs). Con respecto a la primera vía, su principal efector es la isoforma 1 alfa de la PI3K (p110 $\alpha$ ) que a través de AKT promueve la síntesis proteica mediante fosforilación del activador de la traducción, la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) y la transcripción génica a través de la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 $\beta$ )<sup>178</sup>. La GSK3 $\beta$  en su estado activo fosforila e inhibe a varias moléculas vinculadas con el desarrollo de la hipertrofia cardiaca como, por ejemplo, miembros de la familia del factor de transcripción nuclear de las células T activadas (NFAT) (figura 12).

La sobreexpresión de PI3K o AKT en corazones de ratones transgénicos induce un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos, una hipertrofia concéntrica con ausencia de fibrosis y una función cardiaca correcta<sup>179,180</sup>, por tanto, tienen un rol

específico en la hipertrofia fisiológica. Así mismo, cuando GSK3 $\beta$  se inactiva por fosforilación es suficiente para inducir la hipertrofia de los cardiomiocitos *in vitro*<sup>181,182</sup>.

Es importante destacar que la vía PI3K/AKT promueve la supervivencia celular y se considera que evita la activación de los mecanismos que desencadenan la insuficiencia cardíaca<sup>178</sup>, puesto que un aspecto importante de esta vía pro-hipertrófica es que es responsable de la coordinación entre el crecimiento de los miocitos cardíacos y la respuesta angiogénica. Esto se logra con la secreción por parte de los miocitos de factores angiogénicos en respuesta al estímulo hipertrófico. La pérdida del balance entre el crecimiento celular y la angiogénesis conduce a un fallo contráctil y al desarrollo de la insuficiencia cardíaca<sup>183</sup>; de este modo, en un modelo de hipertrofia cardíaca inducida por la sobreexpresión de AKT en ratones se demostró que el estímulo hipertrófico inducía la expresión de factores de crecimiento vasculares como, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la fase adaptativa de la hipertrofia cardíaca, y que el bloqueo de la señalización inducida por el VEGF provocaba una disminución de la densidad vascular y una evolución precoz hacia la insuficiencia cardíaca<sup>184</sup>.

Finalmente en la vía de las Ras/MAPKs, destacan las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2, cuya sobreexpresión en ratones transgénicos produce una hipertrofia compensada, concéntrica y con una buena función contráctil<sup>185</sup>. Por otro lado, la inhibición de ERK1/2 provoca una dilatación cardíaca patológica en respuesta al estrés<sup>186</sup>; resultados parecidos se observan en ratones con una disrupción de ERK1/2 en el corazón, que presentan problemas cardíacos en respuesta al estrés o incluso a la edad<sup>187</sup>. Todo esto demuestra que la señalización por ERK1/2 es un componente esencial de la respuesta hipertrófica fisiológica protectora y, de hecho, protege a los cardiomiocitos de la muerte tras un daño isquémico<sup>188</sup>.

**Activación de sensores de estiramiento-integrinas asociadas a proteína quinasas:** las integrinas conforman una clase de receptores que conectan el aparato contráctil de los miocitos a las proteínas de la matriz extracelular y juegan un papel fundamental en la conversión de la fuerza mecánica (sobrecarga hemodinámica) en el estiramiento del miocardio o respuesta hipertrófica<sup>189</sup>. Aunque la vía de señalización activada por las integrinas aún no se conoce detalladamente, involucraría a las vías hipertróficas PI3K/AKT y Ras/ERK1/2<sup>190,191</sup>.

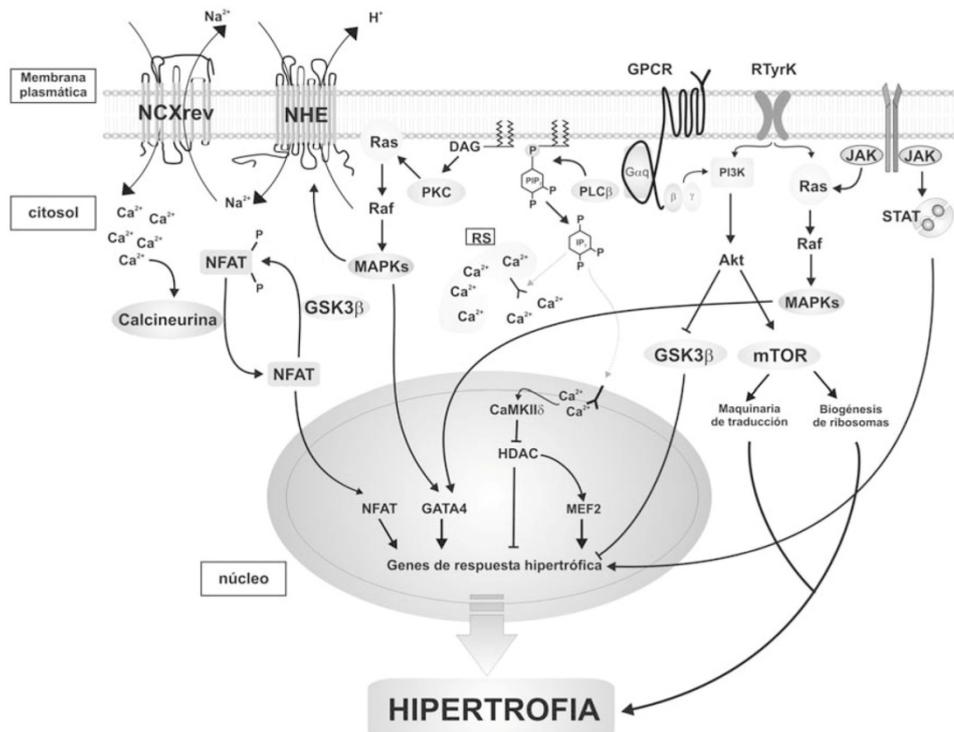


Figura 12: Principales vías de señalización implicadas en la hipertrofia cardíaca.

#### 4.2.2. Mecanismos de inducción de la hipertrofia patológica

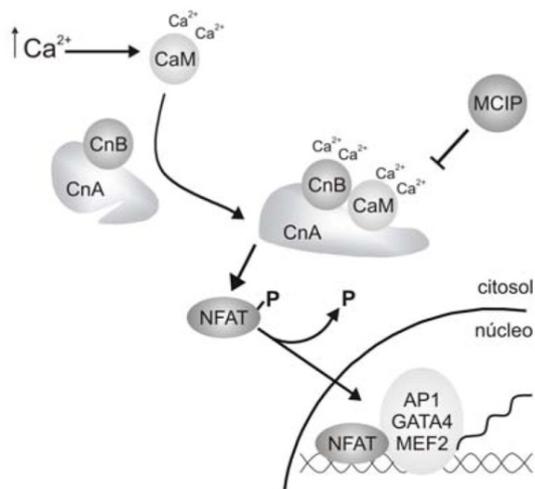
**Activación de receptores acoplados a proteína G (GPCR):** En la hipertrofia cardíaca patológica el estrés biomecánico, es decir, el estiramiento impuesto al miocardio por la sobrecarga hemodinámica, se traduce en la liberación autocrina/paracrina de factores neurohumorales como la angiotensina II (Ang II), la endotelina 1 (ET-1), la adrenalina y noradrenalina, que al igual que los agonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha$ -ER), se unen a sus respectivos receptores acoplados a proteínas G, entre ellas la proteína Gq, desencadenando la respuesta hipertrófica patológica del miocardio<sup>192</sup>.

Estas proteínas G heterotriméricas unen GTP y están formadas por las subunidades:  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . El estímulo hipertrófico induce la disociación de la subunidad  $\alpha$  permitiendo que ésta reclute a la isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C (PLC $\beta$ ) a la membrana, que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), dando inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El DAG formado facilita la activación de la proteína quinasa C (PKC), que a su vez activa a las MAPKs a través de la quinasa Raf. La MAPK ERK1/2 fosforila a la proteína quinasa S6 ribosomal p90 (p90RSK) y esta última activa por fosforilación al intercambiador de  $Na^+ / H^+ -1$  (NHE-1)<sup>193</sup>. La acumulación de  $Na^+$  en el citosol promueve la entrada de  $Ca^{2+}$  a través del intercambiador  $Na^+ / Ca^{2+}$  (NHE-1/NCX) (figura 12). No sólo se ha encontrado incrementada la actividad del intercambiador NHE-1 en el miocardio hipertrófico de una gran variedad de patologías

cardiovasculares, sino que además su hiperactividad es suficiente para desencadenar el desarrollo de una hipertrofia cardiaca patológica. Así mismo, la inhibición específica de este intercambiador induce la regresión de la hipertrofia patológica en numerosos modelos experimentales aunque la causa de la misma no sea resuelta; por ejemplo, induce la regresión de la hipertrofia cardiaca en ratas espontáneamente hipertensas sin causar un descenso significativo de la presión arterial<sup>194</sup>.

El IP<sub>3</sub>, por otro lado, puede inducir la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo sarcoplásmico (RS) o desde la envoltura nuclear<sup>195</sup>. El aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sería el responsable de la activación de fosfatasas y/o quinasas que determinarían el aumento de la transcripción y de la síntesis proteica y, por ende, el desarrollo de la hipertrofia cardiaca<sup>196</sup>.

De las cascadas intracelulares pro-hipertróficas dependientes de Ca<sup>2+</sup>, la de la calcineurina/NFAT parece jugar un papel determinante en el desarrollo de la hipertrofia



**Figura 13: Activación de la calcineurina mediante la unión de Ca<sup>2+</sup> y CaM.**

cardiaca patológica<sup>197</sup>. Ante aumentos sostenidos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> la calcineurina, una serina-treonina fosfatasa (PP2B), es activada por el complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina(CaM) y desfosforila a miembros de la familia de factores de transcripción NFAT en el citosol, permitiendo que éstos se trasloquen al núcleo e interactúen cooperativamente con otros factores de transcripción como AP-1, GATA4 y MEF2, estimulando la transcripción génica de genes pro-hipertróficos (figura 13)<sup>198,199,200,201</sup>.

La mayoría de los estímulos que inducen la hipertrofia cardiaca maladaptativa en respuesta a una sobrecarga hemodinámica activan la vía de receptores acoplados a proteínas G, Gq, y confluyen en el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activando las vías de señalización intracelulares dependientes de este ión. El aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es uno de los fenómenos más importantes en el desarrollo de la respuesta hipertrófica, y esto se ha confirmado provocando el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por medio de agonistas cálcicos<sup>202</sup>, de ionóforos de Ca<sup>2+</sup><sup>203</sup>, o mediante la elevación del Ca<sup>2+</sup> extracelular<sup>204</sup>, induciéndose en todos ellos la hipertrofia en los cardiomiocitos *in vitro*.

**Activación de receptores de citoquinas:** vía de la glicoproteína gp130. La gp130 es una proteína de membrana que actúa como coreceptor en respuesta a citoquinas inflamatorias, como la interleuquina 6 (IL-6), la cardiotrofina-1 (CT-1) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), capaces de promover el desarrollo de la hipertrofia cardíaca<sup>205</sup>. La IL-6 no se encuentra elevada en la hipertrofia cardíaca fisiológica pero sí en la patológica<sup>206</sup>, y se ha descrito para todos los miembros de la familia de la IL-6 que tanto su producción como su efecto sobre la hipertrofia cardíaca es inducido por la Ang II<sup>207,208</sup>. La unión de estas citoquinas a su receptor específico  $\alpha$  induce la dimerización de gp130, uniéndose dos quinasas Janus (JAKs), que activadas por fosforilación recíproca, fosforilan al receptor y permiten la activación de vía Ras/Raf/MAPKs. Las JAKs activadas también fosforilan y activan a miembros de la familia STAT (transductor de señales y activador de la transcripción), que se traslocan al núcleo y activan la transcripción de genes directamente vinculados con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Existen evidencias que apoyan un papel citoprotector para la vía gp130/JAKs/STAT, además de su función en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca<sup>209,210,211</sup>.

Ninguna vía de señalización intracelular regula la hipertrofia de los cardiomiocitos de manera aislada, sino que al contrario, existe un gran entrecruzamiento entre ellas para garantizar que la señal logre su efecto al activar más de una vía. Este sistema de transducción se asemeja más a una red que a un sistema de vías independientes.

### 4.3. La señalización redox en la hipertrofia cardíaca

Se entiende por señalización redox aquel proceso regulatorio en el cual la señal es realizada a través de una reacción química de óxido-reducción, produciéndose especies reactivas del oxígeno (ROS) como intermediarios. Como será explicado en detalle en el capítulo 6, las ROS como el anión superóxido  $O_2^-$ , el anión hidroxilo  $OH^-$  o el óxido nítrico  $NO^-$ , influyen en muchos procesos fisiológicos, y su producción elevada, que lleva a un desequilibrio redox descrito en muchas patologías, se conoce como estrés oxidativo<sup>212,213</sup>.

En los últimos años, cada vez es más evidente que la señalización redox desempeña un papel importante en muchos aspectos de la hipertrofia cardíaca. Varios de los factores que participan en la cascada de señalización hipertrófica son activados directa o indirectamente por las ROS a través de diferentes mecanismos. Éstos incluyen

a la PKC, las MAPKs P38, JNK y ERK1/2, la PI3K y AKT, ASK-1 y tirosina quinasas como el coactivador del receptor de esteroides (Src) y la quinasa de adhesión focal (FAK), la calcineurina y factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF-κB) y AP-1<sup>214,215,216,217,218,219,220,221,222,223</sup>.

Las principales fuentes de ROS en el miocardio son las NADPH oxidasas, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintetasa y la cadena respiratoria mitocondrial<sup>224</sup>. La mitocondria es el principal productor de ROS, aunque su importancia en cardiomiocitos como fuente generadora comparada con las NADPH oxidasas sigue siendo un tema de discusión. Dado que la mitocondria es importante en diferentes procesos celulares claves para este trabajo y será estudiada detenidamente en el siguiente capítulo, a continuación se explicará el rol de las NADPH oxidasas como productoras de ROS en la hipertrofia cardiaca.

La familia de NADPH oxidasas (Nox) comprende 7 miembros: Nox1-5, y Duox 1 y 2 (oxidasa dual 1 y 2, las cuales tienen un dominio peroxidasa adicional). En los cardiomiocitos se expresan constitutivamente Nox2 y Nox4<sup>225,226</sup>; Nox2 se localiza principalmente en la membrana plasmática, mientras que Nox4 se encuentra en las membranas intracelulares, en las mitocondrias, el retículo endoplasmático y en el núcleo. Ambas están compuestas por las subunidades de membrana gp91phox y p22phox, los componentes citosólicos p47phox, p67phox, p40phox y la pequeña proteína GTPasa, Rac.

La NADPH oxidasa es sensible a: **1)** Agonistas de receptores acoplados a proteínas G como la Ang-II, ET-1 y agonistas de receptores α-adrenérgicos; **2)** factores de crecimiento como el VEGF y TGFβ; **3)** citoquinas inflamatorias como la IL-6; **4)** fuerzas mecánicas como el estiramiento o fuerzas de rozamiento; **5)** la isquemia-reperfusión; y **6)** factores metabólicos como la hiperglucemia, hiperinsulinemia, ácidos grasos libres, etcétera.<sup>227,228</sup>

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la producción de ROS por las NADPH oxidasas es un paso importante en la cascada de señalización hipertrófica. La hipertrofia cardiaca inducida con un tratamiento de Ang II se inhibe en ratones deficientes en Nox2<sup>229,230</sup>. La delección genética de Rac1, un componente citosólico esencial del complejo Nox2, suprime el incremento en la producción del anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducido por el tratamiento con Ang II, así como la activación de mecanismos de señalización pro-hipertróficos<sup>231</sup>. Estos estudios sugieren que Nox2

participa en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca en respuesta a la Ang II a través de la generación de ROS.

En ratones deficientes en Nox2 el aumento en la fibrosis y la disfunción contráctil en respuesta a la presión hemodinámica están atenuados, pero la hipertrofia cardiaca no está disminuida en este modelo animal<sup>232</sup>, indicando que Nox2 no participa en el desarrollo de la hipertrofia inducida por la presión hemodinámica.

Sin embargo, en ratones nulos para Nox4 los aumentos en el estrés oxidativo en respuesta a la presión hemodinámica se reducen significativamente<sup>233</sup>, presentando una menor hipertrofia y una mejor función sistólica ventricular. Estos resultados sugieren que las ROS producidas por Nox4 contribuyen a la formación de la hipertrofia y a la disfunción cardiaca en respuesta a la presión hemodinámica. Los ratones transgénicos que sobreexpresan Nox4 específicamente en el corazón presentan una disfunción cardiaca sin hipertrofia notable a nivel de órgano, lo que plantea la posibilidad de que la contribución de Nox4 a la hipertrofia cardiaca pueda ser secundaria a la disfunción cardiaca, de hecho, en cardiomiocitos *in vitro*, la sobreexpresión de Nox4 induce su muerte celular pero no la hipertrofia<sup>234,235</sup>.

Las ROS generadas por estas NADPH oxidasas pueden estimular las vías de señalización hipertróficas, tanto fisiológicas como patológicas, de diferentes formas:

- 1) activando directamente receptores (GPCR) o canales iónicos (NHE-1)<sup>236,237,238</sup>,
- 2) activando la función de factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B<sup>220,221,222</sup>;
- 3) alterando la actividad de proteínas sensibles a redox que son clave en la señalización hipertrófica.

Inicialmente se identificaron a las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), encargadas de eliminar los grupos fosfato de los residuos de tirosina (Tyr) fosforilados, como las únicas dianas de las ROS. Las PTPs tienen un residuo conservado de cisteína en su centro catalítico, y pierden su propiedad nucleofílica después de la oxidación de este residuo de cisteína, lo que resulta en una pérdida de su actividad que puede ser restaurada reduciendo el residuo oxidado de nuevo a su forma tiol. La pérdida de esta actividad da lugar al aumento en la fosforilación de tirosinas y, por tanto, a la activación de las proteínas quinasas diana de estas PTPs que son pro-hipertróficas; sin embargo, en los últimos años la atención se ha desplazado hacia el efecto directo de las ROS sobre estas proteínas quinasas, ya que muchos de los efectos hipertróficos mediados a través de la generación de ROS, implican la activación de la vía de MAP quinasas

Ras/Raf/ERK1/2<sup>219,223</sup>, así como de la vía PI3K-AKT<sup>214,217,218</sup>. Por ejemplo, la modificación redox de la Cys118 en la proteína quinasa RAS activa la vía hipertrófica Ras/Raf/ERK1/2 en respuesta a las ROS generadas como consecuencia de la tensión mecánica en el miocardio<sup>239</sup>.

A continuación, un ejemplo de cómo las ROS participan en el desarrollo hipertrófico patológico del miocardio (figura 14): un estímulo hipertrófico, a través de la formación del DAG, puede activar la PKC que fosforila a p47<sup>phox</sup> del complejo Nox2, estimulando la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>240</sup>. Por otro lado, el estrés mecánico también puede activar a Nox2 a través de Rac1<sup>241</sup>, generando así más O<sub>2</sub><sup>-</sup> que puede llegar a producir daño mitocondrial, lo que provocaría la liberación de más ROS por parte de la mitocondria, convergiendo en un bucle de retroalimentación positiva llamado RIRR (del inglés *ROS-induced ROS release*)<sup>242</sup>. Las proteínas quinasas D (PKD) y C (PKC) pueden ser activadas por fosforilación en residuos de tirosina en respuesta a las ROS, posiblemente debido a la inactivación de las PTPs y la activación de quinasas de la familia Src<sup>243</sup>. Además de su efecto sobre las PTPs, las ROS también pueden activar directamente a la quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina II (CaMKII) a través de la oxidación de una metionina, independientemente del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina<sup>244</sup>. Esta CaMKII junto a la PKD pueden fosforilar numerosos sustratos como factores de transcripción e histonas deacetilasas, regulando la expresión de un gran número de genes pro-hipertróficos, como se describe en el siguiente apartado.

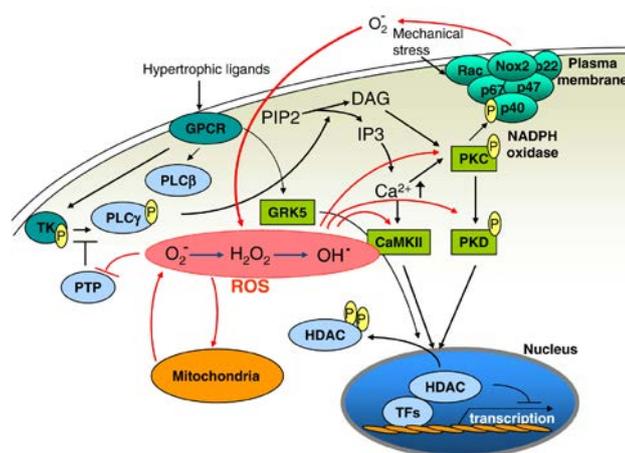


Figura 14: Principales dianas de las especies reactivas del oxígeno (ROS) implicadas en la hipertrofia patológica del miocardio<sup>569</sup>.

#### 4.4. Regulación epigenética de la hipertrofia cardiaca

Las vías de señalización hipertróficas pueden controlar la expresión de genes modulando las actividades de las enzimas remodeladoras de la cromatina, histonas acetil-transferasas (HAT) e histonas deacetilasas (HDAC), que regulan la transcripción de genes asociados con el crecimiento celular y la diferenciación, así como con el desarrollo del órgano<sup>245</sup>.

Los cambios en la acetilación y deacetilación de histonas representan un mecanismo de control de la expresión génica, siendo la acetilación por histonas acetil-transferasas (HAT) la que hace que se pierda la interacción histona-ADN, relaja la cromatina y activa la transcripción de genes específicos; mientras que la deacetilación por histonas deacetilasas (HDAC) aumenta la interacción de histona-ADN, condensa la cromatina y reprime la transcripción génica. Por lo tanto, el balance entre HAT y HDAC parece desempeñar un papel especialmente importante en el control de la expresión génica, afectando al proceso hipertrófico del cardiomiocito.

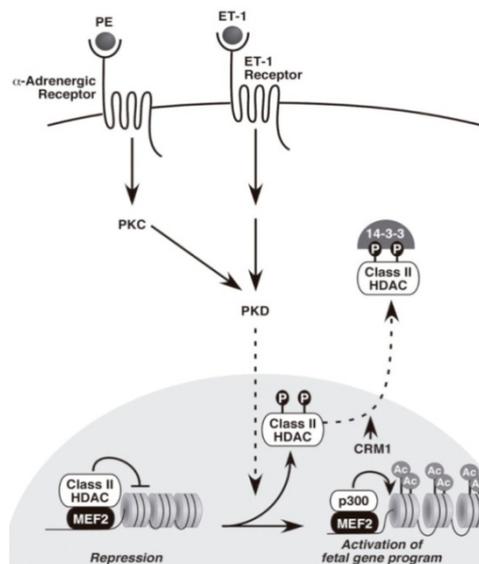
En mamíferos se han descrito al menos 9 genes de HDAC que se agrupan en dos categorías en función de la similitud de secuencia y dominios funcionales: las de clase I y II, con papeles totalmente opuestos en el proceso hipertrófico<sup>246</sup>.

Los miembros de la clase I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8) se expresan en todos los tejidos y tienen como función inhibir genes antihipertróficos, favoreciendo el crecimiento del cardiomiocito; sin embargo, los miembros de la clase II (HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9) son más abundantes en corazón, cerebro y tejido muscular esquelético, y cuando se localizan en el núcleo parecen reprimir la actividad de factores de transcripción pro-hipertróficos, tales como, miembros de la familia del factor MEF2<sup>247,248</sup>, y reclutan reguladores epigenéticos, tales como, HDAC de clase I e histona metiltransferasas a regiones promotoras del ADN<sup>249,250,251,252</sup>.

Las HDAC de clase I están formadas por un simple dominio catalítico, mientras que las HDAC de clase II contienen una estructura distinta con un dominio regulador N-terminal seguido de un dominio catalítico C-terminal. Este dominio regulador posee un motivo de unión a MEF2, una señal de localización nuclear (NLS) y varios residuos conservados de serina que actúan como sitios de unión para las chaperonas 14-3-3 cuando éstos han sido fosforilados por diferentes quinasas. La señal NLS es enmascarada con la unión a proteínas 14-3-3, de modo que las HDAC son exportadas fuera del núcleo a través del receptor de exportación nuclear CRM1, quedando

retenidas en el citoplasma<sup>253,254,255</sup>. Este desplazamiento núcleo-citoplasma parece ser el mecanismo principal que regula la función de las HDAC de clase II, ya que la exclusión del núcleo evita la interacción represiva de los HDAC con factores de transcripción, lo que resulta en un aumento en la transcripción de genes que participan en la respuesta hipertrófica<sup>255,256</sup>. En el caso particular de MEF2, la exportación nuclear de HDAC de clase II permite la interacción con HAT como la proteína de unión a E1 p300 (p300), que promueve la transcripción de genes pro-hipertróficos a través de sus efectos sobre la acetilación de histonas<sup>257,258</sup>.

Se han estudiado una gran variedad de proteínas quinasas que fosforilan las HDAC de clase II, entre ellas PKD y CaMKII (figura 15). La PKD se activa después del tratamiento con ET-1 y otros agonistas del receptor alfa adrenérgico ( $\alpha$ -AR), y tiene como diana principal HDAC5, así como HDAC4, HDAC7 y HDAC9. La fosforilación de HDAC5 en los residuos de Ser259 y Ser498 induce su exportación nuclear<sup>247,259,260</sup>; sin embargo, la fosforilación de HDAC5 en la Ser279 por la proteína quinasa A (PKA) promueve su retención nuclear<sup>261,262,263</sup>, posiblemente al inducir un cambio conformacional que impide la unión de proteínas 14-3-3 en los residuos de Ser259 y Ser498 fosforiladas<sup>261</sup>.



**Figura 15: Regulación de la expresión génica cardíaca por las HDAC clase II en respuesta a un estímulo hipertrófico.**

La CaMKII se activa a través de la Ang II, ET-1 y otros agonistas de receptores adrenérgicos, mediante la señalización del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) y el aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular<sup>264</sup>. Esta quinasa se une específicamente a HDAC4, ya que solo esta HDAC de clase II tiene un sitio para la CaMKII y es fosforilada en los residuos de Ser467 y Ser632<sup>260</sup>. HDAC4 puede dimerizar con otras HDAC de clase II en presencia de la CaMKII activa, produciéndose una respuesta indirecta de exportación nuclear de HDAC5 y HDAC9<sup>265</sup>.

En la última década la oxidación de las HDAC de clase II ha surgido como una nueva modificación postraduccional independiente de la fosforilación que regula la localización subcelular de HDAC4 en cardiomiocitos<sup>266,233</sup>, conectando así dos

mecanismos implicados en la hipertrofia cardiaca, el estado redox celular y la deacetilación de histonas.

HDAC4 posee dos cisteínas (Cys667 y Cys669) no conservadas entre las HDAC de clase II, que se oxidan con un tratamiento de fenilefrina (PE), un agonista del receptor alfa adrenérgico ( $\alpha$ -AR). Aunque se desconoce el mecanismo preciso de la exportación nuclear inducida por la oxidación, se ha propuesto que la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre estos dos residuos de cisteína interrumpe la coordinación del zinc y provoca un cambio conformacional que expone la señal de exportación nuclear a CRM-1, lo que provoca la salida de HDAC4 del núcleo. Este desplazamiento puede prevenirse mediante la inhibición de CRM-1 o mediante un tratamiento con la tiorredoxina 1 (Trx1) que reduce las proteínas oxidadas. En la respuesta hipertrófica, tanto la oxidación como la fosforilación de HDAC4 tienen lugar; sin embargo, la modificación oxidativa se observa antes que su fosforilación. Por lo tanto, se ha sugerido que la exportación nuclear de HDAC4 puede ser desencadenada por la señalización redox, mientras que la fosforilación puede ser responsable de su retención en el citosol en momentos posteriores<sup>266</sup>.

HDAC5 también es sensible a ROS y parece estar regulado de manera similar. Aunque la PKD es el principal modulador de la actividad de esta HDAC, un estudio ha demostrado que esta vía es menos relevante en una estimulación con agonistas del receptor beta adrenérgico ( $\beta$ -AR), como isoprenalina (ISO), donde la exportación nuclear de HDAC5 ocurre a través de un mecanismo independiente de fosforilación mediado por un proceso oxidativo que reduce esta HDAC de clase II, resultando en un incremento significativo de la actividad de MEF2. Esta exportación es bloqueada al sobreexpresar la tiorredoxina 1 (Trx1) o en presencia del agente neutralizador de radicales libres N-acetil-cisteína (NAC), lo que sugiere que el proceso de exportación nuclear de HDAC5 se debe principalmente a un mecanismo de oxidación en respuesta a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)<sup>267</sup>.

Por lo tanto, es posible que el estrés oxidativo pueda regular la fosforilación de las HDACs a través de la modulación de proteínas quinasas; sin embargo, cada vez más estudios sugieren que las HDACs de tipo II también están sujetas a una modificación oxidativa postraducciona directa a través de las ROS, regulando así el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.

## 5. La mitocondria

### 5.1. Estructura de la mitocondria

Las mitocondrias son pequeños orgánulos localizados en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas, exceptuando eritrocitos y algunos protozoos parásitos. Pueden presentar distintas formas (filamentos, bastoncillos o esferas) y tamaños, siendo su morfología y distribución función de la demanda energética de cada tejido y tipo celular al desempeñar un papel central en el metabolismo celular<sup>268</sup>. Su función primaria es la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), pero además, se encargan de otras funciones celulares que son cruciales para importantes procesos metabólicos, reguladores y del desarrollo<sup>269</sup>. En los últimos años cada vez más estudios demuestran que las mitocondrias participan activamente en la señalización celular, actuando como iniciadoras y transductoras de señales. Así, por una parte sirven como plataformas físicas sobre las que ocurren las interacciones señalizadoras proteína-proteína, y por otra regulan los niveles de señales intracelulares, incluyendo el  $\text{Ca}^{2+}$  y las especies reactivas del oxígeno (ROS)<sup>270</sup>.

En la ultraestructura de la mitocondria se puede distinguir una doble membrana que determina dos compartimentos: la matriz, situada en el interior y delimitada por la membrana mitocondrial interna, y el espacio intermembrana localizado entre la membrana mitocondrial interna y la externa. En la membrana mitocondrial interna se localizan los cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico y la ATP sintasa, siendo el lugar donde sucede la OXPHOS. Además, posee una proporción importante de cardiolípidos (15%)<sup>271</sup> que le confieren una elevada impermeabilidad, incluso frente a los protones, de manera que todos los intercambios de metabolitos entre la matriz y el exterior se realizan mediante transportadores específicos<sup>272</sup>; en cambio, la membrana mitocondrial externa contiene en gran abundancia una proteína conocida como porina. Las porinas forman grandes canales que permiten el paso de moléculas e iones con una masa molecular inferior a 5 kDa. Además, esta membrana cuenta con un transportador, la translocasa de la membrana externa (complejo TOM), que es la principal vía de entrada a la mitocondria para moléculas de mayor tamaño<sup>273</sup>. La matriz mitocondrial contiene el genoma mitocondrial, las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y las enzimas de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, puesto que en el interior de ella tienen lugar procesos metabólicos esenciales como el ciclo de Krebs, la oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de la urea o algunas etapas de la síntesis de aminoácidos y del grupo hemo.

## 5.2. Estructura y herencia del ADN mitocondrial (ADNmit)

El genoma mitocondrial es una pequeña molécula circular de ADN de doble cadena, cuyo tamaño oscila entre las 16 y las 20 Kb. En vertebrados codifica exclusivamente para 37 genes: 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 subunidades estructurales que forman parte de los complejos respiratorios, entre las que se incluyen 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de las 45 que forman el complejo I, 1 subunidad (citocromo b, Cytb) de las 11 presentes en el complejo III, 3 subunidades (COX1, COX2, COX3) de las 13 que constituyen el complejo IV, y 2 subunidades (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (figura 16)<sup>274</sup>.

Para traducir las 13 proteínas codificadas por el ADNmit, las mitocondrias tienen su propia maquinaria. Todos los ARNs necesarios para la traducción mitocondrial son suministrados por la mitocondria, mientras que los componentes proteicos, entre los que se incluyen proteínas ribosomales, factores traduccionales, aminoacil-ARNt-sintetasas y algunos factores más requeridos para la biogénesis de los ARNr y ARNt, tales como, nucleasas y enzimas modificadoras de ARNs, son codificados por el genoma nuclear y transportados a la mitocondria tras su síntesis en el citoplasma celular.

Las dos hebras de ADNmit tienen una composición de nucleótidos diferente, y en base a esto a una de ellas se le denomina cadena pesada (H) por ser rica en residuos de guanina y timina, mientras que la otra recibe el nombre de cadena ligera (L) al ser pobre en estos nucleótidos<sup>275</sup>.

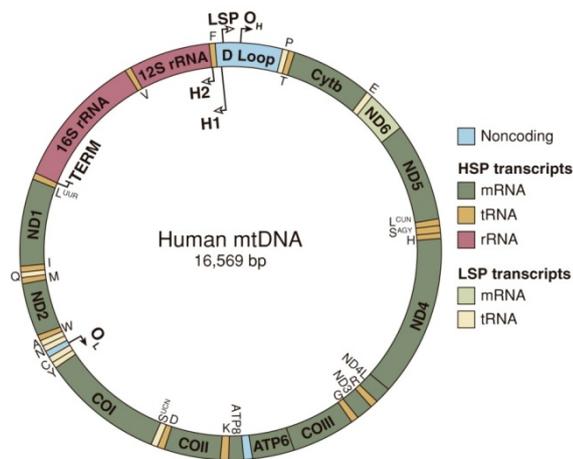
El genoma mitocondrial es extraordinariamente compacto, los genes no presentan intrones, ni regiones 5' o 3' no traducidas (UTR), no hay apenas espacios intergénicos llegando a solaparse algunos de los genes y, en muchos casos, las adeninas del codón de terminación de la traducción, UAA, no están codificadas por el ADNmit sino que son añadidas por la maquinaria de poliadenilación. La mayor región no codificante, denominada bucle-D (del inglés *D-loop*) en mamíferos, contiene los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción de las cadenas pesada y ligera, así como el origen de replicación de la cadena pesada (O<sub>H</sub>). La segunda región no codificante del ADNmit es una secuencia de apenas 30 nucleótidos que contiene el origen de replicación de la cadena ligera (O<sub>L</sub>) (figura 16)<sup>276</sup>.

El hecho de que el ADNmit se encuentre compartimentalizado fuera del núcleo hace que su herencia sea diferente a la de los genes nucleares. El genoma mitocondrial

es poliploide, lo que significa que si cada célula en función de su requerimiento energético contiene cientos de mitocondrias y cada mitocondria puede contener un número variable de copias de ADNmit que oscila entre 2 y 10, entonces en cada célula puede haber entre 1.000 y 10.000 copias de ADNmit. En circunstancias normales, todas las copias del ADNmit poseen la misma secuencia (homoplasmia), pero algunos individuos pueden tener dos o más genotipos mitocondriales diferentes (heteroplasmia)<sup>277</sup>. Como existen muchas copias de ADNmit en una misma célula, una variante con una secuencia deletérea puede ser tolerada, a menos que la abundancia del ADNmit defectivo exceda un umbral en el que la disfunción mitocondrial y celular se manifiesten.

Estas moléculas de ADNmit se segregan al azar durante la mitosis, dando como resultado células hijas con distinto contenido de ADNmit, fenómeno que se conoce como segregación mitótica. Además, en mamíferos el ADNmit se hereda exclusivamente por vía materna, mientras que el ADNmit paterno se pierde durante las primeras rondas de replicación del embrión<sup>278</sup>.

**Figura 16: Genoma mitocondrial humano.** Los genes que codifican proteínas (verde oscuro) y los que codifican ARNr (rojo) están intercalados con los 22 genes de los ARNt (amarillo). La región reguladora del bucle-D contiene los promotores de las cadenas ligera y pesada (LSP, H1 y H2). Las flechas indican la dirección de la transcripción. O<sub>H</sub> y O<sub>L</sub> indican los orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Term es el terminador para el transcrito H1<sup>274</sup>.



### 5.3. Replicación, transcripción y traducción del ADNmit

Inicialmente se pensaba que la replicación del ADNmit sucedía de manera continua a lo largo del ciclo celular y de forma independiente a la replicación del ADN nuclear (ADNn)<sup>279</sup>. En procesos como la embriogénesis o la diferenciación celular el ADNmit replica más de una vez en cada ciclo celular, mientras que en ocasiones sólo replica una pequeña subpoblación, como ocurre en la oogénesis<sup>280</sup>; sin embargo, cada vez más estudios sugieren que el ADNn y el ADNmit podrían replicarse de manera coordinada<sup>281,282</sup>, y aunque la replicación del genoma mitocondrial se encuentre activa a lo largo de todo el ciclo celular parece que la replicación y la transcripción del ADNmit

preceden a la síntesis del ADN nuclear<sup>283</sup>. En *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que un factor denominado DREF (del inglés *DNA replication-related element binding factor*) implicado en la coordinación de genes involucrados en la replicación del ADNn y en el control del ciclo celular, también regula la proteína mitocondrial de unión al ADNmit de hebra única (SSB) y la expresión de la subunidad accesoria  $\beta$  de la gamma polimerasa (polimerasa  $\gamma$ ), lo que sugiere que DREF podría dirigir la respuesta de la maquinaria de replicación del ADNmit adecuándola a la síntesis del ADNn y al ciclo celular<sup>284,285</sup>.

El ADNmit se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados nucleoides<sup>286</sup>. Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmit. El factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), la proteína SSB, la helicasa Twinkle y la ADN polimerasa  $\gamma$ , además de otras proteínas todavía no identificadas, forman parte de estos nucleoides<sup>287</sup>.

El genoma mitocondrial se replica y transcribe en el organelo. Los elementos cis responsables de la regulación de estos procesos están localizados en la región bucle-D del ADNmit; sin embargo, todos los factores transactivadores son codificados por el genoma nuclear<sup>288</sup>. El mecanismo de replicación del genoma mitocondrial está, desde hace años, sujeto a debate. El primer modelo, sugerido hace más de 3 décadas<sup>289</sup>, describe el proceso replicativo como una reacción asimétrica y asincrónica que envuelve dos orígenes de replicación independientes y unidireccionales,  $O_H$  y  $O_L$ <sup>290</sup>. Alternativamente, se ha propuesto un modelo en el que ambas cadenas se replicarían de manera simétrica y simultánea desde múltiples orígenes situados en una región amplia cercana al  $O_H$ <sup>291,292</sup>. Aún hoy permanece sin esclarecer si coexisten ambos mecanismos de replicación quizás regulados por distintas condiciones fisiológicas en la célula.

El proceso de transcripción requiere la presencia de una ARN polimerasa específica, dos factores de transcripción implicados en la iniciación (TFA y TFB) y otro en la terminación (TERF) de la transcripción, todos ellos codificados por el genoma nuclear. El inicio tiene lugar en la región bucle-D a partir de los promotores de transcripción de ambas cadenas (LSP, H1 y H2), generando tres moléculas largas policistrónicas que son procesadas por cortes endonucleolíticos delante y detrás de los ARNt, los cuales actúan como señales de reconocimiento para las enzimas de procesamiento al adquirir la

configuración en hoja de trébol en las cadenas nascentes de ARN, dando lugar a los ARNr, ARNt y ARNm maduros. Entre los productos de transcripción del ADNmit humano aislados se incluyen 2 ARNr (ARNr 12S y 16S), 22 ARNt y 18 ARN poliadenilados en el extremo 3', la mayoría de los cuales corresponden a los ARNm. Los ARNm mitocondriales no contienen la estructura "cap" en el extremo 5' y su extremo 3' carece de región no codificante<sup>293</sup>, finalizando en un codón de terminación incompleto que, tras una poliadenilación posterior, generará un codón de terminación.

Al contrario de la replicación y la transcripción del ADNmit, la traducción mitocondrial es poco conocida. El proceso de traducción ocurre en la matriz mitocondrial con su propio aparato de síntesis proteica que incluye dos tipos de ARN ribosómicos, el 12S y 16S. Todas las proteínas que forman parte de los ribosomas mitocondriales están codificadas por genes nucleares, son traducidas en el citosol y transportadas al interior de las mitocondrias. La función de la maquinaria de traducción mitocondrial, similar a la encontrada en procariotas, es la síntesis de los 13 polipéptidos que forman parte del sistema de OXPHOS. Este proceso requiere, además de los ARNt codificados por el ADNmit, de la acción concertada de factores de traducción y ribosomas mitocondriales. En mamíferos han sido clonados y secuenciados dos factores de iniciación (IF2 e IF3), cuatro de elongación (EFTu, EFTs, EFG1 y EFG2)<sup>294</sup>, un factor de liberación (RF1) y un factor de reciclado ribosomal (RRF)<sup>295</sup>. A pesar de los estudios realizados, todavía no se ha desarrollado un sistema que reproduzca *in vitro* la síntesis de las proteínas mitocondriales. El código genético utilizado por las mitocondrias tiene una serie de diferencias respecto al código universal, así el codón UGA codifica triptófano en lugar de terminación, AUA indica metionina en lugar de isoleucina, y los codones AGA y AGG especifican terminación en lugar de arginina. Este fenómeno asegura que solo los mensajes codificados por el ADNmit sean traducidos satisfactoriamente en la matriz mitocondrial.

#### **5.4. Cadena de transporte electrónico. Fosforilación oxidativa (OXPHOS)**

El metabolismo mitocondrial tiene como función primordial la producción de energía a partir de la oxidación aeróbica de sustratos, generando un poder reductor en forma de NADH y FADH<sub>2</sub>. Los electrones (e<sup>-</sup>) generados por la oxidación del NADH y del FADH<sub>2</sub> pasan a través de 4 complejos proteicos, la cadena de transporte electrónico, hasta reducir el oxígeno (O<sub>2</sub>) y formar agua (H<sub>2</sub>O). Este proceso ocurre en varios pasos

de oxidación-reducción y por eso recibe el nombre de cadena. La cadena respiratoria almacena la energía en forma de gradiente de concentración de protones ( $H^+$ ), que se aprovechará para sintetizar ATP en la matriz mitocondrial con la ayuda de una ATP sintasa (complejo V). Este proceso se conoce como fosforilación oxidativa ya que la síntesis de ATP es impulsada por la transferencia de  $e^-$  hacia el  $O_2$ .

La cadena respiratoria está constituida por 4 complejos multienzimáticos y 2 moléculas móviles que unen a los anteriores. Las moléculas móviles son la ubiquinona (UQ) y el citocromo C (Cit C). Los complejos I, III y IV participan en la oxidación del NADH, produciendo 3 ATPs por cada NADH, mientras que la oxidación del  $FADH_2$  en la que participan los complejos II, III y IV, produce solo 2 ATPs por cada  $FADH_2$ . Los  $e^-$  que llegan a la cadena de transporte electrónico siempre lo hacen desde el interior de la mitocondria, lo que significa que el NADH y el  $FADH_2$  se encuentran en la matriz mitocondrial. Cuando los  $e^-$  se transfieren desde el complejo I o II hasta el  $O_2$  que también está en el interior de la mitocondria, los  $H^+$  se bombean hacia el espacio intermembrana generando un gradiente que la ATP sintasa utiliza para generar ATP en la matriz mitocondrial<sup>296,297</sup>.

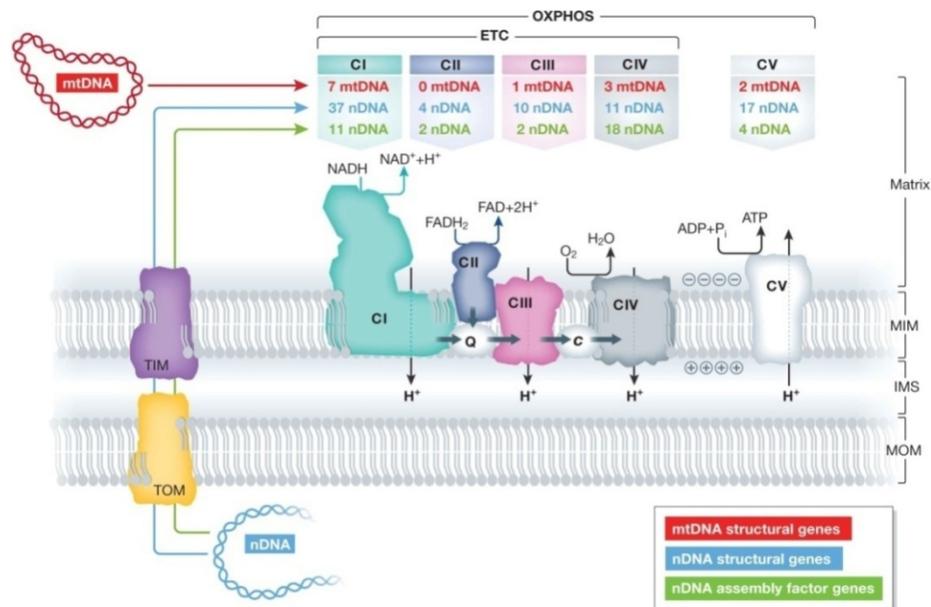
El grupo flavina mononucleótido (FMN) del complejo I traspassa 2  $e^-$  desde el NADH y pasa a la forma reducida  $FMNH_2$ , cogiendo para ello 1  $H^+$  de la matriz. Los  $e^-$  del  $FMNH_2$  pasan a una agrupación hierro-azufre que los transporta de uno en uno, quedando los  $H^+$  libres en el espacio intermembrana<sup>298</sup>. Los  $e^-$  salen del complejo I hasta la ubiquinona (UQ), que es capaz de transportar 2  $e^-$  y 2  $H^+$ . El paso de los  $e^-$  por el complejo I provoca un bombeo de  $H^+$  desde el interior de la mitocondria. La ubiquinona (UQ) coge los 2  $H^+$  del medio que le hace falta para reducirse a  $UQH_2$ <sup>296</sup> y cede los  $e^-$  al complejo III. El primer componente que actúa de este complejo es el citocromo b, que contiene un grupo hemo con un átomo de hierro que pasa de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y cede los  $e^-$  a una agrupación hierro-azufre quedando de nuevo en estado oxidado<sup>299</sup>. Esta agrupación pasa el electrón al citocromo  $C_1$ , que a su vez lo pasa al citocromo C que está fuera del complejo III. Este citocromo C los cede al complejo IV o citocromo C oxidasa (COX IV)<sup>300</sup>, y éste a un átomo de cobre. De aquí pasan al citocromo a, a otro átomo de cobre y finalmente al citocromo  $a_3$  que se los cede al  $O_2$  para formar  $H_2O$ . Cada vez que el NADH se reoxida cede 2  $e^-$  por lo que sólo es capaz de reducir 1 átomo de  $O_2$ , por lo tanto se necesitan 2 moléculas de NADH para que lleguen 4  $e^-$  a la vez y que el  $O_2$  se reduzca para dar 2 moléculas de  $H_2O$ .

Los  $e^-$  que cede el FAD a la cadena de transporte electrónico provienen del ciclo de krebs a partir del succinato que se encuentra en la matriz mitocondrial. Este succinato da lugar al fumarato mediante la pérdida de  $2 H^+$  que recoge el FAD dando lugar al  $FADH_2$ . Los  $e^-$  pasan a una agrupación hierro-azufre y seguidamente a la UQ. De aquí en adelante el proceso es el mismo que cuando cede los  $e^-$  el NADH.

Existen tres sitios en la cadena de transporte electrónico (complejos I, III y IV) en los que la energía liberada por este transporte de  $e^-$  se usa para dirigir el flujo de  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana. Como consecuencia, se genera una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna, que consiste en una diferencia de carga eléctrica o potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) y una diferencia de pH ( $\Delta pH$ ).

El complejo V disipa el potencial de membrana para formar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) gracias a la energía liberada por el flujo controlado de los  $H^+$  en su entrada a la matriz mitocondrial a través del complejo.

Los complejos de la OXPHOS no se distribuyen aleatoriamente por la membrana sino que se organizan en supercomplejos llamados respirasomas<sup>301,302,303</sup>. Los complejos II, III y IV formarían un respirasoma, mientras el complejo V formaría estructuras diméricas<sup>304</sup>.



**Figura 17: Origen genético e interacción funcional de los complejos de la OXPHOS.** Las subunidades I, III, IV y V están codificadas por el ADNmit y ADNn, mientras que la II está exclusivamente codificada por el ADNn. **MIM:** membrana mit interna; **IMS:** espacio intermembrana; **MOM:** membrana mit externa;<sup>296</sup>

## 5.5. Producción de ROS en la mitocondria

En el interior de la mitocondria existe un ambiente altamente reductor, por lo que varios componentes de la cadena respiratoria como flavoproteínas, centros hierro-azufre y las ubisemiquinonas, son termodinámicamente capaces de transferir un  $e^-$  al  $O_2$  produciéndose el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Este anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), con un  $e^-$  desapareado en su orbital externo que le confiere una alta reactividad, es el precursor de muchas especies reactivas del oxígeno (ROS) y el mediador de muchas reacciones de carácter oxidativo. Es por ello que la mitocondria es la mayor fuente de ROS, que se generan como subproducto de la fosforilación oxidativa.

Cuando la cadena respiratoria funciona correctamente, la mayoría del  $O_2$  consumido por la mitocondria es convertido en  $H_2O$ , y la generación de ROS se presenta en un bajo porcentaje (~4-5%); de hecho, se sabe que del 1 al 3% del  $O_2$  consumido por la mitocondria no es completamente reducido, generándose radicales del oxígeno<sup>305</sup>. En condiciones normales son neutralizados por enzimas antioxidantes como un mecanismo de protección celular, produciéndose un balance entre la formación y la destrucción de ROS.

Los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico parecen ser los responsables de la mayoría del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) producido en las mitocondrias<sup>306,307</sup>. Esta producción se puede dar en la membrana mitocondrial externa, en la matriz y a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, y depende del grado de reducción electrónica de estos complejos, así como de la presión parcial del oxígeno ( $pO_2$ ) local<sup>308</sup>. El grado de reducción electrónica determina la capacidad de los complejos de donar  $e^-$  al  $O_2$ , de tal forma que a mayor grado de reducción electrónica, mayor producción de ROS. Cuando la tasa de flujo electrónico es baja, los  $e^-$  se acumulan en la cadena respiratoria y los complejos tienden a reducirse más, incrementando su capacidad de producir ROS<sup>309</sup>. El incremento en la respiración mitocondrial disminuye la producción de ROS no sólo a través de la disminución del grado de reducción, sino también mediante el descenso en la  $pO_2$  local debido al mayor consumo de  $O_2$  mitocondrial.

El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) puede ser detoxificado por la enzima superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD) o la enzima superóxido dismutasa de Cobre/Zinc (Cu/Zn-SOD) que catalizan la conversión del  $O_2^{\cdot-}$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se puede convertir en H<sub>2</sub>O por la enzima glutatión peroxidasa (GSH-PX) y/o la enzima catalasa, o puede atravesar la membrana mitocondrial hacia el citoplasma<sup>310</sup>, y si hay metales de transición reducidos en la matriz, por ejemplo, Fe<sup>2+</sup> puede generar el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) altamente reactivo. De modo que, cuando la producción de radicales libres es excesiva y los mecanismos de protección insuficientes, se produce daño oxidativo mitocondrial a nivel del ADNmit, lípidos de membrana y proteínas mitocondriales.

La alteración en los niveles intracelulares de ROS se asocia con cambios en la abundancia mitocondrial, el número de copias de ADNmit y la expresión de genes de la cadena respiratoria. Pese a la heterogeneidad de los resultados obtenidos respecto al contenido mitocondrial y mantenimiento del ADNmit en una situación de estrés oxidativo, se ha llegado a la conformidad de que dependiendo de los niveles intracelulares de ROS, de la capacidad del sistema antioxidante intracelular y de la calidad de las mitocondrias y/o el ADNmit, se pueden dar 3 situaciones: **1)** en células con mayor capacidad antioxidante y buena calidad de mitocondrias parentales y ADNmit, la respuesta a un estrés oxidativo leve conduce a un aumento en la abundancia de mitocondrias y moléculas de ADNmit, resultando en un incremento en el suministro de energía por el aumento en el número de mitocondrias<sup>311,312,313</sup>; sin embargo, **2)** cuando se produce una situación de estrés oxidativo moderado-fuerte con una capacidad antioxidante al límite, el número de copias de ADNmit disminuye sin que se produzca necesariamente una disminución del contenido mitocondrial<sup>314</sup>; finalmente, **3)** cuando la capacidad del sistema antioxidante está gravemente comprometida, la exposición celular a un mayor estrés oxidativo da como resultado un aumento en el número de mitocondrias defectuosas, así como copias de ADNmit mutadas y, por tanto, un aumento cíclico en la producción de ROS. Si se superara un umbral de daño oxidativo, las mitocondrias pueden conducir a la célula a un proceso irreversible de muerte celular<sup>315,316,317,318</sup>.

En los últimos años, el estudio del papel de la biogénesis mitocondrial y el mantenimiento del ADNmit en la determinación de la vida y la muerte celular bajo una situación de estrés oxidativo, está adquiriendo una mayor importancia y está mejorando la comprensión de la función mitocondrial en las células de mamíferos.

## 5.6. La biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial comprende una serie de procesos celulares involucrados en la formación de nuevas mitocondrias. En este fenómeno confluyen el aumento del número de mitocondrias por célula o proliferación y la diferenciación mitocondrial, siendo ésta última necesaria para que el orgánulo adquiriera las características estructurales y funcionales adecuadas para el desarrollo de sus funciones específicas en las distintas células del organismo. Las mitocondrias nunca se sintetizan "de novo" sino que surgen por el crecimiento y división de mitocondrias preexistentes; por tanto, la biogénesis mitocondrial es un proceso biológico complejo, altamente controlado y no un acontecimiento causal, que implica cambios en la expresión de más de 1000 genes, la cooperación de dos genomas (nuclear y mitocondrial), y la alteración de aproximadamente un 20% de las proteínas celulares<sup>319</sup>. Múltiples factores, tanto endógenos como exógenos, regulan la biogénesis mitocondrial a través del coactivador de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), un cofactor transcripcional que regula la expresión de genes implicados en el metabolismo celular, la función y biogénesis mitocondrial<sup>320</sup>. PGC1 $\alpha$  activa la expresión de los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF-1/2)<sup>321</sup>, los cuales son capaces de integrar el control nuclear de la transcripción y la replicación del genoma mitocondrial, a través de la modulación directa de la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), esencial para la replicación, transcripción y mantenimiento del genoma mitocondrial<sup>288,322</sup>. Además, NRF-1/2 regulan la expresión de genes nucleares que codifican subunidades de la cadena respiratoria y otras proteínas necesarias para la función mitocondrial<sup>323,324</sup>.

Durante el proceso de biogénesis es de gran importancia el papel que juegan las especies reactivas de oxígeno<sup>312,313</sup>, la dinámica mitocondrial<sup>319</sup> y la estructura de los microtúbulos<sup>325</sup>.

**La biogénesis mitocondrial en la hipertrofia cardiaca.** El corazón depende en gran medida de la función mitocondrial debido a la extraordinaria demanda en la síntesis continua de ATP a través de un metabolismo oxidativo, siendo el órgano con el mayor consumo de oxígeno del organismo. Las mitocondrias generan más del 90% del ATP intracelular utilizado por los cardiomiocitos y, por ello, representan el 45-60% del volumen de los cardiomiocitos en función del requerimiento energético.

En el corazón fetal, la glucosa y el lactato son los principales sustratos energéticos, ya que como se ha comentado anteriormente, éste funciona en un ambiente relativamente hipóxico. Por este motivo los corazones fetales tienen un menor contenido mitocondrial y, por tanto, menores grados de actividad del complejo respiratorio y del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de krebs).

En el periodo posnatal los ácidos grasos se convierten en el principal sustrato energético del corazón. Éstos son catabolizados en la matriz mitocondrial por el proceso de la  $\beta$ -oxidación, mientras que el piruvato derivado de la glucosa y el lactato es oxidado por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) ubicado en la membrana mitocondrial interna. El producto final de ambas vías (glicólisis y  $\beta$ -oxidación) es la generación de acetil-coA, que es oxidado en el ciclo de Krebs para generar los factores reducidos NADH y FADH<sub>2</sub>, los cuales participan en el transporte de electrones de la OXPHOS para generar ATP; es por este motivo que la función mitocondrial adquiere mayor importancia en los corazones adultos y, en consecuencia, aumenta el contenido mitocondrial durante el periodo postnatal.

En el proceso hipertrófico ocurren diversos cambios metabólicos a nivel de la utilización de sustrato, la fosforilación oxidativa y el metabolismo del ATP. Bajo condiciones normales la mayor cantidad de ATP se genera mediante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos; sin embargo, en la hipertrofia cardíaca al igual que en el desarrollo fetal, se favorece la oxidación de glucosa para obtener energía. Pese a que la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga libera más de 6 veces la cantidad de energía que una masa igual de glucosa, se requiere una mayor cantidad de oxígeno por mol de ATP producido, de hecho cerca del 75% del oxígeno consumido por el miocardio es utilizado para la oxidación mitocondrial. Esto no conduce a una situación demasiado favorable cuando el consumo de oxígeno por latido se incrementa todavía más, debido al ejercicio físico o al aumento de la presión hemodinámica en los corazones hipertróficos; el cambio a la utilización de glucosa que necesita menos oxígeno por mol de ATP producido es, por tanto, un mecanismo adaptativo<sup>326,327</sup>.

Dado que la hipertrofia cardíaca conlleva un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos en el corazón adulto, las mitocondrias deben proliferar junto con las estructuras contráctiles para mantener en equilibrio los sitios productores y consumidores de energía<sup>328</sup>. Especialmente durante la hipertrofia fisiológica, la biogénesis mitocondrial se desencadena a través de la modulación de la relación

ATP/ADP, la activación de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK), y el consiguiente aumento de expresión de PGC1 $\alpha$  y NRF1. Aunque inicialmente se había sugerido que la regulación del número de copias del ADNmit determina el contenido mitocondrial en una célula, dado que el ADNmit está presente en múltiples copias por mitocondria, cada vez está más aceptado que el incremento en la masa mitocondrial se logra principalmente mediante el aumento en los niveles de los transcritos mitocondriales, ya que **1)** la comparación de tejidos o líneas celulares con diferentes capacidades oxidativas no ha revelado una correlación entre la actividad de la cadena respiratoria y el número de copias de ADNmit<sup>329,330</sup> y, **2)** en muchos modelos experimentales en los que proliferan las mitocondrias, no se ha encontrado ningún aumento en el número de copias del ADNmit<sup>331,332</sup>, por tanto, la replicación del ADNmit no necesariamente ocurre simultáneamente con el crecimiento y la división mitocondrial.

Pese a que no está claro cómo el número de copias del ADNmit se regula en diferentes condiciones fisiológicas y del desarrollo durante la progresión de la hipertrofia cardiaca patológica, el cambio en el sustrato utilizado por el miocardio implica cambios en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa. PGC1 $\alpha$  y el receptor activado por proliferadores peroxisomales  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) desempeñan una función clave en este proceso, ya que regulan la expresión de genes que codifican para enzimas mitocondriales importantes en el metabolismo de los ácidos grasos<sup>333,334</sup>. La disminución de la actividad de PPAR $\alpha$  y PGC1 $\alpha$  causa un cambio metabólico de la oxidación de los ácido grasos a la glucosa, lo que resulta en una disminución en la generación de ATP y, por tanto, en el compromiso de la función normal del cardiomiocito. Frente a una demanda de energía exagerada, especialmente con una carga alta de trabajo, la generación de ATP a partir de la glucosa es insuficiente y contribuye de manera importante a la insuficiencia de los cardiomiocitos. Este déficit de energía acaba disminuyendo el contenido mitocondrial por cardiomiocito, y en las últimas fases de la hipertrofia cardiaca patológica, la proliferación mitocondrial no sigue el ritmo de la creciente demanda energética. Esta descompensación durante un tiempo prolongado resulta finalmente en una insuficiencia cardiaca y eventualmente en un fallo cardiaco<sup>335,336</sup>.

## 5.7. Papel de la mitocondria en la apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que juega un papel esencial en el desarrollo y en la homeostasis de los tejidos. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas, y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis e implica la activación de un programa intrínseco celular. Esta muerte celular se da a través de una secuencia determinada de pasos: primero tiene lugar una fase de iniciación, mediada por una vía mitocondrial (vía intrínseca) o por una vía activada a través de receptores de muerte (vía extrínseca); posteriormente, ambas vías convergen en una segunda fase de ejecución caracterizada por la activación de las caspasas, últimas responsables de las características morfológicas de esta muerte apoptótica (condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del ADN en fragmentos oligonucleosómicos); finalmente, tiene lugar la fase de eliminación, en la que los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas<sup>337</sup>.

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular, y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el ADN. Estas dos vías, también denominadas extrínseca e intrínseca respectivamente, pueden solaparse, aunque la transducción de señales es diferente. En la vía intrínseca, la apoptosis se inicia por estímulos que producen una serie de señales intracelulares que repercuten en la mitocondria. Estos estímulos pueden ser la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, o bien la radiación, la presencia de toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres. Todos estos estímulos producen cambios en la membrana mitocondrial que provocan la apertura del complejo del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (mPTP), la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, entre las que se incluyen el citocromo C, la proteína Smac/DIABLO, la proteasa Omi/HtrA2 (del inglés *high temperatura requirement inducing factor*), el factor inductor de la apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (ENDOG)<sup>338</sup>. El control y la regulación de los eventos apoptóticos los lleva a cabo la familia de proteínas Bcl-2<sup>339</sup>, siendo las proteínas apoptogénicas las que desencadenan

la ejecución de la muerte celular, bien promoviendo la activación de caspasas, o bien actuando como efectores de muerte independientes de la activación de caspasas<sup>338</sup>. La salida del citocromo C desde la mitocondria desencadena directamente la activación de la caspasa 3 a través de su unión a una proteína citosólica, Apaf-1 (del inglés *Apoptosis proteasa activating factor-1*), que posee un motivo llamado CARD dentro de su estructura que actúa como una plataforma donde la caspasa 9 (iniciadora) es reclutada y activada. El complejo citocromo C/Apaf-1/Caspasa 9 se denomina entonces apoptosoma, y es el encargado de reclutar a la caspasa 3 (efectora) que es activada por la caspasa 9 residente en el complejo<sup>340</sup>. Una vez activada, la caspasa 3 proteoliza sustratos específicos produciendo los cambios celulares y bioquímicos típicos de la apoptosis. Otras proteínas liberadas al citoplasma como Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 facilitan la activación de caspasas de manera indirecta neutralizando inhibidores de caspasas endógenos, concretamente a las IAPs<sup>341</sup>. Además, Omi/HtrA2 puede actuar como una proteasa de manera independiente de caspasas<sup>338</sup>. La liberación de AIF y ENDOG al citoplasma representa un mecanismo apoptótico independiente de caspasas (como será explicado en el capítulo 7). La permeabilización de la membrana mitocondrial externa permite su liberación y posterior translocación al núcleo junto con la nucleasa citosólica CAD, contribuyendo a la condensación de la cromatina y a la fragmentación del ADN<sup>338</sup>. Si estas proteínas son liberadas antes, al mismo tiempo, o después del citocromo C sigue siendo un tema controvertido.

## 6. El estado redox celular

### 6.1. Conceptos básicos

A lo largo de la introducción se han ido presentando evidencias que relacionan a las especies reactivas del oxígeno (ROS) con diferentes fenotipos observados como, por ejemplo, la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos perinatales o la señalización prohipertrófica en los cardiomiocitos postnatales. En este capítulo se revisarán los conceptos principales acerca de las ROS, y se explicarán los procesos moleculares más importantes que les permiten modular la señalización a nivel celular.

El estado redox celular es el resultado del continuo ajuste de las condiciones oxidantes y reductoras dentro de una célula, ya que ésta contiene de forma natural componentes con propiedades redox. Se entiende por condiciones/reacciones de oxidación-reducción a aquellas en las que cambia el grado de oxidación de las especies reaccionantes porque se produce un intercambio de electrones entre los reactivos. Para ello es necesario la presencia de un oxidante, especie que capta electrones y reduce su estado de oxidación, y de un reductor o especie que libera electrones y aumenta su estado de oxidación<sup>342,343</sup>.

La magnitud y la duración de la desviación hacia una situación de mayor oxidación o reducción, dependen básicamente de los niveles de los factores prooxidantes y de la capacidad antioxidante (reductora) de la célula. Los desajustes temporales del nivel redox basal actúan como señales que inician y regulan diversos procesos celulares, ya que condicionan la expresión génica por medio de diferentes rutas de transducción de señales y por la modulación de los factores de transcripción, así como por la modificación directa de algunas moléculas implicadas en la regulación de diversos procesos celulares como proteínas quinasas o fosfatasa<sup>213</sup>.

La producción de cantidades anómalas de oxidantes puede generar una situación oxidativa persistente, alterando el balance redox celular, que condiciona hasta tal punto las señales de transducción y la expresión génica que, normalmente, acaba desembocando en una situación anómala e incluso letal para la célula. A esta situación de desequilibrio del estado redox celular por un exceso de oxidantes o radicales libres, se conoce como estrés oxidativo<sup>344</sup>.

### 6.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Un radical libre es toda especie química, átomo, molécula o parte de ésta, cargada o no, que en su estructura presenta uno o varios  $e^-$  desapareados o impares en su orbital más externo, dándole una configuración electrónica de gran inestabilidad. Los

electrones tienden a la configuración energética más estable posible apareándose en su último orbital. Por ello, el radical libre tiene una gran tendencia a recuperar la situación de estabilidad perdida, bien cediendo el  $e^-$  desapareado, agente reductor, o bien captando un  $e^-$ , agente oxidante<sup>345</sup>.

La presencia de especies radicales se debe, básicamente, a la participación del oxígeno ( $O_2$ ) en el metabolismo celular. Su capacidad de aceptar electrones, liberando una gran cantidad de energía en el proceso, es la base de la respiración aerobia. Esta propiedad

de tomar electrones es debida a que el  $O_2$  es un potente oxidante al poseer un  $e^-$  desapareado en su orbital más externo y, por ello, a todos los radicales libres (y no radicales) relacionados con el oxígeno, que siendo precursores y derivados de éstos, participan en reacciones que aumentan los niveles de elementos prooxidantes en la célula, se les denomina especies reactivas del oxígeno (ROS)<sup>346,347</sup>.

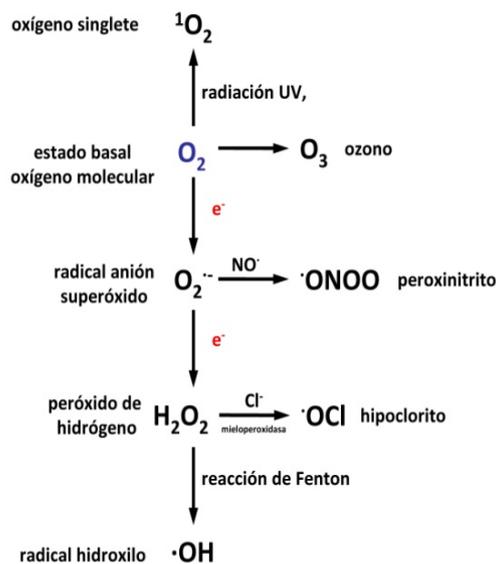


Figura 18: Esquema de la reducción secuencial del oxígeno molecular para dar lugar a las principales especies reactivas del oxígeno (ROS).

Si el oxígeno molecular se reduce captando un solo electrón procedente de la cadena respiratoria mitocondrial se origina la forma aniónica radical denominada superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (figura 18).

El anión superóxido genera especies más reactivas que él mismo. Por un lado reacciona rápidamente con el óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^\bullet$ ), que produce a su vez numerosas especies nocivas en condiciones fisiológicas. Por otro lado, puede dismutarse y generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como subproducto, el cual en presencia de iones metálicos, principalmente hierro, genera el radical hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ) mediante la denominada reacción de Fenton:



Las características del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) hacen que sean, probablemente, las ROS más importantes en señalización celular. El superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es un radical con una elevada reactividad, aunque muy por debajo del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y del hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ). Presenta carga negativa a PH

fisiológico, lo que hace que su difusión a través de las membranas sea lenta<sup>212,348</sup>. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una molécula sin carga, no un radical, y presenta un cierto carácter apolar, de manera que es una molécula con una vida media moderadamente larga y es capaz de difundir a través de las membranas biológicas e inducir la formación del radical hidroxilo (OH) en puntos alejados de su lugar de origen<sup>310</sup>. El radical hidroxilo (OH) es altamente oxidante y contra él no existe ningún detoxificador enzimático, por ello es importante eliminar rápidamente las ROS de las células antes de que se produzca este radical; de aquí la importancia de los correspondientes mecanismos de defensa antioxidante.

### 6.3. Defensa antioxidante frente a las ROS.

Numerosos estudios describen cómo la acumulación de las ROS en el organismo puede provocar daños en la estructura y función celular mediante la degradación oxidativa de ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos o azúcares y lípidos. Del mismo modo, está más que demostrada su participación en mayor o menor grado en el envejecimiento, en algunas formas de cáncer, en la aterosclerosis, en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, así como en patologías que implican procesos inflamatorios crónicos como las artritis reumatoides y psoriáticas<sup>349,213</sup>.

Por este motivo los organismos han desarrollado un sistema de defensa frente a la toxicidad de los radicales libres. Se define como antioxidante a cualquier sustancia generada por la propia célula o incorporada en la dieta que, en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN<sup>350</sup>.

Los antioxidantes al interactuar con un radical libre le ceden un electrón, oxidándose a su vez y transformándose luego en un radical libre débil no tóxico, sacrificando así su propia estabilidad electrónica; como éstos interactúan más rápidamente con los radicales libres que con el resto de moléculas presentes, impiden que otras moléculas se unan al oxígeno molecular.

Los sistemas de defensa antioxidante en el organismo pueden clasificarse en dos grupos: sistemas de defensa enzimáticos y sistemas de defensa no enzimáticos. El

sistema antioxidante enzimático está basado en un complejo de defensa que incluye a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa (GR). El objetivo es la dismutación del radical  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ , cuya acumulación se evita al ser transformado en agua y oxígeno molecular, consumiendo glutatión (GSH) y  $NADPH^+$  (figura 19)<sup>351</sup>.

Los antioxidantes no enzimáticos llamados depuradores o neutralizadores de radicales libres (del inglés *scavenger*), también son esenciales ya que actúan cuando el sistema enzimático está saturado o cuando éste está ausente, y se trata de pequeñas moléculas que pueden ser hidrosolubles, localizadas en los fluidos, como el glutatión o la vitamina C, o liposolubles, localizadas en las membranas celulares, como la vitamina E<sup>352</sup>.

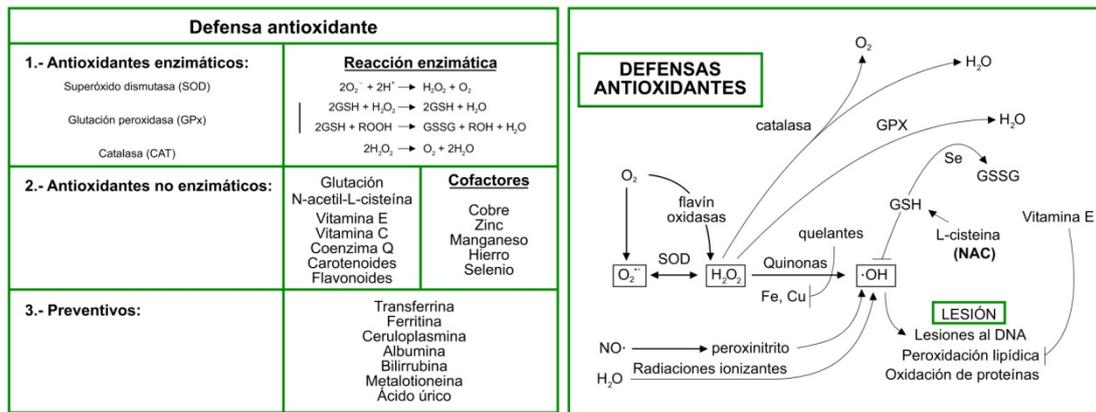


Figura 19: Esquema de las principales defensas antioxidantes y lesiones a biomoléculas.

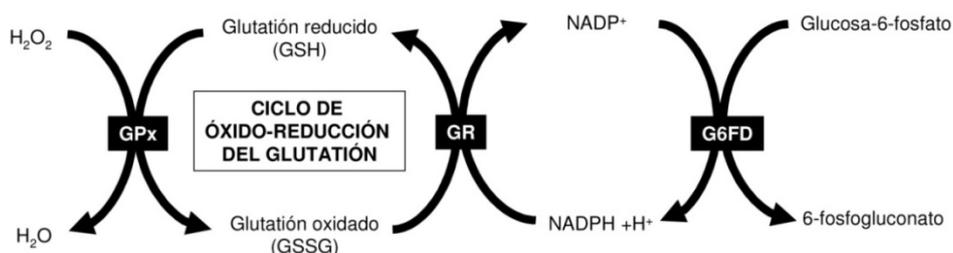
De todos los antioxidantes no enzimáticos, son especialmente importantes para este trabajo el glutatión (GSH) y la N-acetil-L-cisteína (NAC). El glutatión es un péptido compuesto por tres aminoácidos:  $\gamma$ -L-glutamina, L-cisteína y glicina, y su protección frente al daño causado por sustancias oxidantes como los radicales libres, se debe al grupo sulfhidrilo (-SH) de la L-cisteína que puede tomar o ceder electrones. Es el mayor componente sulfhidrilo (-SH) no proteico en las células de mamíferos, con importantes funciones biológicas no sólo en la protección celular contra la oxidación, sino también en la proliferación celular, en el transporte de aminoácidos, en la síntesis de proteínas y de ADN<sup>353</sup>.

El glutatión puede encontrarse en dos formas redox: el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG), formado por dos GSH unidos por un puente disulfuro. El glutatión se puede considerar como un tampón redox, protegiendo los grupos sulfhidrilo de las proteínas, manteniendo el hierro del grupo hemo en forma de hierro II

y eliminando los peróxidos tóxicos. En situaciones de estrés oxidativo, el GSH elimina el exceso de radicales libres intracelulares mediante la oxidación del grupo sulfhidrilo de su residuo de cisteína, generándose GSSG que posteriormente se reduce a GSH por la glutatión reductasa, ya que la acumulación de GSSG tiene efectos tóxicos para la célula puesto que puede inactivar enzimas (figura 20). De este modo el cociente GSH/GSSG intracelular se puede utilizar como un indicador del estrés oxidativo celular<sup>354</sup>.

Determinadas situaciones fisiopatológicas que se caracterizan por presentar bajos niveles intracelulares de GSH, requieren la administración de un precursor de su síntesis como la N-acetil-L-cisteína (NAC), ya que el GSH no tiene transportadores específicos para su importación y necesariamente debe ser sintetizado dentro de las células<sup>355,356</sup>.

La N-acetil-L-cisteína (NAC) es el derivado N-acetilado del aminoácido natural cisteína, que actúa como un neutralizador de radicales libre evitando la oxidación de importantes moléculas estructurales y funcionales. Esto lo consigue mediante efectos directos a través de su grupo sulfhidrilo (-SH) libre que actúa como un potente agente reductor, por medio de la estimulación de la síntesis del glutatión, ya que la N-acetil-L-cisteína (NAC) puede ser desacetilada intracelularmente para dar lugar al aminoácido L-cisteína, limitante en la síntesis del glutatión, que junto con los aminoácidos glicina y glutamina forman la base para su biosíntesis dentro de las células<sup>357,358,359</sup>.



**Figura 20: Ciclo de óxido-reducción del glutatión.** GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa; G6FD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

## 6.4. Fuentes celulares de las ROS

Las ROS no sólo proceden de fuentes exógenas (radiaciones ultravioleta e ionizantes, contaminantes, etcétera), sino que las propias células generan ROS tanto activamente como en forma de subproductos derivados de procesos biológicos relevantes.

Como se ha explicado en detalle en el capítulo anterior, la mitocondria es la principal fuente celular del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pero no la única, ya que en las membranas celulares también se generan las especies reactivas del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y ácido hipocloroso (HClO) mediante la acción de las enzimas NADPH oxidasa (Nox), de las que ya se ha hablado en el capítulo 4 de la introducción, la mieloperoxidasa y xantina oxidasa; otras enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa también generan ROS durante la síntesis de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas<sup>360,361</sup>.

En el retículo endoplasmático también se produce anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por la autooxidación de la flavoproteína NADPH citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450. Así mismo, las monooxigenasas de función mixta, proporcionan otra fuente importante de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )<sup>362</sup>.

En el citoplasma se encuentran enzimas como la xantina oxidasa y la aldehído deshidrogenasa que durante sus ciclos catalíticos generan ROS como subproductos<sup>363</sup>, y pequeñas moléculas solubles, como catecolaminas, flavinas y tioles, que mediante procesos de autooxidación reducen el oxígeno<sup>364</sup>.

## 6.5. La señalización celular por ROS

Tradicionalmente las especies reactivas del oxígeno (ROS) han sido consideradas como productos tóxicos pero inevitables del metabolismo celular aeróbico; sin embargo, cada vez más estudios sugieren que las ROS pueden ser beneficiosas ya que todas las células aeróbicas necesitan forzosamente la presencia continua de ciertos niveles de ROS para mantenerse vivas. Muchas de ellas son necesarias para llevar a cabo varios procesos biológicos como son la defensa frente a virus, bacterias y células anómalas mediante su liberación por los neutrófilos<sup>365,366</sup>, la vasodilatación de la circulación cerebral<sup>367,368</sup> y la regulación de diversas actividades enzimáticas, participando en sistemas de transducción de señales y actuando como segundos mensajeros.

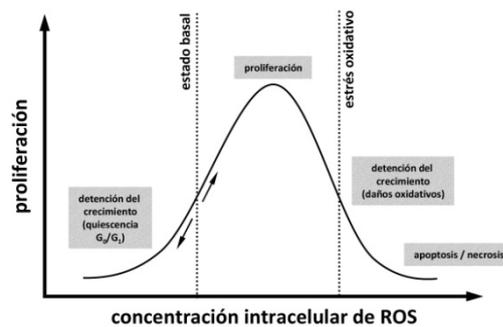


Figura 21: Representación de la relación entre los niveles intracelulares de ROS y la proliferación celular<sup>378</sup>.

El comportamiento celular frente a las ROS presenta un gradiente muy bien definido (figura 21)<sup>369</sup>. Concentraciones muy bajas de ROS no tienen ningún efecto sobre el metabolismo celular al ser tamponadas por el potencial reductor celular; sin embargo, conforme se va incrementando la concentración de ROS se produce un aumento en la proliferación celular, muy documentado en multitud de líneas celulares<sup>370,371,372,373,374,375,376,377,378</sup>. Superado un cierto umbral, el efecto oxidante de las ROS empieza a interferir con los sistemas de señalización celular, para terminar generando daño a concentraciones mayores. A partir de este punto la respuesta celular dependerá, no sólo de la concentración de las ROS, sino también del potencial reductor celular disponible. Conforme aumenta el potencial oxidante se producirá la activación de la respuesta al estrés oxidativo, la salida del ciclo celular y la reparación del daño, con una posible entrada en la etapa de diferenciación terminal o senescencia, activación del programa apoptótico o, incluso, necrosis<sup>379,348,380,381</sup>.

Tanto el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), actúan como señalizadores modulando el estado redox local y general de la célula<sup>382,383,384,385</sup>. Esto lo consiguen provocando cambios reversibles en determinadas proteínas a bajas concentraciones (señalización celular), mientras que generan un daño irreversible a concentraciones más elevadas (estrés oxidativo). Actualmente se conocen muchos tipos de proteínas que están reguladas funcionalmente por la oxido-reducción de sus cisteínas situadas en el centro catalítico o funcional de éstas. Las ROS oxidan el grupo tiol o sulfhidrilo ( $-SH$ ) de la cisteína en varias etapas: la primera oxidación a ácido sulfénico ( $-SOH$ ) es reversible y dependiente de GSH; sin embargo, la siguiente oxidación a ácidos sulfínico y sulfónico ( $-SO_2H$  y  $-SO_3H$ ) por el aumento en la concentración de ROS, es irreversible. Esta oxidación excesiva inactiva de forma permanente al enzima o provoca un cambio estructural deletéreo<sup>386</sup>.

Muchos tipos de canales y bombas iónicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ) se encuentran regulados por este mecanismo. Concretamente, el caso del  $Ca^{2+}$  es muy notable, pues actúa también como segundo mensajero en multitud de rutas de señalización. Existe una relación sólida entre la señalización por el  $Ca^{2+}$  y las ROS, ya que el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citoplasmático refuerza la señal por ROS y viceversa<sup>387</sup>.

Otro ejemplo de regulación enzimática a través de las ROS se encuentra en la proteína quinasa C (PKC). Las cisteínas localizadas en el dominio regulador de la proteína son más susceptibles de oxidación que las cisteínas del dominio catalítico.

Cuando las cisteínas reguladoras son oxidadas a sulfénico, la PKC se activa. Si la concentración de ROS es tal que también se oxidan las cisteínas catalíticas, el enzima se inactiva<sup>388</sup>.

Este mecanismo de regulación redox también se observa en algunos factores de transcripción (AP-1, NF- $\kappa$ B) que presentan cisteínas en sus dominios de unión a la cromatina. Es necesario que las cisteínas de estos dominios estén reducidas para poder acceder a las secuencias de ADN<sup>389</sup>.

La inhibición reversible de las proteína tirosina fosfatasas PTPs es uno de los mecanismos más importantes de señalización celular por ROS, comentada anteriormente por su participación en la señalización hipertrófica (capítulo 4). Las PTPs representan un conjunto de enzimas cuya función es la de eliminar el grupo fosfato unido a un residuo de tirosina de otra proteína. Para ello tienen una cisteína catalítica, imprescindible para realizar esta función, cuyo grupo sulfhidrilo está ionizado a pH fisiológico, presentándose como anión S<sup>-</sup>. En estas circunstancias el grupo sulfhidrilo es extremadamente sensible a la oxidación por superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>390,391</sup>. La oxidación parcial produce primero ácido sulfénico (reversible por GSH) y, ante un exceso de ROS, ácidos sulfínico y sulfónico (irreversibles)<sup>392,393,384,394</sup>.

Dado que las PTPs eliminan los fosfatos unidos a tirosinas, su función es la opuesta a la familia de enzimas denominadas tirosina quinasas (TyrKs), de modo que actúan como antagonistas en las rutas de señalización iniciadas por los receptores de membrana RTyrKs. Esta función es necesaria, no sólo para modular adecuadamente la señalización en presencia de un ligando, sino también porque los RTyrK presentan una cierta tasa de auto-activación en ausencia de su ligando<sup>392,394</sup>.

Tras su activación, los RTyrKs señalizan rutas de supervivencia y proliferación. Una de estas rutas implica a la quinasa Src, que una vez fosforilada activa a Rac, la cual se une a la membrana citoplasmática y activa al complejo NOX. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generado por NOX difunde al citoplasma y oxida a la cisteína catalítica de muchas PTPs. Esta oxidación inactiva a las PTPs, lo que refuerza las señales desde los receptores RTyrKs. De este modo, es posible asociar causalmente la generación de ROS en el complejo NOX con la activación de algunos receptores de membrana. Esta producción de ROS tendría una función reforzadora de las señales que se han iniciado en los receptores RTyrKs. Posteriormente la actividad catalítica de las

PTPs se puede recuperar con la reducción del grupo sulfenilo a sulfhídrico a través del GSH<sup>395,396,397,398</sup>.

Asimismo, cada vez está más aceptado que las ROS tienen el potencial de afectar a vías de señalización cruciales para muchos procesos biológicos como el crecimiento, la proliferación, la motilidad, así como la supervivencia celular. Una de estas vías de señalización, la PI3K/AKT, es especialmente importante para este trabajo. Los primeros estudios en esta vía mostraban cómo el tratamiento con ROS conducía a la activación de la señalización PI3K/AKT<sup>399,400,401,402,403</sup>. El mecanismo propuesto implica la inhibición de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), que desempeña un papel clave en la disminución de la señalización PI3K/AKT<sup>404,405,406</sup>. PTEN contiene un residuo de cisteína altamente reactivo en su sitio catalítico que es susceptible a la oxidación por ROS. Esta oxidación inactiva la fosfatasa impidiendo la inhibición de la vía PI3K/AKT<sup>407,408</sup>. Además, la fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A) que participa en la desfosforilación de AKT<sup>409</sup>, también puede ser inactivada por ROS<sup>410,411</sup>, aunque todavía no se ha descrito cómo la inactivación oxidativa de PP2A participa en la activación de la señalización de AKT.

Sin embargo, en esta última década cada vez más estudios demuestran que las ROS no sólo pueden activar esta vía, sino que también la inhiben a través de la oxidación reversible de AKT<sup>412,413,414,415</sup>.

AKT se activa mediante una fosforilación en los residuos de Thr308 y Ser473<sup>416</sup>, pero la estructura del dominio quinasa de AKT2 inactiva, perteneciente a la familia de proteína quinasas B, muestra que en el bucle de activación de AKT2, la Cys297 puede formar un enlace disulfuro con la Cys311, lo que significa que AKT es sensible a una oxidación reversible por un agente reductor<sup>417</sup>. En cardiomiocitos de rata H9C2 se ha demostrado que la formación de este enlace disulfuro es inducida por el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y se ha propuesto que esta oxidación aumenta la interacción entre la AKT oxidada y la fosfatasa PP2A, lo que conduce a la desfosforilación de AKT<sup>415</sup>. *In vivo*, un estudio apoya esta hipótesis al demostrar que la oxidación de AKT en el mesencéfalo de ratón está asociada con la disminución en la fosforilación de AKT<sup>412</sup>. Parece que AKT es más sensible a la oxidación que las otras dos proteínas de esta vía que también tienen una regulación redox, PTEN y PP2A; de manera que niveles bajos de un estrés oxidativo crónico causan la oxidación de AKT y disminuyen su fosforilación por PP2A, pero no provocan la oxidación de PTEN o PP2A,

mientras que niveles mucho más altos de estrés oxidativo, oxidan y bloquean la actividad de PTEN y PP2A, promoviendo la fosforilación de AKT y activando la vía de supervivencia PI3K/AKT<sup>418</sup>.

Estos estudios proporcionan una visión mucho más completa de los efectos del estrés oxidativo en una vía de señalización, e indican que las diferencias en la sensibilidad de las proteínas de una misma vía de señalización a diferentes niveles de ROS, puede afectar diferencialmente a la fosforilación de estas proteínas, resultando en la activación o inhibición de la vía dependiendo del tipo de tratamiento o naturaleza de las ROS, de la intensidad del estrés oxidativo alcanzado con el tratamiento y del tipo celular utilizado en la investigación.

## 6.6. Regulación redox del ciclo celular

Existe una estrecha relación entre los procesos que controlan el estado redox celular y los procesos que controlan la progresión del ciclo celular<sup>419,420</sup>. Numerosos trabajos demuestran que las células en fase de crecimiento presentan un estado redox más reducido, mientras que las que no se dividen o están diferenciadas tienen un estado más oxidante. Además, se observan diferencias entre las distintas fases por las que transcurre la división celular, con niveles más oxidantes en G<sub>1</sub> y más reducidos en G<sub>2</sub>-M (figura 22)<sup>421,382,422</sup>. A lo largo de la fase G<sub>1</sub> se adquiere un estado prooxidante debido a la generación de ROS por el metabolismo celular, la interacción receptor-ligando de factores de crecimiento y otras fuentes exógenas. Este cambio transitorio del balance redox intracelular hacia un ambiente prooxidativo podría modificar el estado redox de proteínas reguladoras del ciclo celular que determinan el avance G<sub>1</sub>-S. Conforme se avanza por la fase S y G<sub>2</sub>-M el balance redox tiende hacia condiciones más reductoras, posiblemente porque así se disminuye la probabilidad de generar daño oxidativo en el material genético durante su duplicación en la fase S<sup>383</sup>. Una vez pasada la fase de síntesis, el potencial redox toma valores cada vez más negativos (reductores) hasta alcanzar un mínimo en la fase M, confirmando así que existe un ciclo redox vinculado fisiológicamente al ciclo de división celular.

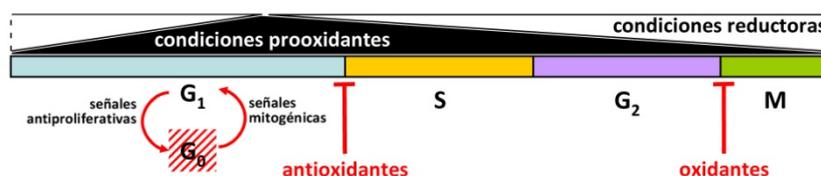


Figura 22: Representación esquemática del control redox del ciclo celular.

La transición G1-S parece el punto de regulación redox por excelencia durante el ciclo celular. Tras la estimulación mitogénica, las primeras ciclinas activadas en G1 son las de tipo D, que se asocian con las quinasas dependientes de ciclina Cdk4/6. Se ha descrito que las modificaciones redox de la propia ciclina D1 regulan sus niveles de expresión, ya que contiene dos sitios de fosforilación (Thr286 y Thr288) que controlan su degradación por el proteosoma<sup>423,424</sup>, y que podrían quedar expuestos a las quinasas correspondientes gracias a los cambios conformacionales provocados por la oxidación o reducción de un residuo de cisteína en la posición 285<sup>425</sup>. Como las ciclinas regulan positivamente las actividades de las Cdks, cabe esperar que los cambios redox en los niveles de la ciclina D1 afecten a Cdk4/6. Por otro lado, también se sabe que la región promotora del gen de la ciclina D1 presenta sitios de unión para factores de transcripción sensibles al estado redox celular como NF- $\kappa$ B o Sp1 (del inglés *specificity protein 1*)<sup>426</sup>.

Numerosos estudios apoyan la idea de que existe un umbral en los niveles de ROS que condiciona su función: concentraciones inferiores al umbral son estimuladoras del crecimiento, mientras que concentraciones superiores son deletéreas. Aún más, estos estudios también sugieren que podría haber un mecanismo de retroalimentación que une estrechamente a las proteínas reguladoras del ciclo celular y las enzimas con actividad antioxidante, contribuyendo al mantenimiento de unas condiciones redox idóneas para la proliferación.

Por tanto, debe haber un valor umbral de potencial redox intracelular, por debajo del cual algunas proteínas reguladoras del ciclo celular se encuentren fosforiladas, entre ellas pRB. La fosforilación de pRB permite la liberación del factor de transcripción E2F haciendo posible la expresión de genes requeridos para entrar en la fase S del ciclo celular, entre ellos los de la ciclina E. No se ha determinado aún si las ciclinas E, como las D, se ven afectadas por las fluctuaciones en el estado redox intracelular<sup>419</sup>.

En las fases G2 y M, la quinasa Cdk1 desempeña un papel fundamental permitiendo que la célula entre y progrese en la mitosis. Se ha demostrado que Cdk1 fosforila e inhibe la actividad de una tiorredoxina peroxidasa llamada peroxirredoxina I, provocando una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que parece ser necesaria para la transición de G2-M<sup>427</sup>.

Los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKIs), también parecen estar sujetos a una posible regulación redox. En células de fibroblastos embrionales de ratón NIH-3T3, dosis subletales de  $H_2O_2$  inducen su detención en G1 asociada con un incremento en la expresión de p21<sup>428</sup>. La sobreexpresión de p21 provoca senescencia en diversos tipos celulares, si bien este proceso puede inhibirse con antioxidantes<sup>429</sup>. Estos estudios sugieren que la expresión de p21 es sensible tanto a elementos antioxidantes como prooxidantes, lo que indica que el balance redox condiciona el mantenimiento de unos niveles apropiados de p21 durante el ciclo celular.

Cdc25 es una familia de fosfatasas con residuos de cisteína en sus sitios activos, que participan en la activación del complejo Ciclina A/B-Cdk1 y Ciclina E-Cdk2. Estudios *in vitro* con proteínas Cdc25 purificadas demuestran que su actividad enzimática requiere la presencia de un agente reductor como el ditioneitol (DTT)<sup>430</sup>. Dado el carácter reactivo intrínseco de las cisteínas y el hecho de que su forma oxidada sulfónica Cys-SOH es enzimáticamente inactiva, cabría pensar que los miembros de esta familia están regulados por el estado redox intracelular<sup>431</sup>. En células HeLa se ha comprobado que la exposición a  $H_2O_2$  altera la función de Cdc25C provocando la formación de un puente disulfuro en la proteína, induciendo su unión a las proteínas 14-3-3 y su posterior degradación<sup>432</sup>.

Todos estos resultados indican que las células pueden oponerse rápidamente a señales proliferativas mediante modificaciones redox, sin el retraso que implica la expresión de inhibidores del avance del ciclo celular. Restaurar la actividad de los reguladores del ciclo celular únicamente requiere la reducción de tioles específicamente oxidados a través de la activación de las defensas antioxidantes. Como resultado, la proliferación celular está estrechamente acoplada con el sistema redox celular, de tal manera que la división celular sólo tiene lugar bajo condiciones que aseguran una alta fidelidad en la replicación del ADN y la mitosis.

## 7. Caracterización y función de la endonucleasa G

### 7.1. Estructura de ENDOG

El trabajo presentado en esta tesis gira en torno a la endonucleasa G, siendo el centro que promueve y determina la investigación que será presentada. Por su importancia para el entendimiento de este estudio realizado, vamos a profundizar en este capítulo en aspectos relacionados con su estructura y función biológica.

La endonucleasa G (ENDOG) pertenece a la superfamilia de nucleasas no específicas con motivos  $\beta\beta\alpha$  de unión al metal que ha sido identificada en muchos organismos modelo como *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*, entre otros. Se trata de una proteína mitocondrial codificada por el genoma nuclear, que se traduce como un pro-péptido de 33 kDa con una señal de localización mitocondrial (MLS) en su extremo amino terminal y que es procesada posteriormente a una proteína madura de 26 kDa tras su translocación a la mitocondria<sup>433,434</sup>, localizada por algunos autores en el espacio intermembrana<sup>435</sup> y, por otros, en la membrana mitocondrial interna y la matriz mitocondrial<sup>436</sup>.

En 1995 el grupo de Gerschenson demostraba que la nucleasa conocida como ENDOG, observada en el núcleo de células de mamíferos, era la misma nucleasa que había sido descrita como la "ADNasa principal de la mitocondria" detectada en los años 60 en preparaciones de mitocondrias aisladas de hígado de rata<sup>437,438,439</sup>. Estas demostraciones están basadas tanto en la identidad de secuencia entre ambas, como en sus propiedades bioquímicas y en la especificidad a la hora de atacar una secuencia de nucleótidos<sup>440</sup>.

ENDOG recibe su nombre por su actividad nucleasa en secuencias  $(dG)_n.(dC)_n$  de ácidos nucleicos de cadena sencilla (ADNs y ARN) y de doble cadena (ADNs o híbridos ADN:ARN) en los que genera un corte, preferentemente en moléculas de simple cadena. Presenta un motivo DRGH que contiene diversos residuos importantes para la catálisis y entre los que destaca la histidina (His143), que se comporta como una base general activando una de las aguas que hidratan a un catión metálico situado en el centro activo, llevándose a cabo el ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo del ADN. Su actividad es por tanto dependiente de la presencia de ciertos cationes divalentes como el  $Mg^{+2}$ , el  $Mn^{+2}$  o el  $Co^{+2}$ , y se inhibe en presencia de cationes monovalentes como el  $K^+$  o el  $Na^+$ . El residuo de asparagina (Asn174) de su centro catalítico es importante para el proceso catalítico, mientras que los residuos de arginina

(Arg135, Arg141, Arg186) son importantes en la especificidad por una determinada secuencia de nucleótidos o en la unión a un sustrato<sup>441,442,443</sup>.

Aunque numerosos estudios bioquímicos han permitido conocer cómo actúa ENDOG sobre sus sustratos, todavía hoy se siguen estudiando las posibles funciones biológicas de esta nucleasa, que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, y de la que se ha investigado principalmente en el contexto de la muerte celular programada como una de las ejecutoras de la degradación del ADN genómico; sin embargo, cada vez más, surgen nuevos estudios que implican a ENDOG en funciones vitales para la célula, como son la proliferación celular, la recombinación del ADNn y ADNmit, así como la replicación y reparación del ADNmit.

## 7.2. Función biológica de ENDOG

### 7.2.1. En el proceso apoptótico

Los primeros estudios mostraron que ENDOG era capaz de inducir la fragmentación del ADN nucleosomal bajo un estímulo apoptótico mediante su translocación desde la mitocondria hasta el núcleo en fibroblastos de ratones nulos para la principal nucleasa apoptótica, CAD<sup>444</sup>. Resultados similares se observaron de forma independiente en mitocondrias aisladas de hígado de ratón<sup>445</sup> y en *C. elegans*<sup>446</sup>. Además, la persistencia de esta fragmentación inducida por radiación ultravioleta en fibroblastos de ratones deficientes en CAD tratados con un inhibidor de caspasas, sugirió que esta degradación genómica se producía por una vía que implicaba a ENDOG y en la que no participaban las caspasas<sup>444</sup>. Resultados posteriores confirmaron, o bien pusieron en duda, si la función apoptótica de ENDOG era caspasa dependiente o independiente. En las células humanas Hela el tratamiento con un estímulo proapoptótico junto con un inhibidor de caspasas impedía la liberación de ENDOG y de AIF de la mitocondria, indicando que dicha liberación también se podía producir de forma dependiente de caspasas<sup>447</sup>. Resultados de este mismo grupo también mostraron que tanto la liberación de ENDOG como de AIF al citosol era posterior a la liberación de citocromo C, Smac/Diablo y HtrA2/Omi. Según la interpretación de estos autores, la salida del citocromo C al citosol promovería la activación de las caspasas, y estas serían las responsables de la liberación de otros factores mitocondriales, entre ellos ENDOG<sup>447</sup>. A esto se sumó que en ratones el gen de *Endog* se encuentra solapado con otro gen de función desconocida, y cuando se elimina única y exclusivamente el gen de *Endog*, el ratón nulo generado se desarrolla hasta la edad adulta sin defectos obvios y sufre un

proceso normal de apoptosis en células del bazo (esplenocitos) y en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) ante una gran variedad de estímulos apoptóticos aplicados, indicando que el papel de ENDOG no es imprescindible en la apoptosis y en la embriogénesis<sup>448,436</sup>.

Los resultados obtenidos por nuestro grupo en esta última década arrojan luz sobre la función apoptótica de ENDOG y ayudan a interpretar los datos discordantes obtenidos por los diferentes grupos.

Los principales genes reguladores de la muerte celular dependiente de caspasas, así como las propias caspasas ejecutoras, se expresan en el corazón, cerebro e hígado embrionarios, pero se silencian durante el desarrollo postnatal, especialmente en el corazón y el cerebro<sup>449,450</sup>. Este hecho tiene importantes consecuencias para el correcto entendimiento del mecanismo implicado en la muerte celular de los cardiomiocitos y neuronas postmitóticas. La muerte de cardiomiocitos embrionarios inducida por un tratamiento con drogas citotóxicas (estaurosporina) o isquemia experimental implica la activación de caspasas y sigue un patrón morfológico apoptótico, mientras que los cardiomiocitos diferenciados postmitóticos siguen un proceso de muerte celular que es independiente de caspasas, adoptando una morfología no apoptótica que incluye la condensación nuclear<sup>451</sup>. Es la progresiva represión de la actividad de las caspasas la que permite explicar el cambio de una muerte celular dependiente de caspasas a otra independiente durante el desarrollo postnatal del corazón.

En cardiomiocitos neonatales de rata con un tratamiento de isquemia experimental, BNIP3 desencadena la salida de ENDOG de la mitocondria, que se libera junto al citocromo C y AIF, produciéndose la muerte celular independiente de caspasas del cardiomiocito<sup>452</sup>. ENDOG es el mayor responsable de la degradación del ADN en cardiomiocitos isquémicos, y tal y como indican los resultados de nuestro grupo, su expresión aumenta en el miocardio durante el desarrollo y diferenciación, contrariamente a lo que ocurre con las caspasas y la mayoría de genes apoptóticos cuya expresión decae progresivamente conforme transcurre el desarrollo del corazón<sup>449,451</sup>; de manera que, la fragmentación del ADN nucleosomal con un tratamiento de isquemia experimental o estaurosporina en cardiomiocitos embrionarios, se produce a través de un mecanismo dependiente de caspasas, mientras que en cardiomiocitos postmitóticos este mecanismo es independiente de caspasas, a través de ENDOG como principal nucleasa ejecutora del proceso apoptótico<sup>451,452</sup>.

La gran mayoría de los experimentos realizados que adjudican un mecanismo dependiente de caspasas a la acción apoptótica de ENDOG han sido realizados *in vitro*, y en todos ellos se han utilizado modelos celulares donde la degradación del ADN es dependiente de caspasas, cuando nuestros resultados indican que la actividad de ENDOG es solo relevante en la muerte celular que es caspasa independiente. Asimismo, el análisis de la apoptosis en ratones nulos para ENDOG se ha realizado en células del bazo (esplenocitos) y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) que expresan CAD y mueren por un mecanismo caspasa dependiente, enmascarando de este modo cualquier efecto debido a la falta de ENDOG. De hecho, los MEFs de ratones nulos para CAD que no sufren una degradación del ADN por la actividad de la caspasa 3, muestran una fragmentación que es caspasa independiente<sup>453</sup>.

### 7.2.2. En la proliferación celular

ENDOG también parece ser importante para la proliferación celular tanto en *C. elegans*, como en levaduras y células de mamíferos. En *C. elegans*, la disminución de los niveles del homólogo de ENDOG, CPS6, provoca un retraso en el crecimiento celular durante el desarrollo del nematodo<sup>446</sup>. Del mismo modo, la delección del homólogo de ENDOG, NUC1, en levaduras que crecen en medios fermentables sensibiliza a las células a la muerte celular por estímulos apoptóticos como el peróxido de hidrógeno, y conduce a una disminución significativa de la supervivencia celular incluso en ausencia de estos estímulos<sup>454</sup>. La falta de ENDOG provoca una reducción de la proliferación en levaduras que se caracteriza por una acumulación de células en la fase G2-M del ciclo celular<sup>454</sup>. También en células endoteliales humanas, células embrionarias (293T) y epiteliales (Vero) de riñón humano, la reducción de la expresión de ENDOG conduce a una disminución de la proliferación y a una acumulación de células en la fase G2-M del ciclo celular, pudiendo revertirse este fenotipo mediante la expresión exógena de ENDOG<sup>455,456</sup>; sin embargo, aún no se ha descrito cómo la función comprometida de ENDOG en estas células lleva al efecto fisiológico observado, el retraso en la proliferación celular, que para algunos de estos autores sugiere una acumulación de ADN dañado y una función de ENDOG en los procesos de recombinación, reparación y/o replicación del ADN, todavía no demostrados.

### 7.2.3. En la recombinación del ADNn y ADNmit

En cuanto a los trabajos acerca de la posible participación de ENDOG en el proceso de recombinación, destacan los realizados en levaduras<sup>457</sup> y en el hongo *Neurospora crassa*<sup>458</sup>, en los que se demuestra que ambas nucleasas presentan además de la actividad endonucleasa, una actividad 5' exonucleasa capaz de crear regiones de cadena sencilla requeridas para que se pueda producir la recombinación homóloga. La nucleasa ENDOG de mamíferos, por su parte, carece de esta actividad exonucleasa, y su papel en recombinación no está nada claro, si bien es cierto que existen ciertos trabajos que sugieren su participación en este proceso. Por un lado, se ha demostrado que ENDOG es la única enzima celular aislada de células Hela capaz de producir cortes de doble cadena en la secuencia de recombinación  $\alpha$  del virus herpes simple 1 (HSV-1), secuencia responsable de la inversión que se produce durante la replicación del ADN de este virus<sup>459</sup>; por otro lado, se ha demostrado que el silenciamiento de ENDOG en células humanas Vero resulta en una disminución en la secuencia de recombinación  $\alpha$  del virus herpes simple 1 (HSV-1), implicando directamente a ENDOG en este proceso<sup>455</sup>. Más recientemente, ENDOG ha sido identificado como una de las enzimas involucradas en el proceso de recombinación del cambio de clase de las inmunoglobulinas (CSR) en células B de ratón, mecanismo biológico que hace cambiar al anticuerpo de una clase a otra<sup>460</sup>. La acción de ENDOG para introducir cortes en el ADN de doble cadena (dsDNA) en las regiones de recombinación próximas a los genes C<sub>H</sub> es necesaria para un proceso CSR eficiente, ya que se ha demostrado que este proceso se reduce en células B de ratones nulos para ENDOG, y esta disminución no está relacionada con ningún cambio apoptótico en las células B<sup>460</sup>. También se ha identificado a la nucleasa ENDOG como una parte crítica de los reordenamientos en el gen de la leucemia mieloide/linfoide (MLL), que se producen para solucionar el bloqueo de las horquillas de replicación en sitios particularmente difíciles de evitar. Los reordenamientos en el gen MLL son frecuentes en la leucemia aguda infantil y se asocian con un mal pronóstico. Los mecanismos subyacentes que conducen a la formación de éstos son poco conocidos, pero se ha demostrado que la estructura secundaria formada permite el reconocimiento por parte de ENDOG, que introduce un corte para iniciar un proceso de reparación por recombinación en un intento de rescatar la horquilla estancada<sup>461</sup>.

La evidencia indirecta de la participación de ENDOG en la recombinación homóloga proviene de las observaciones de que la disminución o atenuación de la expresión de esta nucleasa da lugar a una eliminación casi completa de la poliploidía tanto en las levaduras como en las células de mamíferos<sup>456,462</sup>. La poliploidización se asocia con la inestabilidad genómica y se reconoce como un precursor de la aneuploidía en el cáncer<sup>462</sup>. La supervivencia en células poliploides es mucho más dependiente de la recombinación homóloga que en células diploides o haploides, como se ha demostrado mediante la identificación de los genes que intervienen en este proceso. Curiosamente, la delección de NUC1 en levadura disminuye la abundancia del fenotipo poliploide de un 20% en la población inicial en crecimiento a menos del 1%<sup>462</sup>. De manera similar, la eliminación de ENDOG, tanto en células endoteliales humanas como en líneas celulares de cáncer de colon humano, da lugar a la muerte específica de células tetraploides<sup>456</sup>. Estas observaciones indican que ENDOG participa en el mantenimiento del genoma por recombinación homóloga. Sin embargo, no hay suficientes estudios actualmente para tener una confirmación definitiva de su papel en este proceso.

#### 7.2.4. En la reparación del ADNmit

La primera evidencia de un papel de esta nucleasa en la reparación del ADNmit proviene de ensayos *in vitro*, en los que se muestra que ENDOG tiene una fuerte afinidad por sitios con daño oxidativo o sitios distorsionados por agentes reticulantes; de hecho, la susceptibilidad del ADN a los ataques nucleofílicos por ENDOG se mejora mucho después de un tratamiento con ácido L-ascórbico o peplomycin que introducen roturas monocatenarias en el sustrato a través de radicales del oxígeno<sup>463</sup>. En el caso de mamíferos, se ha observado que los niveles de ENDOG cuantificados en extractos mitocondriales *in vitro* varían hasta en más de 200 órdenes de magnitud entre distintos tejidos de rata, y su actividad específica parece correlacionar con la tasa de oxígeno consumido y, por lo tanto, la tasa de daño oxidativo del ADNmit<sup>464</sup>. En *Drosophila*, se ha descrito que la presencia de la mutación mus308 (que se corresponde con un defecto en ENDOG) implica una deficiencia, tanto en la reparación de determinados ADNs como en la actividad de la nucleasa *in vitro*<sup>465,466</sup>. También se ha descrito en *C. elegans*<sup>467</sup> y en humanos<sup>442</sup> la asociación entre ENDOG y FEN1, una endonucleasa específica de estructura que retira los extremos 5' generados durante los procesos de reparación, replicación y recombinación del ADN<sup>468</sup>. En *S.cerevisiae* se ha propuesto que NUC1 está

implicada en el procesamiento de los extremos de las moléculas de ADNmit y en condiciones de estrés oxidativo parece estar involucrada en la degradación selectiva de copias dañadas de ADNmit<sup>469</sup>. La eliminación de copias de ADNmit con daño oxidativo, junto con vías de reparación mitocondriales, puede representar un componente de la maquinaria que es responsable de la protección de la integridad del genoma mitocondrial; sin embargo, y aún considerando todos estos experimentos *in vitro*, los factores que prevendrían la acción de ENDOG sobre el ADN intacto no han sido identificados, ni los factores que podrían activarla en caso de daño oxidativo, por lo que su papel en reparación sigue estando en entredicho<sup>470</sup>.

### 7.2.5. En la replicación del ADNmit

Los estudios iniciales de la función de ENDOG apuntaron hacia un papel en la replicación del ADN mitocondrial (ADNmit) ya que era capaz de generar oligonucleótidos de ARN *in vitro* gracias a su actividad ARNasa H (actividad que permite degradar el ARN en los dímeros ADN:ARN), los cuales podrían ser utilizados por la ADN polimerasa durante la replicación del ADNmit<sup>433</sup>. En aquella época esta hipótesis generó cierta controversia, en parte porque ENDOG no se detectaba fácilmente en la matriz mitocondrial donde se produce la replicación del ADNmit y, además, porque su capacidad para comportarse como una ARNasa H era incierta, pues a pesar de que puede degradar el ARN en dímeros ADN:ARN, no presenta una alta especificidad por éste, cualidad típica de las ARNasas H<sup>435</sup>. A esto se sumó que los ratones nulos para ENDOG no mostraron defectos evidentes en el número de copias, tasa de mutación y estructura del ADNmit, lo que llevó a un rechazo parcial de esta teoría<sup>436</sup>; sin embargo, un estudio reciente publicado por nuestro grupo<sup>471</sup> ha restablecido el vínculo entre ENDOG y el metabolismo del ADNmit, demostrando que la expresión desregulada de ENDOG en ratones y, por ende, la disfunción mitocondrial, conduce a cambios fenotípicos en la masa ventricular izquierda del corazón, destapando así un papel de ENDOG en la hipertrofia cardiaca patológica.

La hipertrofia cardiaca independiente de la presión arterial, asociada a la disfunción mitocondrial y a la lipotoxicidad, es común en personas con enfermedades como obesidad y diabetes tipo 2, en las que múltiples factores y marcadores genéticos interactúan de manera compleja provocando una hipertrofia ventricular izquierda en el corazón. En el modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR), en la que la función mitocondrial está dañada y el corazón presenta una hipertrofia ventricular izquierda, la

proteína funcional de ENDOG está ausente debido a una inserción en el exón 1 del gen que codifica para esta nucleasa, implicando directamente a la pérdida de la función de ENDOG en el incremento de la masa ventricular izquierda (LVM) y el deterioro de la función cardíaca<sup>471</sup>.

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de ENDOG aumenta en el miocardio durante su desarrollo y diferenciación, encontrando niveles elevados en los corazones de rata y ratones adultos. *In vitro*, la disminución de la expresión de ENDOG en cardiomiocitos neonatales de rata produce un crecimiento de los mismos, un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como un aumento en la expresión de biomarcadores hipertróficos, si bien las vías de señalización prohipertróficas convencionales no se encuentran activadas. *In vivo*, el ratón nulo de ENDOG no presenta un fenotipo apoptótico, sin embargo, los cardiomiocitos son más grandes en ausencia de una estimulación hipertrófica, pese a no haber un incremento en el tamaño de los corazones deficientes en ENDOG. La producción de ROS es mayor en las mitocondrias aisladas de estos corazones, y la estimulación de la hipertrofia con angiotensina II a través de un mecanismo dependiente de ROS aumenta el tamaño de los cardiomiocitos y corazones deficientes en ENDOG, así como la expresión de biomarcadores hipertróficos<sup>471</sup>. Estos datos indican un efecto directo de la nucleasa ENDOG en el control del tamaño de los cardiomiocitos y sugieren un mecanismo a través de un estrés oxidativo persistente, quedando aún por confirmar si la asociación entre la falta ENDOG y la hipertrofia del cardiomiocito es dependiente de ROS, o bien si la producción de ROS es secundaria a la hipertrofia del miocardio.

Para determinar la posible función de ENDOG en el corazón, no descrita en ninguna publicación anterior, se realizó un análisis genómico utilizando una base de datos de expresión cardíaca humana. ENDOG aparece formando parte de una red altamente enriquecida en genes mitocondriales y genes implicados en procesos del metabolismo oxidativo. Los reguladores maestros de la biogénesis y la función mitocondrial, PGC1 $\alpha$  y ERR $\alpha$ , inducen directamente la expresión de ENDOG *in vitro* e *in vivo*, y la sobreexpresión de ENDOG aumenta la masa mitocondrial en las células humanas 293T y en la línea de cardiomiocitos H9C2, sin que se produzca una muerte apoptótica o necrótica en ellas. Estos resultados están en concordancia con la disminución en la masa mitocondrial y el número de copias de ADNmit observados en los corazones deficientes en ENDOG, no detectándose cambios morfológicos

importantes en las mitocondrias, pero sí un aumento en el número de vacuolas lipídicas que se manifiestan como una esteatosis miocárdica, no asociada con alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos<sup>471</sup>. Estos datos sugieren un papel de ENDOG en la regulación de la función mitocondrial en el miocardio, posiblemente modulando el mantenimiento del genoma mitocondrial a través de su unión directa a éste, en sincronía con las funciones previamente propuestas para ENDOG en la biología del ADNmit<sup>433</sup>.

En este punto de la introducción, ya es bien sabido que, la producción de energía en las células cardiacas depende de la respiración mitocondrial y que una situación de estrés oxidativo puede estar ligada a una disfunción/depleción mitocondrial. El conjunto de resultados publicados recientemente por nuestro grupo identifica la pérdida de la función de ENDOG como el determinante primario de la hipertrofia cardiaca que se asocia con la disfunción y la depleción mitocondrial, pero queda aún por establecer la señalización que controla o conduce al efecto fisiológico observado, el crecimiento anormal de los cardiomiocitos, en ausencia de ENDOG en el miocardio.

# Hipótesis y bjetivos

*La ciencia nunca resuelve un problema sin crear diez más*

*George Bernardshaw*



Pese a que ENDOG es la principal nucleasa ejecutora del proceso apoptótico independiente de caspasas en cardiomiocitos postmitóticos, resultados anteriores publicados por nuestro grupo indican que esta nucleasa mitocondrial realiza una función vital en el desarrollo del miocardio. En base a esto nuestra hipótesis de partida era que ENDOG desempeña un rol importante en la regulación de la proliferación y crecimiento celular en los cardiomiocitos durante el desarrollo del corazón, y conjeturamos que el mismo efecto podría tener lugar en otros tipos celulares.

Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

**Primero.** Determinar si el número y área de los cardiomiocitos presentes en los corazones de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> son diferentes y, en caso afirmativo, si los cambios en el área son simultáneos o posteriores al momento de finalización de la proliferación celular en el miocardio.

**Segundo.** Analizar los efectos de la expresión de ENDOG sobre la proliferación celular en diversos tipos celulares de roedores y humanos, incluyendo células tumorales.

**Tercero.** Determinar la implicación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en los efectos de ENDOG sobre la proliferación y el crecimiento celular, así como, en su caso, las vías de señalización implicadas en el fenotipo observado en los diferentes tipos celulares.

**Cuarto.** Estudiar el papel de ENDOG en el mantenimiento del genoma mitocondrial, concretamente en los procesos de reparación y replicación del ADNmit, así como analizar el efecto de la deficiencia de ENDOG en la proliferación de una línea celular que carece de ADNmit.

**Quinto.** Estudiar el papel de ENDOG en la expresión del genoma mitocondrial, y determinar los efectos de la falta de ENDOG sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y la función energética mitocondrial.



# Materiales



# Métodos

*El conocimiento no tiene valor a menos que  
se ponga en práctica*

*Anton Chekhov*



# 1. Animales de experimentación

Los métodos experimentales utilizados con los animales de laboratorio que se detallan a continuación se han regido siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- Ley 5/1995, del 21 de junio, de la Generalitat de Cataluña, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.
- Decreto 214/1997, del 30 de julio, que desarrolla la ley mencionada anteriormente.
- Real Decreto 1201/2005, del 10 de Octubre, sobre protección de los animales empleados para experimentación y otras finalidades científicas.
- Directiva ECC 63/2010, del 22 de septiembre, del Parlamento Europeo, sobre la protección de animales empleados para fines científicos.

Todos los procedimientos expuestos en los que se utilizaron ratones y ratas, se realizaron bajo supervisión del personal pertinente de nuestra institución, respetando todas las disposiciones legales y éticas vigentes. Además, el presente trabajo ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Lleida.

Los ratones y ratas fueron alojados en instalaciones de barrera, siguiendo procedimientos libre de patógenos en las salas de trabajo. Los animales se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, a una temperatura constante de 18-22°C, humedad del 30-70% y acceso *ad libitum* a agua y comida (Irradiado *Teklad Global* 14% Dieta proteínica de mantenimiento de roedores, Harlan).

En la mayor parte de los experimentos con animales se han utilizado ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> con fondo genético C57BL/6J, cuya colonia fue fundada por el Dr. Michael Lieber de la Universidad de California del Sur, LA, CA, EE.UU.

Las crías de rata utilizadas para el cultivo primario de cardiomiocitos neonatales proceden de ratas *Sprague-Dawley*, alojadas en salas convencionales.

Para los estudios de tumores subcutáneos o xenoinjertos se han utilizado ratones SCID (del inglés *Severe Combined Immunodeficiency*), que se caracterizan por la incapacidad de poder dar una respuesta inmune apropiada a causa de la abstinencia o defectuosidad de los linfocitos T y B, debido a una mutación recesiva en el cromosoma 16. A nivel funcional, esta mutación provoca que el sistema inmunológico no madure y estos ratones no puedan combatir infecciones, ni rechazar tumores o trasplantes.

## 2. Técnicas de biología celular

### 2.1. Cultivos Celulares

#### 2.1.1. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata

Los cardiomiocitos neonatales de rata se obtienen a partir de crías de rata *Sprague-Dawley* de entre 2 y 3 días de edad para obtener un buen rendimiento en el número de cardiomiocitos aislados. Se prepara el medio de cardiomiocitos el mismo día del cultivo (3/4 medio DMEM 1gr/L de glucosa #31885 + 1/4 medio EARLES M199 #31150 + 10% de serum de caballo (HS) + 5% de serum fetal bovino inactivado por calor (FBS<sub>hi</sub>) + 1 % L-Glutamina (GIBCO) + 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (P/S)), así como una solución salina glucosada tamponada (ADS 1X) a partir de una solución madre de ADS 10X. Se extraen los corazones de la manera más aséptica posible y se dejan en una placa petri modelo p100 con solución de ADS 1X fría. Se presionan los corazones suavemente para que expulsen la sangre del lumen y se transfieren a otra placa petri con nueva solución de ADS 1X fría. Bajo la lupa se les quita las aurículas para reducir la contaminación del cultivo con fibroblastos y musculatura lisa, y se limpian de vasos sanguíneos. Los ventrículos se pasan a una nueva placa petri con solución ADS 1X fría para hacerles de 8 a 10 cortes longitudinales, favoreciendo de esta manera el proceso de digestión. Se transfieren 4 corazones por tubo tipo eppendorf con 1 ml de solución de digestión precalentada (20 µl de colagenasa tipo II de Worthington (10U/ml) + 1 ml ADS 1X calentado a 37°C) y se incuban durante 15 min a 37°C con una agitación de 1100 rpm. El sobrenadante se transfiere a un tubo tipo falcon con 6-8 ml de medio de cardiomiocitos para neutralizar la colagenasa, y se centrifuga 3-5 min a 1000 rpm. Al tubo eppendorf anterior se le añade de nuevo 1 ml de solución de digestión, y se repite el proceso de digestión de tres a cuatro veces hasta asegurarnos que todo el tejido esté digerido. Se resuspende el pellet de cardiomiocitos de 8 corazones en 1 ml de medio que se siembra en una placa p100 con 8-10 ml de medio y se incuba durante 45 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Durante este tiempo los fibroblastos cardiacos y las células endoteliales quedarán enganchadas a la placa, mientras que los cardiomiocitos no se engancharán al no tener un sustrato al que adherirse. Mientras tanto se preparan las placas que se van a utilizar en el experimento con 0.2% de gelatina (tipo A, de piel de cerdo, Sigma). Transcurridos los 45 min se recoge el sobrenadante con los cardiomiocitos y se siembran en una nueva placa p100 con 8-10 ml de medio, y se incuba durante 45 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Se recoge el sobrenadante con los cardiomiocitos en un tubo tipo falcon y se centrifuga 5 min a

1000 rpm. El pellet se resuspende en 4 ml de medio de cardiomiocitos y se procede a contar el número de cardiomiocitos presentes, para lo cual se toman 25  $\mu$ l y se les añade 25  $\mu$ l de Trypan Blue que tiñe las células muertas, ajustando a un volumen final de 100  $\mu$ l con 50  $\mu$ l de ADS 1X. Según la finalidad del experimento y, por tanto, del tamaño de placa utilizado se siembra un determinado número de cardiomiocitos:  $0,75 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^6$  células por pocillo en una placa p35, 30.000 – 50.000 células por pocillo en una placa M4. Transcurridas las 3-4 horas, si las células están enganchadas se hacen 1-2 lavados con PBS 1X y se les añade medio nuevo. Este paso es muy importante para eliminar todas aquellas células que no sean cardiomiocitos, células sanguíneas y/o células muertas, que se quedarán enganchadas a éstos si no se hacen lavados poco tiempo después de haberlos sembrado. Se recomienda renovar cada día el medio de cardiomiocitos durante los días que se mantengan en cultivo.

### 2.1.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de ratón

Los cardiomiocitos neonatales de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se obtienen a partir de crías de entre 2 y 3 días de edad para obtener un buen rendimiento en el número de cardiomiocitos aislados. Se prepara el medio de cardiomiocitos el mismo día del cultivo (3/4 medio DMEM 1gr/L de glucosa #31885 + 1/4 medio EARLES M199 #31150 + 10% de serum de caballo (HS) + 5% de serum fetal bovino inactivado por calor (FBS<sub>hi</sub>) + 1 % L-Glutamina (GIBCO) + 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (P/S)), así como una solución salina glucosada tamponada (ADS 1X) a partir de una solución madre de ADS 10X. Se extraen rápidamente los corazones de la manera más aséptica posible y se dejan en una placa petri modelo p60 con solución de ADS 1X fría. Se presionan los corazones suavemente para que expulsen la sangre del lumen y se transfieren a otra placa petri con nueva solución de ADS 1X fría para hacerles de 5 a 8 cortes longitudinales, favoreciendo de esta manera el proceso de digestión. Se transfieren 8-12 corazones por tubo tipo eppendorf con 1 ml de solución de digestión precalentada (20  $\mu$ l de colagenasa tipo II de Worthington (10U/ml) + 1 ml ADS 1X calentado a 37°C) y se incuban durante 10 min a 37°C con una agitación de 1100 rpm. El sobrenadante se transfiere a un tubo tipo falcon con 6-8 ml de medio de cardiomiocitos para neutralizar la colagenasa, y se centrifuga 3-5 min a 1000 rpm. Al tubo eppendorf anterior se le añade de nuevo 1 ml de solución de digestión y se repite el proceso de digestión de dos a tres veces hasta asegurarnos que todo el tejido esté

digerido. Se resuspende el pellet de cardiomiocitos de 8-12 corazones en 1 ml de medio que se siembra en una placa p60 con 5 ml de medio y se incuba durante 45 min a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Durante este tiempo los fibroblastos cardiacos y las células endoteliales quedarán enganchadas a la placa, mientras que los cardiomiocitos no se engancharán al no tener un sustrato al que adherirse. Mientras tanto se preparan las placas que se van a utilizar en el experimento con 0.2% de gelatina (tipo A, de piel de cerdo, Sigma). Transcurridos los 45 min se recoge el sobrenadante con los cardiomiocitos en un tubo tipo falcon y se centrifuga 5 min a 1000 rpm. El pellet se resuspende en 2 ml de medio de cardiomiocitos y se procede a contar el número de cardiomiocitos presentes, para lo cual se toman 25 µl y se les añade 25 µl de Trypan Blue que tiñe las células muertas, ajustando a un volumen final de 100 µl con 50 µl de ADS 1X. Según la finalidad del experimento y, por tanto, del tamaño de placa utilizado se siembra un determinado número de cardiomiocitos: 20.000 – 50.000 células por pocillo en una placa M4. El rendimiento en corazones de ratón es muy bajo ya que se suele obtener unos 100.000 cardiomiocitos por corazón, mientras que en rata se obtiene 1.000.000 de cardiomiocitos por corazón. Transcurridas las 3-4 horas, si las células están enganchadas se hacen 1-2 lavados con PBS 1X y se les añade medio nuevo. Este paso es muy importante para eliminar todas aquellas células que no sean cardiomiocitos, células sanguíneas y/o células muertas, que se quedarán enganchadas a éstos si no se hacen lavados poco tiempo después de haberlos sembrado. Se recomienda renovar cada día el medio de cardiomiocitos durante los días que se mantengan en cultivo.

### 2.1.3. Cultivo primario y mantenimiento de fibroblastos dérmicos de ratón

El cultivo primario de fibroblastos dérmicos se hace a partir de crías de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> de entre 2 y 3 días para obtener un buen rendimiento en el número de fibroblastos aislados. Se limpia todo el material de cirugía con etanol al 70 % y se trabaja en las condiciones más asépticas posibles, con material autoclavado y siempre bajo llama antes de entrar en campana. Se limpia la zona de incisión en el ratón (piel de la espalda y la zona que está bajo el brazo) con etanol al 70%, se deja secar y se extraen los trozos de piel limpiándolos con PBS 1X (puede llevar antibiótico y fungizone) en una placa petri, y se hacen trozos más pequeños para favorecer las digestiones. Se transfieren a tubos tipo eppendorf que llevan 1 ml de buffer de digestión (1 ml de ADS 1X ó PBS 1X + 20 µl de colagenasa tipo II de Worthington

(10U/ml)) precalentado a 37°C, se incuban 45 min a 37°C, 1100 rpm. Tras la primera digestión, se transfiere todo el sobrenadante a un falcon con 6-8 ml de medio de fibroblastos (500 ml DMEM #41965 4,5 gr/l glucosa + 5% Piruvato Sódico 100mM (GIBCO) + 5% aminoácidos no esenciales 100x (GIBCO) + 15% de serum fetal bovino inactivado por calor (FBS<sub>hi</sub>) + 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (P/S)) para neutralizar la colagenasa. A los tubos eppendorfs anteriores, se les añade 1 ml de buffer de digestión y se repite el tratamiento de tres a cuatro veces hasta asegurarnos que todo el tejido esté digerido. Se centrifuga el falcon con el contenido de las sucesivas digestiones, y se resuspende el pellet de fibroblastos en 500 ul de medio de fibroblastos que se siembra en una placa p60 con 3 ml de medio de fibroblastos. Al día siguiente si la placa p60 no está confluyente, se hacen 2 lavados con PBS 1X y se renueva el medio. En el caso de que ya estuviera confluyente, se pasan las células a una placa p100 y se espera de 1-3 días hasta llegar a confluencia. Una vez los cultivos de fibroblastos están confluentes se deben dividir para el mantenimiento de las células *in vitro*. Para ello se retira el medio de cultivo y se hacen de uno a dos lavados con PBS 1X a 37°C, se añade 2 ml de tripsina por placa y se incuba durante 5 min a 37°C para que se desenganchen las células. Se añade 8 ml de medio completo para inactivar la tripsina, se recoge el sobrenadante con los fibroblastos y se centrifuga durante 4 min, 1100 rpm. El pellet de células se resuspende en medio fresco y se siembra en una proporción de 3 placas por cada placa p100 original.

#### **2.1.4. Cultivo primario y mantenimiento de MEFs**

Los MEFs (del inglés Mouse Embryonic Fibroblasts) se obtienen de embriones de ratón de 12,5 a 14,5 días *post coitum*. Se hace una laparotomía a la ratona madre y se extraen los embriones, dejándolos en una placa petri con PBS 1X. Los embriones se sacan del saco embrional, se limpian y se les elimina la cabeza (y si es posible el hígado), que puede utilizarse para obtener ARN ó ADN pero no para obtener MEFs. Cada embrión se transfiere a un tubo tipo eppendorf que lleva 1 ml de buffer de digestión (1 ml de ADS 1X ó PBS 1X + 20 ul de colagenasa tipo II de Worthington (10U/ml)), y se incuba 15 min a 37°C, 1100 rpm. Tras la primera digestión, se transfiere todo el sobrenadante a un falcon con 6-8 ml de medio de MEFs (500 ml DMEM #41965 4,5 gr/l glucosa + 5% Piruvato Sódico 100mM (GIBCO) + 5% aminoácidos no esenciales 100x (GIBCO) + 15% de serum fetal bovino inactivado por calor (FBS<sub>hi</sub>) + 1% de

antibiótico penicilina/estreptomicina (P/S)) para neutralizar la colagenasa. A los tubos eppendorfs anteriores se les añade 1ml de buffer de digestión y se repite el tratamiento de tres a cuatro veces hasta asegurarnos que todo el tejido esté digerido. Se centrifuga el falcon con el contenido de las sucesivas digestiones, y se resuspende el pellet en 500 ul de medio de MEFs y se siembra en una placa p60 con 3 ml de medio de MEFs. Al día siguiente si la placa p60 no está confluyente, se hacen 2 lavados con PBS 1X y se renueva el medio. En el caso de que ya estuviera confluyente, se pasan las células a una placa p100 y se espera de 1-3 días hasta llegar a confluencia. Una vez los cultivos de MEFs están confluentes se deben dividir para el mantenimiento de las células *in vitro*. Para ello se retira el medio de cultivo y se hacen de uno a dos lavados con PBS 1X a 37°C, se añade 2 ml de tripsina por placa y se incuba durante 5 min a 37°C para que se desenganchen las células. Se añade 8 ml de medio completo para inactivar la tripsina, se recoge el sobrenadante con los fibroblastos y se centrifuga durante 4 min, 1100 rpm. El pellet de células se resuspende en medio fresco y se siembra en una proporción de 3 placas por cada placa p100 original. Se puede dividir una placa p100 confluyente en varias y congelar las células a -80°C. Alrededor de la tercera o cuarta semana de mantenimiento los MEFs aparentemente dejan de proliferar, pero si se les sigue manteniendo y cambiando el medio consiguen superar esta crisis y comienzan a proliferar de forma exponencial (se puede forzar que este proceso ocurra antes manteniendo los MEFs en placas p60 confluentes a las que se sólo se les cambia el medio sin dividirlos, antes o después se dispara su proliferación y hay que sembrarlos en p100).

### **2.1.5. Mantenimiento de células Rat-2**

La línea celular Rat-2 son fibroblastos de rata obtenidos a partir de un subclón de una cepa resistente a la 5'-bromodesoxiuridina de fibroblastos de rata Rat-1 de tipo 3T3. Esta línea celular carece de niveles apreciables de la timidina quinasa nuclear y se transfecta fácilmente por ADN exógeno.

Las células Rat-2 crecen en medio DMEM #41965 (4,5 gr/l glucosa) suplementado con 10% FBS<sub>hi</sub>, 1mM de Piruvato Sódico (GIBCO), 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO) y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (P/S). El mantenimiento de esta línea se realiza dos veces por semana, realizando los siguientes pasos: se añade tripsina a la placa de mantenimiento con células Rat-2, se incuba de 1-2

minutos a 37°C hasta que las células están desenganchadas y, posteriormente, se recogen estas células con medio DMEM-10% FBS<sub>hi</sub> transfiriéndolas a un tubo estéril. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min, se elimina el medio y se resuspende el pellet de células en medio completo. Las células se siembran en nuevas placas p100 para su mantenimiento a una dilución 1:10.

### **2.1.6. Generación y mantenimiento de células Rat2-Rho(0)**

Las células en cultivo pueden crecer y multiplicarse en ausencia de ADN<sub>mit</sub>. Estas células se conocen como rho(0) y la carencia del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en ellas hace que sean dependientes de piruvato y uridina para su crecimiento, por tanto, para generar una línea estable a la que se le ha eliminado completamente el ADN<sub>mit</sub> el medio de cultivo debe contener bromuro de etidio (BrEt), uridina y piruvato (en el caso de las Rat-2 el medio ya se prepara con piruvato por lo que no hay que añadirle más). El proceso de depleción del ADN<sub>mit</sub> es largo y durante el primer mes se deben realizar 2 pases por semana de las células Rat-2 a las que se les quiere eliminar el ADN<sub>mit</sub>, a una dilución de 1:8-1:6 con un medio de cultivo que contiene 10 ng/ml de bromuro de etidio (BrEt) y 50 ug/ml de uridina. A partir del segundo mes se hacen de 1 a 2 pases por semana a una dilución 1:2 con un medio de cultivo que contiene 5 ng/ml de BrEt y 50 ug/ml de uridina, y cuando el crecimiento se haya estabilizado se debe cuantificar el número de copias de ADN<sub>mit</sub> presente en estas células para asegurarnos que se ha eliminado completamente el ADN<sub>mit</sub> en ellas.

### **2.1.7. Mantenimiento de células HEK293T**

La línea de células embrionarias de riñón humano, HEK293T, expresan el antígeno-T largo SV40 que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contienen la región promotora SV40.

Las células HEK293T crecen en medio DMEM #41965 (4,5 gr/l glucosa) suplementado con 10% FBS<sub>hi</sub>, 1mM de Piruvato Sódico (GIBCO), 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO) y 1% de antibiótico penicilina/estreptomina (P/S). El mantenimiento de esta línea se realiza dos veces por semana, realizando los siguientes pasos: se añade tripsina a la placa de mantenimiento con células HEK293T, se incuban de 1-2 minutos a 37°C hasta que las células están desenganchadas y, posteriormente, se recogen estas células con medio DMEM-10% FBS<sub>hi</sub> transfiriéndolas a un tubo estéril. Se

centrifuga a 1000 rpm durante 5 min, se elimina el medio y se resuspende el pellet de células en medio completo. Las células se siembran en nuevas placas p100 para su mantenimiento a una dilución 1:10.

### **2.1.8. Mantenimiento de células tumorales endometriales**

Las líneas celulares tumorales derivadas de un adenocarcinoma endometrial humano utilizadas en este trabajo son Ishikawa (IK), HEC-1A y MFE-296, obtenidas del *American Type Culture Collection*.

El medio utilizado para el cultivo de las células endometriales es el medio DMEM #41965 (4,5 gr/l glucosa) suplementado con 10% de FBS<sub>hi</sub>, 1 mM Piruvato Sódico (GIBCO), 1 mM HEPES (GIBCO) y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (P/S). El mantenimiento de estas líneas celulares se realiza dos veces por semana, realizando los siguientes pasos: se limpia previamente la placa de mantenimiento con PBS 1X y se añade la tripsina, se incuba de 2-5 minutos a 37°C hasta que las células están desenganchadas y, posteriormente, se recogen estas células con medio DMEM-10% FBS<sub>hi</sub> transfiriéndolas a un tubo estéril. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min, se elimina el medio y se resuspende el pellet de células en medio completo. Las células se siembran en nuevas placas p100 para su mantenimiento a una dilución 1:4 ó 1:10 dependiendo del tipo celular, ya que cada una tiene un tiempo de duplicación diferente.

## **2.2. Desarrollo de tumores subcutáneos en ratones SCID**

Para el estudio de la proliferación de los tumores subcutáneos o xenoinjertos *in vivo* se han utilizado ratones SCID hembra de aproximadamente 8-12 semanas de edad y un peso comprendido entre 20-25 gramos. Se inyectaron subcutáneamente  $10^6$  células de la línea celular Ishikawa (IK) para cada condición. El crecimiento tumoral se midió cada semana mediante un pie de rey digital y los animales se sacrificaron por dislocación cervical cuando el tumor adquirió un tamaño máximo de 2,5 cm<sup>3</sup>. El volumen tumoral se calculó de acuerdo con la fórmula TV (Volumen tumor):  $d^2 \times D / 2$ , donde la letra d equivale al diámetro más corto y la letra D al diámetro más largo.

Los cultivos celulares utilizados en este experimento *in vivo* eran negativos en la detección de la contaminación de micoplasma. Para la detección de este organismo se utilizó el MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Cambrex).

### 2.3. Producción de partículas lentivirales y transducción lentiviral

**Obtención de partículas lentivirales en HEK293T.** Para la introducción de material genético externo en las células utilizamos vectores víricos, lentivirus. Estos se han obtenido utilizando el método de transfección del ADN plasmídico con polietilenimina (PEI) en las células empaquetadoras HEK293T. El ADN cargado negativamente se unirá al polímero catiónico sintético y el complejo será entonces endocitado por las células. El protocolo de transfección es el siguiente:

- **Día 1.** El día de antes de la transfección se hace un recubrimiento de placas con gelatina 0.1% y se siembran las HEK293T para la transfección.
- **Día 2.** Se cambia el medio por 8 ml medio sin antibióticos ni suero fetal bovino. Se necesitan 40 µg de ADN para la transfección (Tabla 1), 200 µL PEI y 800 µL NaCl 150 mM (Sigma Aldrich) por placa.

Vector Lentiviral (RNAi o sobreexpresión)	20 µg
Sistema de empaquetamiento (psPAX2)	13 µg
Plásmido de la envoltura (pM2G)	7 µg

**Tabla 1.** Plásmidos utilizados para la transfección.

Primero se diluyen los 40 µg de ADN en NaCl 150 mM estéril (volumen final 1 mL) y se mezcla. Después se diluyen 200 µL PEI en 800 µL NaCl 150 mM estéril y se mezcla. Se añade la dilución de PEI en el tubo con el ADN (no al contrario), se vortea 1 min y se deja reposar la mezcla 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Por último se añade la mezcla a cada placa, gota a gota y se deja en el incubador. Pasadas 3 h se cambia el medio de transfección por medio completo de HEK293T.

- **Día 5.** Se recoge el sobrenadante de cada placa a las 72 h en tubos estériles de 50 mL y se centrifuga a 2500 rpm, 5 min. Después se filtra el sobrenadante con filtros de 0.45 µm y se centrifuga a 50000 g durante 3 h a 4°C. Finalmente se resuspende el pellet en 1% albúmina de suero bovino (BSA) diluido en PBS 1X (30 µL de 1% BSA/PBS por cada p100). Se guardan los virus alicuotados a -80°C. Los virus se titulan con células HEK293T añadiendo volúmenes crecientes del virus, y se establece la proporción del virus/células que da mayor eficiencia de transfección con menor toxicidad mediante la observación de las células que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en el microscopio de fluorescencia.

**Plásmidos utilizados para la obtención de lentivirus.** Los vectores plasmídicos utilizados se detallan en la tabla 2. Tras la transformación de bacterias *E.coli*, cepa DH5 $\alpha$ , con estos plásmidos mediante choque térmico, la extracción y purificación de los mismos se realiza siguiendo las instrucciones del kit *Plasmid Maxi* (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración del ADN plasmídico se determina con el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific).

PLÁSMIDO	VECTOR	SECUENCIA DIANA	CASA COMERCIAL
ENDOG SHRNA1	PLVTHM	5'-GGAACAACCTTGAGAAGTA-3'	Lab. Dr. Trono, Suiza
ENDOG SHRNA2	PLVTHM	5'-GCAGCTTGACTCGAACTTA-3'	Lab. Dr. Trono, Suiza
ENDOG SHRNA3	pLKO.1-puro	5'-GGAACAACCTGGAGATATA-3'	Sigma

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados para la obtención de lentivirus.

#### **Transducción lentiviral de líneas celulares y cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.**

Se siembran las células en placas de cultivo M4 ó p35 dependiendo del experimento, a una densidad de 50.000-150.000 células respectivamente, dejándolas 3-5 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> para que las células se adhieran correctamente a la placa de cultivo. A continuación se añade a cada placa un volumen entre 5-20  $\mu$ L de virus concentrado directamente al medio de cultivo y se deja ON. El medio se renueva al día siguiente y se mantienen las placas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante un tiempo de 48-72 h en función del experimento. La eficiencia de la transducción se monitoriza en el codificante para la GFP, debiendo ser el porcentaje de células positivas para GFP superior al 80% para poder proseguir con el experimento.

#### **2.4. Análisis de la proliferación celular**

Para determinar la tasa de proliferación celular *in vitro* se han realizado contajes celulares con la cámara de Neubauer en diferentes tipos celulares con una expresión de ENDOG ausente o reducida, y a los que en paralelo se les ha realizado un tratamiento con el agente reductor N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma-A7250). En este método es importante establecer el número de células en el momento inicial del crecimiento, así como el número de células presentes en el punto final del proceso proliferativo. Se siembra un número determinado de células en función del tiempo de duplicación de la línea celular con la que se trabaja, el tipo de placa donde serán sembradas estas células

y el tiempo que permanecerán en cultivo. Transcurridas 3-5 horas durante las cuales las células se engancharán al sustrato, se realiza el primer conteo que permite fijar el número de células de partida y corresponderá al tiempo inicial. Al cabo de 48-96 horas se cuentan el número de células presentes en ese tiempo final, expresándose la división celular como el número de ciclos completados según la fórmula  $\log_2(N^\circ\text{células tiempo final}/N^\circ\text{células tiempo inicial})$ .

## 2.5. Recuento de cardiomiocitos procedentes de tejido cardiaco

El protocolo para el recuento de cardiomiocitos neonatales procedentes de tejido cardiaco ha sido optimizado en nuestro laboratorio basándonos en los trabajos de *Shin*<sup>472</sup> *et al.* y *Tamura*<sup>473</sup> *et al.* El fundamento de este protocolo es digerir los tejidos con hidróxido de potasio (KOH), disgregándose las células individualmente y obteniéndolas en suspensión para poderlas contar.

Los corazones neonatales extraídos se limpian con PBS 1X y se fijan ON a 4°C con formol. Al día siguiente se retiran los corazones del agente fijador, se limpian bien con PBS 1X, se trocean y se ponen en KOH 12,5 M a 4°C ON. Pasada la incubación con KOH se retiran los trocitos disgregados, se limpian bien con PBS 1X y se colocan en un tubo con 3ml de PBS 1X que se vorteará durante 10 min. Después del vórtex, la solución se pasa por una malla de 250  $\mu\text{m}$  con la ayuda de una jeringa y se recupera la suspensión que la atraviesa. Ésta se centrifuga 5 min a 1000 rpm, el pellet se resuspende en PBS 1X y ya se pueden contar las células con la cámara de Neubauer. El número aproximado de cardiomiocitos que podemos obtener con este protocolo es de  $1 \cdot 10^6$  cardiomiocitos por corazón, según la literatura.

## 2.6. Replicación del ADNmit *in organello*

Las mitocondrias cardíacas de ratones adultos *Endog*<sup>-/-</sup> y *Endog*<sup>+/+</sup> se han aislado por centrifugación diferencial como se describe en los trabajos de *E.Fernández-Vizarra*<sup>268</sup> *et al.* y *E.González-Vioque*<sup>474</sup> *et al.* En resumen, se homogeniza tejido fresco de corazón en un tampón de aislamiento de mitocondrias frío (MIB, sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4) con un homogeneizador *Dounce* y se centrifuga a  $1.000 \times g$ , 4 °C durante 5 min. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga a  $9.000 \times g$ , 4°C durante 10 min para obtener el pellet mitocondrial. Para el etiquetado *in organello* del

ADN sintetizado *de novo* seguimos el protocolo descrito en el estudio de *McDermott-Roe*<sup>471</sup> *et al.* En resumen, el pellet mitocondrial se lava 3 veces con tampón MIB y una vez con un tampón de incubación (25 mM de sacarosa, 75 mM de sorbitol, 100 mM de KCl, 10 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 mM de EDTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4). Se resuspenden 250 ug de proteína de este pellet mitocondrial (Kit de Ensayo Coomassie Plus, Thermo Scientific, Rockford IL) en 1 mg/ml de tampón de incubación complementado con ADP 1 mM, glutamato 10 mM, malato 2.5 mM y 1 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos, así como con 1 uM de dATP, dCTP, dGTP y 1 uM de dTTP marcado radiactivamente ((metil-<sup>3</sup>H) dTTP), incubándose a 37°C en un agitador rotatorio durante 30 min. A continuación se sedimentan las mitocondrias mediante centrifugación a 13.000 x g durante 1 min, y se lavan dos veces con glicerol al 10%, 0.15 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM (pH 6.8) de Tris-HCl. Para la extracción del ADNmit, el pellet de mitocondrias se lisa con 500 ul de 20 mM de Hepes-NaOH, 75 mM de NaCl (pH 7.4), 50 mM de EDTA, 20 mg/ml de proteinasa K, incubándose a 4°C durante 45 min. A continuación, se añaden 17 µL de N-Lauroilsarcosina al 30% y la mezcla se incuba a 50°C durante 45 min más. Tras la clásica extracción de fenol:cloroformo:IAA, se vuelve a resuspender el ADNmit en tampón TE durante 12 horas a 4°C y se cuantifica (Reactivo de dsDNA Quant-iT PicoGreen, Invitrogen). El marcaje radiactivo incorporado en el ADN se mide por recuento de centelleo. La replicación de ADNmit *de novo* se cuantifica como los fmoles aparentes de nucleótidos marcados con <sup>3</sup>H por ng de ADN, calculados a partir de la radiactividad específica del nucleótido marcado radiactivamente que se ha utilizado. Los datos se representan como los valores de mitocondrias *Endog*<sup>-/-</sup> vs. *Endog*<sup>+/+</sup> obtenidos, procesados y cuantificados en paralelo. El significado estadístico de las diferencias se calcula utilizando la prueba SIGN no paramétrico para datos apareados (software SPSS).

## 2.7. Subfraccionamiento Celular

Para analizar la localización específica de una proteína dentro de la célula se ha realizado un subfraccionamiento celular, que consiste en la separación de los principales componentes de la célula, el núcleo y el citosol. De esta manera se puede obtener la proteína total de cada una de las fracciones celulares por separado y estudiar, por ejemplo mediante *western blot*, donde se encuentra la proteína que nos interesa. Esto es posible aplicando un protocolo, así como tampones de lisis y

extracción proteica específicos para cada fracción celular, que permiten enriquecer la fracción de interés.

En este trabajo los extractos proteicos de las diferentes fracciones subcelulares se han obtenido con el kit *Subcellular protein fractionation for cultured cells* (Thermo scientific), así como con el kit *Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation* (Sigma-Aldrich) para la extracción de núcleos con el detergente NP-40.

***Subcellular protein fractionation for cultured cells kit:*** En este procedimiento todos los tampones, muestras y extractos deben mantenerse en hielo, y tanto las incubaciones como las centrifugaciones deben realizarse a 4°C. Las células en cultivo son tripsinizadas y lavadas dos veces con PBS 1X frío. Tras una centrifugación a 2000 rpm durante 5 min, el sobrenadante es eliminado y el pellet se deja lo más seco posible. Según el tamaño del pellet se calcula el PCV (del inglés *packed cell volumen*) para determinar los volúmenes de los diferentes tampones que se van a utilizar, manteniendo siempre entre ellos la ratio que especifica la casa comercial. Antes de utilizar cada tampón se debe añadir inhibidores de proteasas a cada uno de ellos, diluyendo 100 veces la mezcla de inhibidores proporcionados por el kit en cada volumen de tampón requerido. El tampón CEB es el primero que se añade al pellet de células, se mezcla suavemente pipeteando y se incuba 10 min en agitación, tras lo cual se centrifuga a 2000 rpm, 5 min y el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5ml, siendo ésta la fracción citoplasmática. Al pellet restante se le añade el tampón MEB y se vortea 5 segundos a máxima velocidad, incubándose a continuación durante 10 min en agitación. A continuación se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml constituyendo la fracción de membranas. Al pellet se le añade el tampón MEB y se vortea 15 segundos a máxima velocidad, incubándose seguidamente durante 30 min en agitación. A continuación se centrifuga a 6000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml, siendo ésta la fracción nuclear soluble. Se añaden 5 ul de 100mM CaCl<sub>2</sub> y 3 ul de MNnasa al tampón NEB y se resuspende el pellet anterior con este tampón vorteaando 15 segundos a máxima velocidad. Posteriormente se incuba en el baño a 37°C durante 5 min y se vortea durante 15 segundos a máxima velocidad. Para finalizar se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min y el sobrenadante que corresponde a la fracción nuclear insoluble se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

***Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation kit:*** Para la extracción de núcleos utilizando el detergente NP-40 se ha utilizado este kit de la casa comercial Sigma-Aldrich. El protocolo siguiente es el que describe el distribuidor. Brevemente, se parte de aproximadamente  $1,5 \cdot 10^7$  células, que se centrifugan y a las cuales se añade el tampón de lisis (no se conoce la composición exacta, pero se sabe que contiene detergente NP-40). Después de una incubación de 5 min en hielo se centrifugan las células a 500 g y se elimina el sobrenadante que contiene el citoplasma. Al pellet que corresponde a la fracción nuclear se vuelve añadir el tampón de lisis, y tras la incubación de 5 min en hielo se centrifuga a 500 g. El pellet final se resuspende en el tampón de lisis de proteína y se cuantifica la muestra por el método de Lowry.

## 2.8. Inmunofluorescencia (IF)

Las células se siembran en placas de 4 pozos (M4, Nunc) a una densidad que depende del tipo celular. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se fijan las células con 4% de Paraformaldehído (PFA) durante 20 min. Las células fijadas se lavan con PBS 1X y se bloquean con solución de bloqueo (5% FBS, 5% BSA, 0.1% Triton X-100 en PBS 1X) durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente en agitación.

Después se incuba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente en agitación, y seguidamente se hacen 2 lavados de 5 min con la solución de bloqueo. A continuación, se incuba con el correspondiente anticuerpo secundario junto con las sales de bisbenzimidazolo Hoechst 33342 (1 µg/mL) diluido en solución de bloqueo, durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente en agitación. Finalmente se hacen 3 lavados con PBS 1X.

Como las muestras van a ser analizadas en el microscopio de fluorescencia, Olympus IX70 conectado a una cámara digital, se monta cada muestra con una gota de Vectashield y se cubre con un cubreobjetos. Se guardan cubiertas en papel de plata a 4°C, y al día siguiente ya se pueden hacer las fotos.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	APLICACIÓN
α-ACTININ	Sigma	A7811	1:500	IF
Mouse IgG Alexa Fluor 594	Molecular Probes	A11005	1:500	IF

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia (IF).

## 2.9. Inmunohistoquímica (IQ)

Los corazones extraídos de los corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, se fijan inmediatamente en formol durante 16h a 4°C. A continuación se colocan en *cassettes*, se deshidratan y se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 3  $\mu$ m del bloque de parafina, se dejan secar durante 1h en una estufa a 65°C, y se realiza un pretratamiento de desparafinación e hidratación del tejido. El siguiente paso permite recuperar y exponer antígenos enmascarados durante la preparación de la muestra (*antigen retrieval*), para ello se incuban los portaobjetos durante 20 min a 95°C en un tampón comercial de DAKO que contiene Tris/EDTA a pH 9 en un módulo de pretratamiento PTLINK (Dako). Por último, se bloquea la peroxidasa endógena de la muestra incubando los portaobjetos con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% para reducir el ruido de fondo que se obtiene con el cromógeno utilizado. Finalizado el pretratamiento y preparación de la muestra, se realizan tres lavados con PBS 1X y se aplica el anticuerpo primario durante 30 min a T<sup>a</sup> ambiente. Posteriormente, se realizan tres lavados con PBS 1X y se aplica el anticuerpo secundario. Si la señal es lo suficientemente fuerte, se emplea un anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa (HRP) y se incuba 30 min. En los casos en los que es necesario amplificar la señal, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con biotina durante 30 min y, finalmente se incuba la muestra 15 min con estreptavidina unida a la peroxidasa (HRP), todo a T<sup>a</sup> ambiente. Por último, se aplica el cromógeno deaminobenzimida (DAB, DAKO) para visualizar la reacción y se realiza una contratinción con hematoxilina para visualizar los núcleos de las células del tejido analizado. Para la cuantificación de núcleos positivos se fotografían 5 campos representativos de cada corazón, y se calcula el porcentaje de núcleos positivos respecto al número total de núcleos en cada campo. Se evalúan 1000-2000 núcleos por animal. Las imágenes se toman con un microscopio DMD 108 (Leica) y se cuantifican con el programa Image J (Wayne Rasband, NIH).

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	APLICACIÓN
KI-67	Dako	1:50	IQ
PCNA	Dako	1:50	IQ
OVEJA Ig-G HRP	Sigma	1:200	IQ
CONEJO ANTI-BIOTINA	Jackson	1:200	IQ
RATA ANTI-BIOTINA	Jackson	1:200	IQ
ESTREPTAVIDINA	Jackson	1:400	IQ

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica (IQ).

## 2.10. Citometría de flujo (CMF)

La distribución del ciclo celular se ha determinado mediante la adición celular de yoduro de propidio (PI). Es una molécula que se utiliza como marcador del contenido de ADN y ARN. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo, que a su vez es proporcional a la cantidad de ADN de la célula.

Las células se lavan con PBS 1X, se tripsinizan y se centrifugan 3 min a 200 g. El pellet se lava con PBS 1X frío, se resuspende en PBS 1X y se añade Etanol 100% (-20°C) para obtener una concentración final del 70%. Se invierten los tubos un par de veces y se vortean para asegurarnos de que se mezclen y fijen correctamente las células. Finalmente, se guardan las muestras a -20°C un mínimo de 30 min o hasta el día que se analicen en el CMF.

El día del análisis las muestras se lavan con PBS 1X frío dos veces, se centrifugan 5 min a 200 g 4°C y el pellet se resuspende en PI. Las muestras se incuban 30 min a 37°C en oscuridad. La distribución del ciclo celular se analiza usando el citómetro BD FACSCantoII (Becton Dickinson).

## 2.11. Análisis de la producción de ROS

La cuantificación de las especies reactivas del oxígeno se ha realizado a través de dos sondas fluorescentes, DHE y MitoSOX<sup>TM</sup>Red, cuya oxidación genera un producto proporcional a la cantidad de la especie reactiva analizada. Esta producción de ROS se ha medido en diferentes tipos celulares con una expresión de ENDOG ausente o reducida, y a los que en paralelo se les ha realizado un tratamiento con el agente reductor N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma-A7250).

**Sonda DHE:** los niveles citosólicos de la especie reactiva anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se han determinado empleando la sonda fluorescente DHE (Sigma D7008) a una concentración de 10  $\mu$ M preparada en DMSO, examinándose la fluorescencia por técnicas de citometría de flujo (excitación/emisión máxima aproximadamente a 488nm/630nm). Las células en cultivo son tripsinizadas, lavadas dos veces con PBS 1X y contadas manualmente con una cámara Neubauer. Se resuspende un número similar de células de cada población en PBS 1X, añadiéndose DHE a una concentración final de 10  $\mu$ M en cada suspensión celular. Las células desenganchadas se incuban con la sonda en tubos de tipo Falcón de 15 ml a 37°C, 5%  $CO_2$  durante 30 min protegidas de la luz. Después

de la incubación y tras varios lavados con PBS 1X, las células se resuspenden en 200  $\mu$ l de PBS 1X y se transfieren a tubos de poliestireno de fondo redondo (Becton Dickinson), determinándose la fluorescencia emitida mediante citometría de flujo.

**Sonda MitoSOX™Red:** los niveles mitocondriales de la especie reactiva anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se han determinado empleando la sonda fluorescente MitoSOX™Red (Invitrogen M36008) a una concentración de 2,5  $\mu$ M preparada en DMSO, examinándose la fluorescencia por técnicas de citometría de flujo (excitación/emisión máxima aproximadamente a 510nm/580nm). Las células en cultivo son tripsinizadas, lavadas dos veces con PBS 1X y contadas manualmente con una cámara Neubauer. Se resuspende un número similar de células de cada población en PBS 1X, añadiéndose MitoSOX™Red a una concentración final de 2,5  $\mu$ M en cada suspensión celular. Las células desenganchadas se incuban con la sonda en tubos de tipo Falcón de 15 ml a 37°C, 5%  $CO_2$  durante 10 min protegidas de la luz. Después de la incubación y tras varios lavados con PBS 1X, las células se resuspenden en 200  $\mu$ l de PBS 1X y se transfieren a tubos de poliestireno de fondo redondo (Becton Dickinson), determinándose la fluorescencia emitida mediante citometría de flujo.

## 2.12. Cuantificación de los niveles intracelulares de GSH

La sonda fluorescente ThiolTracker™ Violet (Molecular Probes) es altamente reactiva con los grupos tioles reducidos, y dado que el glutatión reducido (GSH) representa la mayoría de los tioles libres intracelulares en células de mamíferos, su fluorescencia corresponde a la concentración intracelular de GSH (Ex/Em=404/526 nm). La disminución del ratio GSH/GSSG conduce a una situación de estrés oxidativo celular, asociada típicamente a una reducción en el contenido del GSH intracelular, de modo que esta sonda puede servir como un indicador del estado redox general. El protocolo siguiente es el que describe el distribuidor. En resumen, las células se siembran en placas de 96 pocillos y se lavan dos veces con DPBS (Invitrogen) que contiene calcio y magnesio. A continuación se añade la sonda ThiolTracker™ Violet preparada en DPBS a una concentración final de 20  $\mu$ M y se incuban las células a 37°C, 5%  $CO_2$  durante 30 min. Se hacen dos lavados con DPBS para eliminar la sonda y se añade 100  $\mu$ l de medio normal por pocillo para comenzar las lecturas.

## 3. Técnicas de biología molecular y bioquímica

### 3.1. Extracción de ARN, síntesis de cADN y PCR en tiempo real (qPCR)

#### 3.1.1. Extracción de ARN

##### 3.1.1.1. De cultivos celulares

La extracción de ARN total a partir de cultivos celulares se ha hecho siguiendo las instrucciones del manual del kit *RNeasy Mini* (QIAGEN).

##### 3.1.1.2. De Tejidos

Para la extracción de ARN total a partir de tejidos, los corazones se cortan en trozos pequeños de tamaño similar. A un trozo se le añade 1 ml de trizol y se politrona hasta homogenizarlo. Se centrifuga 10 min, 12.000 rpm a 4°C y el sobrenadante se incuba durante 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Se añade 200 ul de cloroformo, se mezcla 15 sec vigorosamente y se incuba 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Se centrifuga 15 min, 14.000 rpm a 4°C y la fase acuosa pasa a otro tubo eppendorf al que se le añade 500 ul de isopropanol para precipitar el ARN. Se vortea e incuba 10 min a T<sup>a</sup> ambiente, y se centrifuga 10min, 14.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se decanta y se limpia el pellet de ARN con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifuga 5min, 10.000 rpm a 4°C y se elimina el sobrenadante, dejando secar el pellet 10 min a T<sup>a</sup> ambiente. Finalmente se resuspende el ARN con 30-50 ul de agua libre de RNAasas.

Una vez terminada la extracción, el ARN se cuantifica en el Nanodrop (ND-1000 UV/Vis Spectofotometer, de Nanodrop Technologies), y se comprueba en un gel de agarosa al 1% que no esté degradado.

#### 3.1.2. Síntesis de cADN

La reacción de transcripción inversa (RT-PCR) para la obtención del ADN complementario (cADN) se realiza según el protocolo de la enzima retrotranscriptasa de *Taqman* (*Appliedbiosystems*) a partir de 1ug de ARN. La reacción contiene dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, hexámeros, inhibidores de RNasas y la retrotranscriptasa en las proporciones indicadas por el distribuidor, y se realiza en un termociclador siguiendo este protocolo:

<b>25 °C</b>	<b>42 °C</b>	<b>95 °C</b>	<b>4°C</b>
10 min	60 min	5 min	∞

El producto final de la reacción se puede utilizar para una PCR convencional, ó para una PCR en tiempo real.

### 3.1.3. PCR en tiempo real (qPCR)

La técnica de PCR en tiempo real (qPCR) utiliza una sonda específica para analizar la expresión relativa de ARNm de cada gen que se estudia. Esta sonda está marcada con un fluorocromo, FAM<sup>TM</sup>, que el termociclador *CFX96<sup>TM</sup>* de BioRad detecta y cuantifica. Tanto las sondas como la mix de la reacción, Taqman PCR Mastermix Universal, son de Applied Biosystems, y se utilizan en las proporciones indicadas por el fabricante.

El programa utilizado es el siguiente:

x 40 Ciclos			
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
2 min	10 min	15 sec	1 min

Los genes analizados y la referencia de cada sonda se encuentran en la tabla:

GEN	Nº DE CATÁLOGO
<i>ACTC1</i>	Mm01333821_m1
<i>NPPA</i>	Mm01255747_g1
<i>MYH6</i>	Mm00440359_m1
<i>POLD1</i>	Mm00448253_m1

**Tabla 5.** Ensayos TaqMan para la PCR en tiempo real.

## 3.2. Cuantificación del número de copias de ADNmit por mitocondrial

### 3.2.1. Extracción del ADN genómico

El ADN genómico extraído debe ser de buena calidad y no excesivamente fragmentado. Es importante no utilizar un protocolo de extracción que incluya agentes que puedan oxidar al ADN, como por ejemplo el fenol, ampliamente utilizado en este proceso. Por estas consideraciones se utiliza el kit comercial de extracción de ADN *Olamp DNA Mini Kit* (QiAGEN), siendo el protocolo para la extracción el recomendado

por el fabricante. Se utilizan aproximadamente dos millones de células, se tripsinizan y se lavan dos veces con PBS 1X, dejándose secar el pellet después del segundo lavado. El pellet se resuspende con 200  $\mu$ L de PBS 1X y se traspasa a un tubo Eppendorf. Se añade 20  $\mu$ L de proteinasa K y se agita suavemente. A continuación se añade 200  $\mu$ L de tampón AL (previamente agitado). Se incuba 10 min a 56°C y se hace un spin. Se añade 200  $\mu$ L de etanol 100% y se mezcla durante 15 segundos. Se vuelve a hacer un spin. El contenido del tubo se pasa a una columna proporcionada por el kit y se centrifuga a 8000 rpm durante 1'30 min a Tª ambiente. Se pone la columna en un tubo nuevo y se descarta el tubo con el eluído. Se añade 500  $\mu$ L del tampón AW1 en el centro de la columna y se vuelve a centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Se descarta el eluído y se coloca la columna en un tubo nuevo. Se añade 500  $\mu$ L del tampón AW2 en el centro de la columna y se centrifuga a 14000 rpm durante 3 min. Si quedan restos de tampón AW2 se puede volver a centrifugar a 14000 rpm durante 1 min. Se coloca la columna en un tubo eppendorf rotulado y se añade a la columna 100  $\mu$ L de agua destilada. Se incuba a Tª ambiente de 1 a 5 min y se centrifugan a 8000 rpm, 1 min. Se recoge el eluído en un tubo eppendorf nuevo y se conserva a 4°C, cuantificando su concentración con el nanodrop antes de congelarlo. Es muy importante cuantificar correctamente el ADN extraído. Para ello se realiza una primera determinación del ADN en la que se preparan diferentes alícuotas a una concentración final de 50 ng/ $\mu$ L. Posteriormente se vuelve a leer la concentración de ADN de estas alícuotas, y este resultado es el que se utiliza para calcular la cantidad de ADN que se pone en la PCR semicuantitativa.

### 3.2.2. PCR en tiempo real (qPCR)

Con la técnica de PCR en tiempo Real se determina el número de copias de 2 genes mitocondriales, ND4, en la zona de la delección común, y 16S, en la zona que generalmente no se deleciona, así como el gen nuclear de copia única angiogenina 1, ANG1. El número de copias de las muestras se calculan por extrapolación en curvas de calibración preparadas con muestras estándar de las cuales conocemos el número de copias. El ratio ND4/16S nos permitirá determinar si hay delección. El ratio 16S/ANG1 nos permitirá determinar si hay depleción.

### 3.2.2.1. Cebadores y sondas utilizados

#### **16S**

16S Fw: 5' AATGGTTCG TTT GTT CAA CGA TT 3'

16S Rv: 5' AGA AAC CGA CCT GGA TTG CTC 3'

16S SONDA: FAM-5' AAG TCC TAC GTG ATC TGA GTT 3'-MGB

#### **ND4**

ND4 Fw: 5' TGCATCAATCATAATCCAAACTCCATGA 3'

ND4 Rv: 5' GGCAGAATAGGAGTGATGATGTGA 3'

ND4 SONDA: FAM-5' CCGACATCATTACCGGGTTTTCTCTTG 3'- MGB

**ANG1** Inventoried Assay Life Technologies: Mm00833184\_s1

### 3.2.2.2. Preparación del stock de las muestras estándar

Para preparar los stocks de las muestras estándar utilizamos un fragmento de tres genes clonados en sendos plásmidos pCR4-TOPO; Genes mitocondriales: **16S** (fragmento 2469 - 2542) y **ND4** (fragmento 11060 -11151). Gen nuclear: **ANG1**

**16S** Plásmido 33 ng/uL dil 1/20 = Sol A  
Sol A dil 1/20 = STD1 (11 070 000 copias/uL)  
Hacer alíquotas de 10 uL y congelar a -20°C

**ND4** Plásmido 51 ng/uL dil 1/20 = Sol A  
Sol A dil 1/20 = Sol B  
Sol B dil 1/4 = STD1 (3.5x10<sup>6</sup> copias/uL)  
Hacer alíquotas de 30 uL y congelar a -20°C

**ANG1** Plásmido 39 ng/uL dil 1/50 = Sol A  
Sol A dil 1/50 = Sol B  
Sol B dil 1/50 =STD1 (108 000 copias/uL)  
Hacer alíquotas de 25 uL y congelar a -20°C

Todas las diluciones se hacen con Tris 10 mM pH8.

	ANG1	Nº COPIAS/uL
STD1		108.000
STD2 (STD1 dil 1/6)	5 uL STD1 + 25 uL Tris	18.000
STD3 (STD2 dil 1/6)	5 uL STD2 + 25 uL Tris	3.000
STD4 (STD3 dil 1/6)	5 uL STD3 + 25 uL Tris	500
STD5 (STD4 dil 1/6)	9 uL STD4 + 9 uL Tris	250

	ND4	Nº COPIAS/uL
STD1		3.500.000
STD2 (STD1 dil 1/3)	9 uL STD1 + 18 uL Tris	1.166.667
STD3 (STD2 dil 1/3)	9 uL STD2 + 18 uL Tris	388.889
STD4 (STD3 dil 1/3)	9 uL STD3 + 18 uL Tris	129.630

	16S	Nº COPIAS/uL
STD1		1.070.000 (No se pone en la placa)
STD2	9 uL STD1 + 18 uL Tris (dil 1/3)	3.690.000
STD3	9 uL STD2 + 18 uL Tris (dil 1/3)	1.230.000
STD4	9 uL STD3 + 18 uL Tris (dil 1/3)	410.000
STD5	9 uL STD4 + 18 uL Tris (dil 1/3)	136.670
STD6	9 uL STD5 + 18 uL Tris (dil 1/3)	45.555

**Tabla 6.** Diluciones de las muestras estándar.

### 3.2.2.3. Procesamiento del ADN

La primera vez que se procesa una muestra se debe poner triplicados de dos diluciones diferentes. Si el ADN se ha extraído con el Kit de QIAGEN se ha de diluir como mínimo 10 veces para que los resultados sean fiables. El ADN se deja en hielo hasta el momento de montar la placa. Las diluciones se pueden preparar el día anterior y guardarlas a 4°C. Se debe utilizar duplicados de ADN de ratón C57BL6 como control. Debe dar una deleción alrededor de 1 y una depleción alrededor de 500 cop/ul.

Se va a hacer una reacción *singleplex* en la que los 3 genes se ensayan por separado, en pocillos diferentes y, por tanto, se tiene que preparar un mix para cada sonda/ensayo.

		PARA 1 REACCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL
ANG1 ND4	MASTER MIX 2X	10 uL	1X
	ASSAY	1 uL	PRIMER 900 nM, SONDA 250 nM
	H <sub>2</sub> O	4 uL	HASTA 20 uL
	DNA	5 uL	
16S	MASTER MIX 2X	10 uL	1X
	PRIMER 16S F 10 uM	0,6 uL	300 nM
	PRIMER 16S R 10 uM	0,6 uL	300 nM
	SONDA 5uM	0,6 uL	150 nM
	H <sub>2</sub> O	3,2 uL	HASTA 20 uL
	DNA	5 uL	

**Tabla 7.** Condiciones de PCR para los genes mitocondriales 16S y ND4, y el nuclear ANG1.

#### 3.2.2.4. Preparación de la placa

Hay 2 formatos de placa, siendo las cantidades indicadas para preparar las muestras estándar y el ADN para placas de 96 pocillos. En el caso de utilizar placas de 384 pocillos se debe preparar la mitad de los volúmenes indicados. Se prepara el mix para cada ensayo, y a la hora de montar la placa primero se pone el mix y luego el ADN. Se sella la placa con la lámina adhesiva, se hace un spin de 5" a menos de 1500 g en la centrífuga y se procesa en la máquina de real time (placas de 96 al modelo 7500, placas 384 al modelo 7900).

### 3.3. CRISPR/Cas9 como herramienta de modificación génica

En el año 1987 se descubre la existencia de un grupo de secuencias repetidas de 29 nucleótidos, separadas por 32 nucleótidos, dentro de un fragmento de ADN que codifica para el gen *iap* procedente de una cepa del microorganismo *Escherichia coli*<sup>475</sup>. A finales de los años 90, se descubre la presencia generalizada de dichas secuencias tanto en bacterias como en arqueas, ya denominadas con el nombre de secuencias interesparadas repetidas en tándem o LTRR, que más tarde pasan a llamarse con el acrónimo CRISPR (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Simultáneamente se identifican cuatro genes *Cas* (del inglés *CRISPR-associated*), localizados en regiones contiguas al locus de CRISPR, proponiéndose que su funcionalidad debe ir ligada a la de CRISPR<sup>476</sup>. En 2005 se descubre que las secuencias espaciadoras son homólogas a secuencias pertenecientes a ADN vírico, de

cromosomas y de plásmidos que no son transmisibles<sup>477,478</sup>. Estas observaciones permiten hipotetizar que CRISPR debe actuar como un sistema de defensa adaptativo, propio de microorganismos contra elementos de ADN invasor, siendo su mecanismo de actuación similar al del ARN de interferencia existente en eucariotas.

Es a partir del año 2011 cuando se empieza a explorar la posible aplicación en ingeniería genómica del sistema CRISPR/Cas. Para entonces, ya se conocían los componentes fundamentales del sistema CRISPR y se pensaba en la manera de reconvertirlo en un sistema nucleasa que pudiera editar genomas guiado por un ARN guía. Mediante la caracterización bioquímica de Cas9, se constató que la enzima purificada podía ser guiada por un fragmento de ARN formado por la secuencia de un espaciador y una repetición (*crRNA*), para generar un corte en su correspondiente ADN diana y, no sólo esto, sino que fusionando las dos estructuras de ARN del sistema en una construcción denominada como *sgRNA* (del inglés *single guide RNA*) el corte del ADN diana *in vitro* se veía facilitado<sup>479,480</sup>. Finalmente, diferentes grupos consiguen en el año 2013, editar el genoma de células de mamíferos mediante la generación de mecanismos de reparación denominados de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación directa por homología (HDR), a través de la expresión heteróloga de Cas9 y *sgRNA* que dirigen a la proteína hacia su diana de corte<sup>481,482</sup>.

A partir de ese año y hasta la actualidad, la noción básica del funcionamiento natural del sistema CRISPR/Cas ha permitido el uso de este sistema como herramienta de modificación genética. Es la proteína Cas9 la encargada de realizar el corte en las hebras de ADN bicatenario (DSB) en la región diana. Una vez producido este corte, la maquinaria celular de reparación del daño en el ADN se pone en marcha. Dicho mecanismo de reparación está presente de forma natural en la gran mayoría de tipos celulares y organismos, y puede seguir dos vías de reparación, la de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la vía de reparación directa por homología (HDR), según se encuentre o no un molde. Mediante la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ), los dos fragmentos bicatenarios de ADN generados son religados, produciéndose por ello modificaciones en forma de inserciones o deleciones que, si se producen en el exón diana, pueden acabar generando un *knock-out* (KO) por cambios en la pauta de lectura o por la aparición de codones de parada prematuros. Por otro lado, si se introduce un molde de reparación de forma exógena, se activa la maquinaria de reparación de daño vía HDR. Esta vía implica la recombinación entre el ADN diana que ha sufrido el corte y

el molde de reparación, que puede ser un constructo de ADN bicatenario o un oligonucleótido de ADN monocatenario, en ambos casos con sendas secuencias de homología con el ADN diana flanqueando la secuencia de inserción. Este mecanismo es capaz de producir cualquier tipo de mutación deseada mediante el reemplazo de la secuencia diana por el molde de reparación sintetizado por el investigador con las alteraciones oportunas<sup>483,484</sup>.

El sistema de modificación genética CRISPR/Cas9 se ha utilizado en nuestro laboratorio con el fin de realizar un *Knock-in* (KI) en el locus de *Endog* en la línea celular HEK293T mediante el mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Varios trabajos describen como mediante el uso del sistema CRISPR/Cas se puede generar con relativa facilidad un *knock-out* (KO) de un gen determinado, mediante la reparación no homóloga del DSB generado por la nucleasa Cas9. Este sistema no permite realizar una selección de las células que han sufrido la mutación, ya que solo produce la pérdida de expresión del gen diana, haciendo más complejo el aislamiento del clon o clones transfectado/s del resto de células no transfectadas. Por ello nos planteamos utilizar el sistema de reparación por recombinación homóloga (HDR) como estrategia para generar un KI de un gen de selección, el gen de resistencia a la puromicina, que será introducido en el gen diana *Endog*. De esta forma se consigue la pérdida de expresión de nuestro gen de interés y, además, mediante la adición de puromicina al medio de cultivo se pueden seleccionar las células transformadas, facilitando así el estudio de las líneas mutantes generadas. El protocolo que se ha seguido para conseguir esto es que el se describe a continuación.

### 3.3.1. Diseño de los *sgRNAs*

Para el diseño de los *sgRNAs* se debe realizar una búsqueda bioinformática en la base de datos genómicos on-line *Ensembl* que permita obtener la secuencia deseada de nuestro gen, es decir, la secuencia del extremo 5'UTR, el primer exón y parte del primer intrón. Una vez se dispone de esta información, se deben buscar entorno a la zona deseada, posibles secuencias conservadas PAM (motivo adyacente al protoespaciador) que facilitan el reconocimiento por el sistema de defensa y son requisito para poder diseñar los *sgRNAs*. Éstos consisten en los 20 nucleótidos adyacentes en 5' a la secuencia PAM que serán sintetizados artificialmente en forma de oligonucleótidos.

```

sgRNA-EndoG1
Target : CCGGCCATGCGGGCGCTGCGGGC
Rev: GCCCGCAGCGCCCGCATGGCCGG
sgRNA-EndoG1 fwd: CACCGCCCGCAGCGCCCGCATGGC
sgRNA-EndoG1 rev: AAACGCCATGCGGGCGCTGCGGGC

sgRNA-EndoG2
Target : GCCATGCGGGCGCTGCGGGCCGG
Rev: CCGGCCCGCAGCGCCCGCATGGC
sgRNA-EndoG2 fwd: CACCGCCATGCGGGCGCTGCGGGC
sgRNA-EndoG2 rev: AAACGCCCGCAGCGCCCGCATGGC

```

**Figura 1.** Cebadores diseñados para la realización del clonaje de las secuencias específicas de genoma de los *sgRNAs* en el vector PX458.

### 3.3.2. Clonaje de los *sgRNAs*

Las secuencias de los *sgRNAs* anteriormente diseñadas deben clonarse en un vector plasmídico, con el que posteriormente transfectaremos nuestras líneas celulares de interés. En este caso, se elige el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (addgene #48138). El *sgRNA* debe ligarse a un *sgRNA scaffold* presente en este plásmido que se encuentra bajo el control del promotor U6. *Upstream* de esta secuencia, hay una diana de restricción para la enzima BbsI que nos servirá para ligar los oligos diseñados de las secuencias *sgRNAs* específicas de genoma. Para ello, a las secuencias diseñadas por nosotros como *sgRNAs* debemos incorporarles la hemidiana de dicha enzima para poder clonarlos correctamente en el vector; además, el vector PX458 también tiene bajo el control del promotor CBh el gen de la *hSpCa9* y de la EGFP, por lo que a su vez nos valdrá para introducir en la célula el segundo componente necesario para el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas, el gen *hSpCas9*, que codifica para la proteína humanizada Cas9 de *S.pyogenes*, así como el gen EGFP, que nos servirá como marcador de una buena transfección del plásmido.

De este modo, para cada *sgRNA* se debe llevar a cabo la hibridación de los dos cebadores que dará como resultado la futura secuencia guía del *sgRNA*, es decir, un oligonucleótido de doble cadena con extremos cohesivos para la enzima BbsI. Para ello, los cebadores se disuelven en un tampón de PCR y se desnaturalizan 5 min a 95°C, dejando que se enfríen a Tª ambiente. A continuación, se digiere 1 mg de vector con la enzima BbsI. Una vez digerido, el ADN se resuelve en un gel de agarosa, procediéndose al corte y purificación de la banda correspondiente al vector digerido, que será ligado

posteriormente con el inserto. Finalmente, se transforman bacterias competentes *E.Coli DH5α* mediante choque térmico con el producto de la ligación anterior.

### 3.3.3. Cribado de colonias recombinantes

Se debe realizar un cribado de colonias recombinantes, y así asegurarnos de que las colonias obtenidas se han transformado con el plásmido que lleva el inserto integrado correctamente. Para ello, no se puede realizar una PCR convencional con cebadores que flanquean la zona de inserción, puesto que la diferencia de nucleótidos entre la banda obtenida para el plásmido vacío y la banda obtenida para el plásmido que ha integrado el *sgRNA* es tan pequeña que no se puede apreciar al correr los productos de PCR en un gel de agarosa. Por ello, se lleva a cabo una digestión de los plásmidos con las enzimas FpsI y BbsI, ya que cuando se clonan los *sgRNAs* en el plásmido PX458, se está a la vez eliminando una de las dos dianas de restricción. El protocolo de digestión es el que se muestra en la tabla 8. Las muestras digeridas se corren en un gel de agarosa para comprobar las colonias que se han transformado correctamente, de las cuales se extrae y purifica el ADN plasmídico.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (h)
H <sub>2</sub> O milliQ	22	37 °C	2
Buffer 10X	3		
EDTA 10mM	2		
Enzima FspI	0,5		
Enzima BbsI	0,5		
DNAplasmídico	2		

Tabla 8. Condiciones de digestión de los plásmidos PX458-*sgRNAs*

### 3.3.4. Diseño y producción del molde de reparación

El propósito de este protocolo es generar el fragmento de ADN, que por recombinación homóloga (HDR), va a permitir obtener el *Knock-in* (KI) del gen de resistencia a la puromicina en el gen de *Endog* a partir del corte de doble cadena (DSB) generado por el sistema CRISPR/Cas9. El sistema de reparación por recombinación homóloga, como estrategia para generar un *Knock-in* (KI) de un gen de selección, permitirá seleccionar las células transformadas mediante la adición de puromicina al medio. Este fragmento debe estar formado por el gen de resistencia a la puromicina, flanqueado por un lado, por una secuencia del 5'UTR del gen de *Endog* y, por el otro lado, por un fragmento del exón 1 o del intrón 1 del mismo gen, siendo estos

fragmentos flanqueantes los que permitan el proceso de recombinación homóloga. Para generar este fragmento se sigue una estrategia que genera brazos de homología cortos. La generación de este fragmento, con brazos de homología cortos, que servirá como molde de reparación del DSB, se realiza mediante la amplificación por PCR. En este caso mediante una única PCR se consigue generar un fragmento de ADN, que corresponde al gen de resistencia a la puromicina flanqueado por 70 pares de bases a cada lado, correspondientes a la región 5'UTR del gen *Endog* y al exón 1 de *Endog*. A continuación, se detalla el programa de la PCR utilizado.



PCR FRAGMENTOS HOMOLOGÍA CORTOS				
REACTIVO	VOLUMEN (μL)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (h)	CICLO
H <sub>2</sub> O milliQ	4	96	1'	1
Betaina	5	96	30''	35
MasterMix 2X	12,5	52	30''	
Primer Fwd (10mM)	1	72	2'35''	
Primer Rev (10mM)	1	72	1'	1
Taq/Pfu (5:1)	0,5	4	∞	1
DNA	1			

Tabla 9. Condiciones de PCR del fragmento de brazos de homología cortos.

PCR fragmentos homología cortos:

- Primer Fwd: Se compone de 70 pares de bases correspondientes a la región 5'UTR del gen *Endog* seguido de una secuencia que hibrida con la región 5' del gen de resistencia a la puromicina.
- Primer Rev: Se compone de una secuencia que hibrida con la región 3' del gen de resistencia a la puromicina seguido de 70 pares de bases correspondientes al exón 1 del gen *Endog*.
- ADN molde: pmEGFP\_a\_tubulin\_IRES\_puro2b (addgene #21042). Se elige este plásmido puesto que contiene el gen de resistencia a la puromicina, facilitando así la amplificación del mismo.
- Fragmento amplificado: gen de resistencia a la puromicina flanqueado por 70 pares de bases de homología con el gen de *Endog* a cada lado.

### 3.3.5. Transfección de la línea HEK293T con los *sgRNA* y el molde de reparación

Se transfecta la línea celular HEK293T con los *PX458-sgRNAs* y el molde de reparación con brazos de homología cortos. Primeramente, se planta en una placa de cultivo de 96 pocillos (M96) la línea celular de interés, con una densidad celular de 2500 células/pocillo en un volumen final de 100  $\mu$ L con medio HEK293T. Al día siguiente, se procede a realizar la transfección. Para ello se cambia el medio de cultivo por 80  $\mu$ L de medio DMEM no suplementado con SCR7 50mM (inhibidor de la NHEJ) al 5% de FBS inactivado. Por otro lado, se prepara en un tubo eppendorf una disolución de DMEM no suplementado y lipofectamina 2000 (10  $\mu$ L DMEM + 0,3  $\mu$ L lipofectamina 2000/pocillo). En tubos eppendorfs diferentes se preparan las siguientes mezclas:

- Control: 10  $\mu$ L DMEM + 2  $\mu$ L Producto de PCR/pocillo
- 10  $\mu$ L DMEM + 2  $\mu$ L Producto de PCR + 2  $\mu$ L de *sgRNA1* linealizado o 2  $\mu$ L de *PX458-sgRNA1*/pocillo
- 10  $\mu$ L DMEM + 2  $\mu$ L Producto de PCR + 2  $\mu$ L de *sgRNA2* linealizado o 2  $\mu$ L de *PX458-sgRNA2*/pocillo

Después, se añaden 10  $\mu$ L por pocillo de la mezcla de DMEM + lipofectamina sobre los eppendorfs que llevan los *sgRNAs* y el molde de reparación. Se agitan suavemente y se incuban durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se añaden 20  $\mu$ L de la mezcla por pocillo según la condición requerida. Al día siguiente de la transfección, se cambia el medio de cultivo por medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 1 mM HEPES, 1 mM de piruvato sódico, 2 mM L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina (P/S), y 250 mM de SCR7.

Una semana después, las células en las que se haya producido la recombinación homóloga de manera eficiente serán resistentes a la puromicina. Así pues, y con el fin de seleccionarlas, se cambia el medio por 100  $\mu$ L de DMEM suplementado, 250mM de SCR7 y 5  $\mu$ g/ml de puromicina. Se debe cambiar el medio con la selección dos veces por semana hasta que comiencen a crecer clones resistentes. En estos clones resistentes a la puromicina se analizará el nivel de expresión de ENDOG mediante *western blot*, seleccionando aquellos en los que la expresión de ENDOG esté totalmente ausente.

## 3.4. Extracción de proteína y *Western Blot* (WB)

### 3.4.1. Extracción de proteína.

### 3.4.1.1. De cultivos celulares

Después de cada tratamiento, las células se lavan dos veces con PBS 1X frío y se añade 100 µL de un tampón de lisis celular, que contiene Tris-HCl 100 mM (pH= 6,8) y 2% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, Lab Clinics). Los lisados proteicos se recogen en tubos eppendorf y se sonicen durante 30 segundos para fragmentar el ADN genómico. A continuación se centrifugan 5 min, 14000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfiere a tubos eppendorf nuevos.

La cuantificación de la proteína total se hace por el método de Lowry, utilizando el kit *Bio-Rad DC Protein Assay*. Las muestras se preparan para que tengan la misma cantidad de proteína total y el mismo volumen con el tampón de carga *Laemmli*, compuesto por 10% SDS, 50% glicerol, 720 nM de B-Mercaptoetanol (BioRad), azul de bromofenol y 250 nM de Tris pH 6,8.

### 3.4.2. Electroforesis SDS-PAGE

Las proteínas se resuelven mediante electroforesis con geles de poliacrilamida con SDS. Estos geles son desnaturalizantes y permiten la separación de las diferentes proteínas de una mezcla en función de su peso molecular. Se preparan a partir de la solución ACRYL/BIS™ (BioRad), la cual contiene 39% de acrilamida y 1% de bisacrilamida. La polimerización se realiza con 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) como iniciador de la reacción y persulfato de amonio, PSA (Sigma), al 0,05% como catalizador de la misma.

Se utilizan geles discontinuos, formados por dos partes con porcentajes de acrilamida diferentes, en los que la parte superior o gel apilador tiene un porcentaje de acrilamida bajo (4-5%) y se prepara en tampón Tris-HCl 125 uM pH 6,8, y la parte inferior o gel separador tiene un porcentaje de acrilamida que depende del tamaño de la proteína que queremos estudiar (6-15%), y se prepara en tampón Tris-HCl 375 uM pH 8,8.

Una vez han solidificado los geles, se montan en el sistema y se cargan las muestras en ellos. Se dejan migrar a corriente constante de 20-25 mA/gel, en un tampón de electroforesis que contiene Tris 25 mM, Glicina 1,44% y SDS 0,1%.

Siempre se carga en uno de los pocillos de cada gel un marcador de pesos moleculares preteñido para tener una referencia sobre el peso de las proteínas detectadas.

### **3.4.3. Transferencia de proteínas**

Una vez separadas las proteínas, éstas son transferidas a una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore); previamente activada en metanol, lavada con agua y equilibrada con tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris base 49 mM, SDS 0.0375%, Metanol 20%). El dispositivo de transferencia utilizado es un sistema Hoefer semidry, que fija una intensidad de 0.8mA/cm<sup>2</sup> durante 1h.

Se cortan 4 hojas de papel de filtro grueso del mismo tamaño que el gel, se mojan en tampón de transferencia y se colocan en el sistema de transferencia sobre la placa base (ánodo): dos hojas de papel de filtro, la membrana, el gel y dos hojas más de papel de filtro empapado. Se cierra la cubierta para que el electrodo (cátodo) entre en contacto con el sándwich y tenga lugar la transferencia.

Una vez finalizada, incubamos nuestra membrana con rojo Ponceau (Ponceau 0.1%, Ácido acético 5% y H<sub>2</sub>O hasta 50 mL), durante 5 min a T<sup>a</sup> ambiente, para asegurarnos de que ésta se ha realizado correctamente. Luego, se elimina la tinción con el tampón TBS-T (20mM Tris HCl pH= 8, NaCl 150mM, Tween-20 0.1%) haciendo varios lavados hasta que la membrana queda totalmente limpia. A continuación, se bloquea la membrana con 20mL de TBS-T que contiene un 5% de leche desnatada en polvo durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente en agitación. Pasado el tiempo, se realizan tres lavados de 10min con TBS-T y se incuba con el anticuerpo primario.

### **3.4.4. Inmunodetección**

La solución del anticuerpo primario se prepara en TBS-T con 0.02% de azida sódica y se añade el volumen de anticuerpo según la dilución indicada por la casa comercial (Tabla 10). Normalmente la incubación tiene lugar toda la noche a 4°C con agitación constante, aunque para anticuerpos como anti-Gapdh ó anti- $\alpha$ -Tubulina la incubación es de 30 min-1 hora a T<sup>a</sup> ambiente, ya que la intensidad de la señal es muy fuerte. Al día siguiente, se lavan las membranas tres veces, 10min, con TBS-T y se incuba durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente en agitación con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase o HRP) diluido en TBS-T (Tabla 11). Después, se vuelve a lavar tres veces durante 10min con TBS-T.

A continuación, se procede con el revelado mediante el kit de quimioluminiscencia *EZ-ECL* (Biological Industries) o *SuperSignal West Dura* (Pierce), dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Finalmente, se expone la membrana a films *Fuji RX* a diferentes tiempos en función de la señal emitida en la cámara oscura de revelado y se revelan los films en la reveladora *Optimax* (Protec, Alemania).

Para comprobar que la carga y la transferencia de las muestras ha sido homogénea a lo largo del gel, realizamos un control de carga. Se realiza el western blot anti-gapdh ó anti- $\alpha$ -tubulina sobre la misma membrana o bien, alternativamente se tiñe la membrana con un colorante llamado azul de naftaleno, siguiendo el procedimiento siguiente: activación de la membrana con metanol durante 5 min en agitación, lavado de 5 min con H<sub>2</sub>O seguido de una incubación de 5 min con el azul de naftaleno y finalmente, tres lavados de 5 min con una solución de lavado (25% metanol, 7% ácido acético completado con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 50 mL), y se deja secar la membrana a T<sup>a</sup> ambiente.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	APLICACIÓN
ENDO G	Abcam	ab76122	1:2.000	WB
pSer473-AKT	Cell Signaling	4060	1:1.000	WB
AKT	Santa Cruz Techn	Sc-1618	1:1.000	WB
pSer21/9-GSK3B	Cell Signaling	9331	1:1.000	WB
GSK3B	Abcam	ab18893	1:1.000	WB
CycD1	Santa Cruz Techn	SC-20044	1:500	WB
CycE1	Cell Signaling	4129	1:1.000	WB
CycB1	Abcam	ab181593	1:1.000	WB
CDK1	Abcam	ab32384	1:2.500	WB
pY15-CDK1	Abcam	ab18	1:1.000	WB
B-CATENINA	BD	610153	1:1.000	WB
HDAC4	Santa Cruz Techn	SC-11418	1:500	WB
GAPDH	Abcam	ab8245	1:10.000	WB
LAMIN A/C	Abcam	ab8984	1:1.000	WB
PTB-Nt	Abcam	ab5642	1:3.000	WB
Cit C	Abcam	ab13575	1:1.000	WB
COX IV	Thermo Fisher	A21348	1:40.000	WB
pSer1981-ATM	Santa Cruz Techn	10H11.E12	1:200	WB

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados en *western blot* (WB).

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN	APLICACIÓN
Mouse IgG-HRP	Sigma	A9046	1:10.000	WB
Rabbit IgG-HRP	Sigma	A0545	1:10.000	WB
Goat IgG-HRP	Sigma	A9046	1:20.000	WB

**Tabla 11.** Anticuerpos secundarios utilizados en *western blot* (WB).

### 3.5. Secuenciación del genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial completo de 7 corazones de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se ha secuenciado mediante PCR de largo alcance (kit de PCR de Takara LA) usando 50-100 ng de ADN y cebadores de ADNmit específicos: F: 5'-GGTTCGTTTGTTCAACGATTAAAGTCCTACGTG 3' y R:5'GAGGTGATGTTTTGGTAAACAGGCGGGGT-3'). La cuantificación del ADNmit amplificado se ha realizado utilizando el fluorómetro Qubit 2.0 (kit de ensayo *Qubit dsDNA BR*, Invitrogen). Las muestras se han preparado con el kit de preparación de muestras de ADN *Nextera XT* (Illumina) de acuerdo con el protocolo del fabricante para fragmentos de 150 pares de bases. Se ha utilizado 1 ng de ADNmit amplificado para preparar cada archivo. Después de la limpieza de PCR con perlas *Ampure XT* (Beckman Coulter), los archivos fueron normalizados y agrupados. Esta agrupación se llevó a cabo en el kit de reactivos *MiSeq V2* (300 ciclos y 2x150 químicas) (Illumina), se secuenciaron en la plataforma MiSeq y se analizaron utilizando el Software *MiSeq Control* y el Software *MiSeq Reporter*. Los archivos se multiplexaron para obtener una cobertura media de 3000X. La secuencia de referencia utilizada fue de la cepa *Mus musculus* C57BL/6J (GenBank Ref. NC\_005089.1).

### 3.6. Recolección de datos proteómicos mitocondriales y análisis cuantitativo de iTRAQ.

Se agruparon dos muestras independientes enriquecidas con mitocondrias por genotipo. La descripción detallada del procedimiento puede encontrarse en el estudio de *Cardona*<sup>450</sup> *et al.* En resumen, las proteínas se digirieron utilizando el protocolo de preparación asistada de muestras por filtro (FASP) y los péptidos resultantes marcados con marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ), fraccionados por intercambio catiónico y analizados por LC-MS/MS.

## 4. Herramientas informáticas

### 4. Herramientas informáticas

Las trayectorias a lo largo del tiempo para estudiar la recuperación del número de copias de ADNmit en MEFs *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se evaluaron utilizando splines naturales que permiten ajustar las tendencias no lineales. Para evaluar el efecto mixto del genotipo o del EtBr se utilizaron modelos en los que se incluyen el término de interacción de tipo celular o tratamiento con el tiempo. Se evaluó el efecto adicional del agente reductor NAC incluyendo el término de la interacción con NAC. Estos análisis se realizaron con el software R (R Core Team).



# Resultados

*Descifrar lo que está delante de nuestros ojos*

*requiere una lucha constante*

*George Orwell*



## 1. Estudio del rol biológico de ENDOG

### 1.1. En el crecimiento y proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo del corazón

Los ratones nulos para el gen de *Endog* (ratón *Endog*<sup>-/-</sup>) viven hasta la edad adulta sin problemas en el crecimiento y desarrollo, no encontrándose diferencias físicas visibles entre los ratones control, *Endog*<sup>+/+</sup>, y los ratones *Endog*<sup>-/-</sup>. La proporción de ratones *Endog*<sup>-/-</sup> que nacen es consistente con las leyes de la herencia mendeliana, siendo el número de crías por parto similar entre ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 1G). Esto concuerda con lo publicado anteriormente en ratones a los que se les elimina únicamente el gen de *Endog* (y no el gen adyacente con función desconocida), y en los que el desarrollo y la apariencia son normales, no encontrándose diferencias a nivel de órgano ni a nivel celular en bazo, timo, corazón, hígado, testículos y estómago analizados histológicamente<sup>436,448</sup>.

Pese a que los corazones de ratones *Endog*<sup>-/-</sup> no presentan un desarrollo anormal ni alteraciones en su morfología, teniendo el mismo tamaño y peso respecto a los *Endog*<sup>+/+</sup>, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que el área de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> en ratones adultos es mayor, y que la disminución de la expresión de ENDOG en cardiomiocitos neonatales de rata *in vitro* produce un crecimiento de los mismos<sup>471</sup>, lo que sorprende con el hecho de no detectar un fenotipo de hipertrofia en corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup>.

Por otros modelos de ratones que tenemos en el laboratorio como, por ejemplo, el ratón nulo cardioespecífico de las Caspasas 3 y 7 (DKO *3*<sup>-/-</sup> *7*<sup>-/-</sup>), hemos visto que a veces la falta de células genera una hipertrofia adaptativa a *posteriori*, ya que al ejercer la misma carga de trabajo sobre un corazón que tiene menos células, éstas se hipertrofian para poder hacer frente a esta demanda<sup>450</sup>.

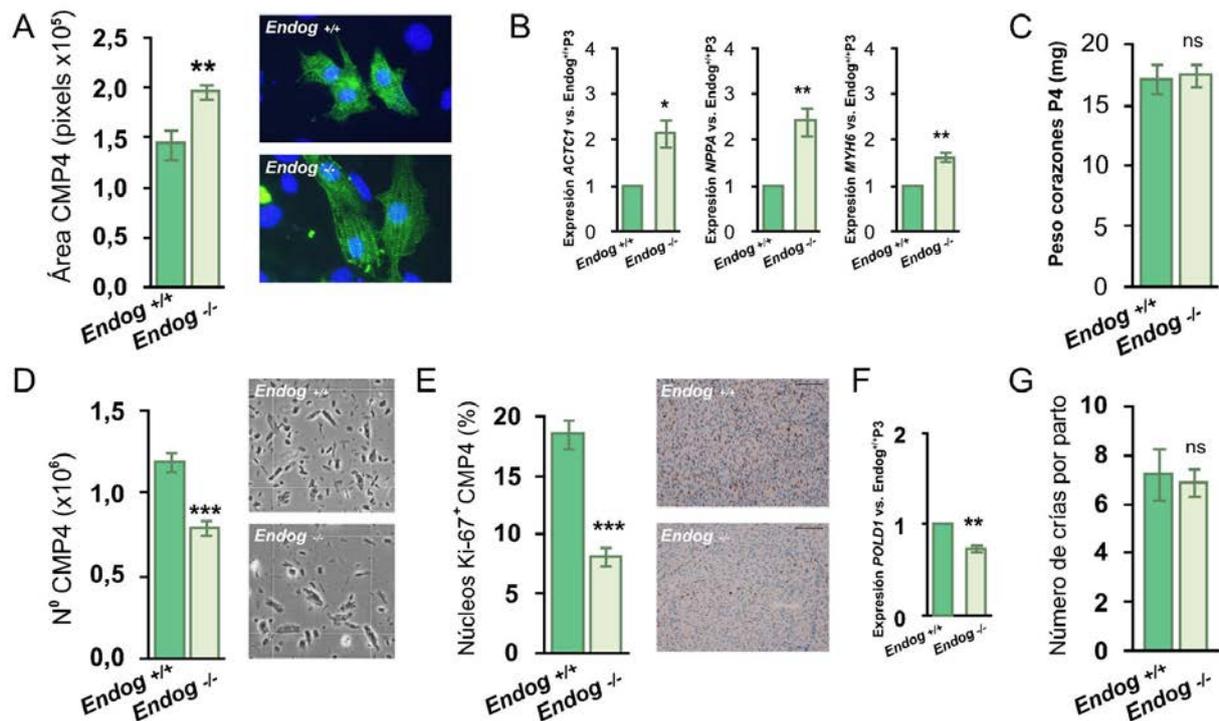
Esto nos llevó a estudiar si estos dos acontecimientos, un menor número de células y un mayor tamaño de las mismas, podían estar sucediendo de forma paralela en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>, lo que encajaría con el hecho de que las células fueran más grandes y, sin embargo, el corazón *Endog*<sup>-/-</sup> pesase lo mismo que el de tipo salvaje *Endog*<sup>+/+</sup>.

En primer lugar, se cuantificó el área de cardiomiocitos neonatales primarios aislados de corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> y marcados mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo alfa actinina ( $\alpha$ -actinina), una proteína de unión a la actina especialmente abundante en el sarcómero de los cardiomiocitos, obteniéndose un

incremento del 30% en el tamaño de los cardiomiocitos neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 1A). Para confirmar este resultado, se analizó la expresión de genes implicados en la hipertrofia y diferenciación cardíaca en corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante PCR en tiempo real (figura 1B). La expresión de los genes alfa actina cardíaca 1 (*ACTC1*) y péptido natriurético atrial (*NPPA*), que participan en el incremento de tamaño de los cardiomiocitos, se encuentra aumentada en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup>. Del mismo modo, la expresión del gen de la cadena pesada de la alfa miosina cardíaca (*MYH6*), implicado en el proceso de diferenciación de los cardiomiocitos, también se encuentra incrementada en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup>. Estos resultados indican que los cardiomiocitos de los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> son más grandes y, por tanto, expresan más genes y proteínas estructurales que forman parte de los sarcómeros como la proteína alfa actinina ( $\alpha$ -actinina) o el gen de la alfa actina cardíaca 1 (*ACTC1*); pero además los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> están más diferenciados como señala la expresión incrementada del gen de la cadena pesada de la alfa miosina cardíaca (*MYH6*), sugiriendo la necesidad de un fenotipo más especializado y adulto para poder mantener la función contráctil del corazón y, sin embargo, los corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> tienen el mismo tamaño y peso (figura 1C), confirmando que el fenotipo descrito en los corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup><sup>471</sup> también está presente en la etapa neonatal.

A continuación se cuantificó el número de cardiomiocitos que constituyen los corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante recuentos celulares, obteniéndose casi un 35% menos de células en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 1D). Para confirmar este resultado se analizó la expresión de uno de los marcadores de proliferación más comúnmente utilizados en investigación, Ki-67, mediante inmunohistoquímica en corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, obteniéndose un 40% menos de cardiomiocitos positivos para Ki-67 en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 1E). Además se analizó la expresión del gen de la polimerasa delta 1 (*POLD1*), implicado en el proceso de replicación del ADN y, por tanto, en la progresión del ciclo celular, en corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante PCR en tiempo real, obteniéndose una disminución en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 1F). Estos resultados indican que los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> tienen menos células en el momento del nacimiento, y sugieren que durante el desarrollo embrionario y en la etapa perinatal se debe producir una represión de la maquinaria de división y una salida del ciclo celular, perdiendo así los

cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> su capacidad proliferativa antes y después del nacimiento. De manera que los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> no compensan el hecho de tener menos cardiomiocitos aumentando el tamaño de los mismos, sino que ambos procesos se producen simultáneamente durante el desarrollo embrionario, señalando a ENDOG como un regulador del crecimiento y la proliferación de las células cardiacas.



**Figura 1. Análisis del tamaño y número de cardiomiocitos presentes en corazones neonatales (P3-P4) de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.** **A.** Área celular promedio de al menos 150 cardiomiocitos neonatales primarios *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> marcados mediante inmunofluorescencia con  $\alpha$ -actinina (citoplasma) y hoechst (núcleo) en 3 experimentos independientes. **B.** Análisis de la expresión de los genes  $\alpha$ -actina cardiaca 1 (*ACTC1*) y péptido natriurético atrial (*NPPA*), así como del gen de la cadena pesada de la alfa miosina cardiaca (*MYH6*) en 5 corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante PCR en tiempo real. **C.** Peso de 10 corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. **D.** Recuento del número de cardiomiocitos neonatales presentes en 6 corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante cámara de Neubauer. **E.** Porcentaje de células positivas para Ki-67 e imágenes de la inmunohistoquímica contra Ki-67 en 5 corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. Las células positivas presentan marcaje marrón y los núcleos sin marcar se visualizan en azul. Barra de escala: 100um. **F.** Análisis de la expresión del gen de la polimerasa delta 1 (*POLD1*) en 5 corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante PCR en tiempo real. **G.** Número de crías nacidas en 15 partos de ratonas *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. CM: cardiomiocitos. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p $\leq$ 0.05, \*\*p $\leq$ 0.01, \*\*\*p $\leq$ 0.001. ns: no significativo.

## 1.2. En la proliferación de células de roedores y humanas en división

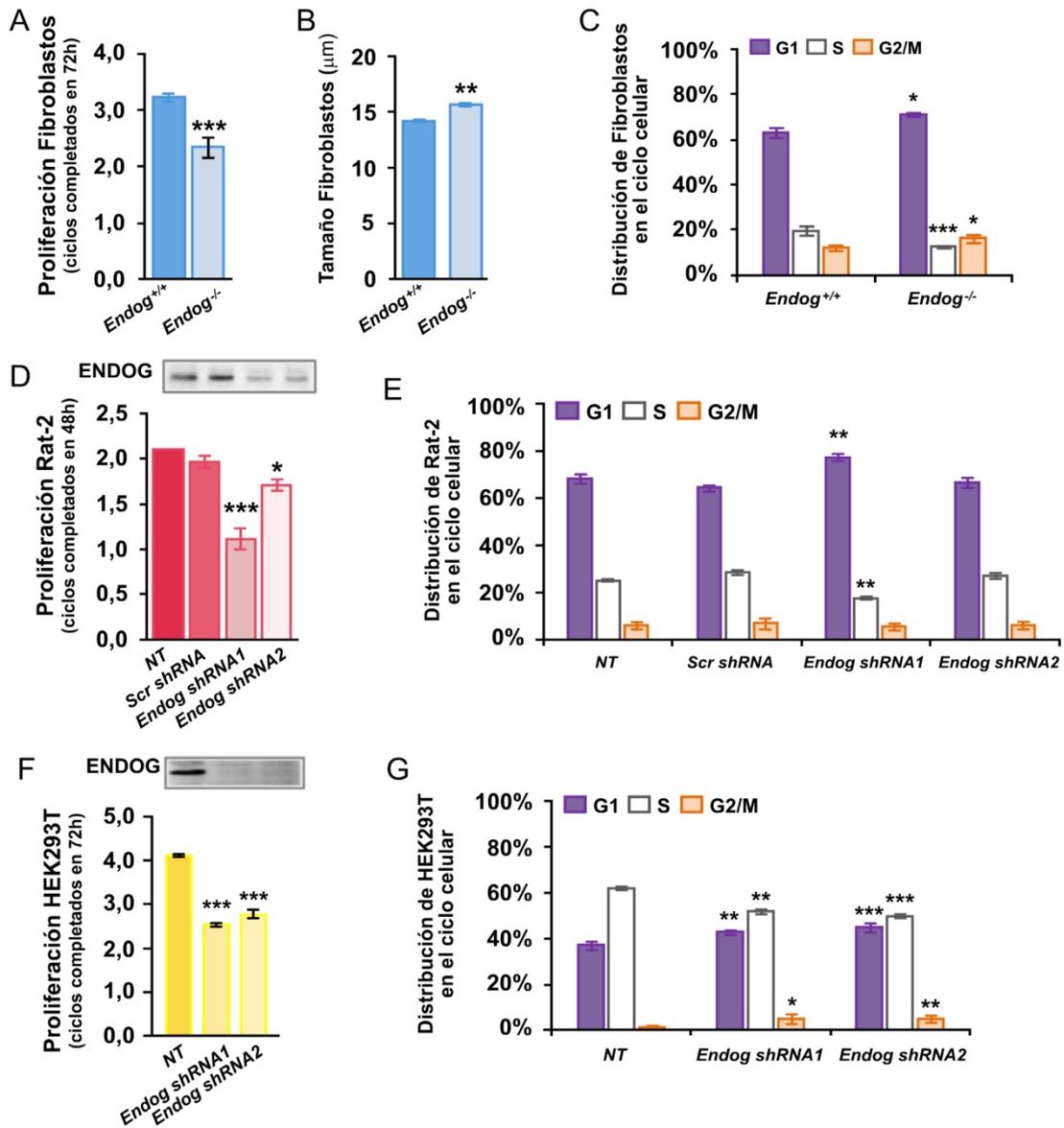
A raíz de los resultados obtenidos en cardiomiocitos nos cuestionamos si de la misma manera ENDOG podía estar regulando el crecimiento y la división celular de otros tipos celulares.

En primer lugar, analizamos la capacidad de división celular de los fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> *in vitro*. Los fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup> completan un menor número de ciclos a lo largo de las 72 horas que permanecen en cultivo (figura 2A), disminuyendo el porcentaje de células presentes en la fase S del ciclo celular, y aumentando el porcentaje de células que se acumulan en las fases G1 y G2-M del ciclo celular (figura 2C). También cuantificamos el tamaño de los fibroblastos primarios *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante el contador CoulterZ2, obteniendo que los fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup> son más grandes respecto a los fibroblastos control *Endog*<sup>+/+</sup> (figura 2B).

A continuación extendimos el análisis de la capacidad de división celular a otros modelos deficientes en ENDOG como fibroblastos de rata de la línea celular Rat-2, a los que se les disminuye la expresión de ENDOG mediante el uso de vectores lentivirales, utilizando dos variantes de *shRNA* contra el ARN mensajero (ARNm) de *Endog* (*Endog shRNA* 1 y 2), y células embrionarias de riñón humano (HEK293T) a las que se les elimina el gen de *Endog* mediante el sistema CRISPR/Cas9, utilizando los ARN guías de *Endog* 1 y 2 (*Endog sgRNA* 1 y 2).

Los fibroblastos Rat-2 transducidos lentiviralmente con los *Endog shRNA* 1 y 2 completan un menor número de ciclos respecto a su control, fibroblastos Rat-2 transducidos con el *scrambled shRNA* (*Scr shRNA*), durante las 48 horas que permanecen en cultivo (figura 2D), disminuyendo el porcentaje de células presentes en la fase S del ciclo celular, y aumentando el porcentaje de células que se acumulan en la fase G1 del ciclo celular (figura 2E). Estos efectos observados son más fuertes en células transducidas con el *Endog shRNA* 1 donde la caída de la proteína ENDOG es mayor, consiguiendo así una mayor represión de la expresión con la variante 1 de los *Endog shRNAs* utilizados en los fibroblastos Rat-2.

También las células embrionarias de riñón humano (HEK293T) a las que se les elimina totalmente el gen de *Endog* mediante los ARN guías *Endog sgRNA* 1 y 2 (HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>) completan un menor número de ciclos durante las 48 horas que



**Figura 2. Análisis del efecto de la falta de ENDOG en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular de diferentes líneas celulares en división.** **A.** Número de ciclos que completan durante 72 horas los fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. n=5. **B.** Cuantificación del tamaño de fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante el contador CoulterZ2. n=5. **C.** Porcentaje de fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> distribuidos en cada una de las fases del ciclo celular. n=5. **D.E.** Número de ciclos que completan los fibroblastos de rata de la línea celular Rat-2 durante 48 horas, así como el porcentaje de células Rat-2 distribuidas en cada una de las fases del ciclo celular, previamente transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog* 1 y 2. n=5. **F.G.** Número de ciclos que completan durante 72 horas las células humanas HEK293T y las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, generadas con los ARN guías de *Endog* (*sgRNA* 1 y 2) mediante el sistema CRISPR/Cas9, así como el porcentaje de células HEK293T y HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> distribuidas en cada una de las fases del ciclo celular. n= 4. NT: No Transducido. Scr: *scrambled*. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001.

permanecen en cultivo (figura 2F), disminuyendo el porcentaje de células presentes en la fase S del ciclo celular, y aumentando el porcentaje de células que se acumulan en las fases G1 y G2-M del ciclo celular (figura 2G). En este caso con ambos *Endog sgRNAs* se observa el mismo fenotipo ya que la proteína ENDOG está completamente ausente en estas células.

Estos resultados indican que el papel provida de ENDOG no se limita sólo a los cardiomiocitos en los que su expresión y función es muy importante, sino que también es capaz de regular el crecimiento y la proliferación de células de roedores y humanas en división.

### **1.3. En la proliferación de células tumorales humanas *in vitro* y su capacidad de generar tumores *in vivo***

Dado que en una línea humana la ausencia de ENDOG hace que las células pierdan su capacidad de dividirse, el siguiente paso fue analizar si sucedía lo mismo en una línea tumoral humana. Para ello se utilizaron células de la línea tumoral Ishikawa (IK) que derivan de un adenocarcinoma de endometrio humano moderadamente diferenciado y en las que la expresión de ENDOG es elevada respecto a otras líneas tumorales, tal y como será mostrado más adelante (figura 4A).

La disminución de la expresión de ENDOG mediante el uso del vector lentiviral *Endog shRNA 3* hace que las células IK completen un menor número de ciclos respecto a su control, células IK transducidas con el *scrambled shRNA (Scr shRNA)*, a lo largo de las 96 horas que las células se mantienen en cultivo (figura 3A), y a diferencia de lo observado en las anteriores líneas celulares, aumenta el porcentaje de células que se acumulan en la fase S del ciclo celular, y disminuye el porcentaje de células presentes en la fase G2-M del ciclo celular (figura 3B).

Ya que las células IK son capaces de desarrollar tumores subcutáneos cuando se inyectan bajo la piel de ratones inmunodeprimidos (SCID), quisimos estudiar la capacidad de las células IK deficientes en ENDOG de generar un tumor sólido *in vivo*. De manera que inyectamos subcutáneamente células IK transducidas con el vector control (*Scr shRNA*) en la parte derecha de la espalda de estos ratones y el mismo número de células transducidas con el *Endog shRNA 3* en la parte izquierda, dejándolas crecer durante aproximadamente 1 mes, tiempo durante el cual se fue midiendo el crecimiento de los tumores que se iban desarrollando. Al finalizar el experimento observamos una reducción significativa en el volumen del tumor *in vivo* formado por

células IK transducidas con el *Endog shRNA 3* (figura 3C). Estos resultados indican que la influencia de ENDOG en el proceso de división celular también abarca células tumorales humanas como las células IK, dificultando su proliferación *in vitro* y limitando su capacidad de generar tumores *in vivo* cuando la expresión de ENDOG en ellas es reducida.

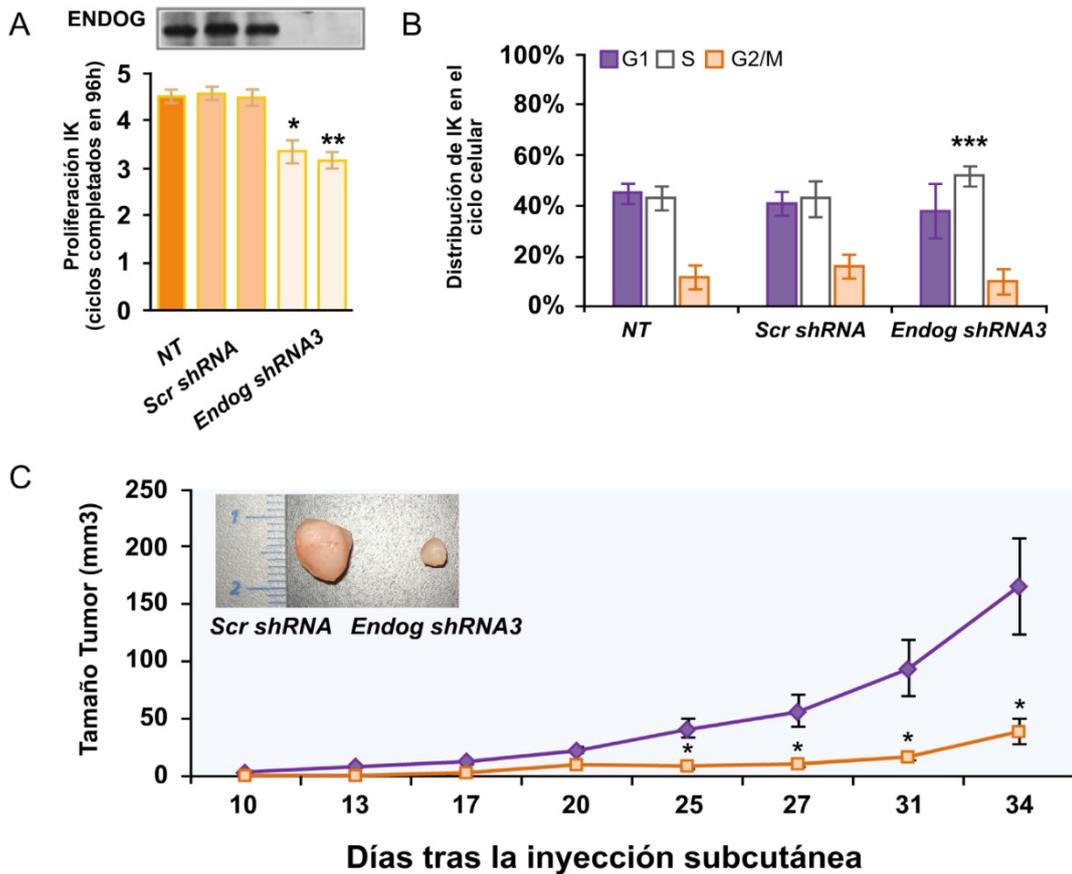


Figura 3. Efecto de la expresión reducida de ENDOG en la división celular de células tumorales humanas Ishikawa *in vitro* e *in vivo*. A.B. Número de ciclos que completan las células Ishikawa durante 96 horas, así como el porcentaje de células Ishikawa distribuidas en cada una de las fases del ciclo celular, previamente transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y el *shRNA* de *Endog 3*. n=3. C. Curva de crecimiento del volumen de los xenoinjertos en ratones SCID, e imagen de dos xenoinjertos representativos de cada grupo, el control (células IK transducidas con el *Scr shRNA*) y con la inhibición de la expresión de ENDOG (células IK transducidas con el *shRNA* de *Endog 3*). Barra de escala: 1cm. n=5. NT: No Transducido. Scr: *scrambled*. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

## 2. Caracterización de la expresión de ENDOG en líneas tumorales *in vitro* y tejido tumoral humano *in vivo*

Al analizar la expresión de ENDOG en diferentes líneas tumorales derivadas de un carcinoma de endometrio humano detectamos que ésta disminuye en las líneas tumorales endometriales menos maduras, más tumorigénicas e invasivas (figura 4A); así la expresión de ENDOG es mayor en las células Ishikawa, con características propias de un carcinoma endometrial de tipo I, mientras que disminuye en las células HEC-1A y MFE-296 que representan un carcinoma endometrial de tipo II. El carcinoma endometrial tipo I corresponde a un tumor de bajo grado, con pronóstico favorable, que normalmente expresa receptores de estrógenos y progesterona, y se asocia a una exposición excesiva a estrógenos. Mientras que el carcinoma endometrial tipo II se trata de un tumor poco diferenciado y de peor pronóstico, que no suele estar asociado a estimulación estrogénica pero sí a un endometrio atrófico u ocasionalmente a pólipos endometriales<sup>485,486</sup>.

Para confirmar que la disminución de la expresión de ENDOG en las líneas tumorales HEC-1A y MFE-296 no se debe a que éstas tienen un menor contenido mitocondrial respecto a las IK se utilizaron dos marcadores mitocondriales, la citocromo C oxidasa (COXIV), última enzima de la cadena respiratoria que transfiere los electrones al oxígeno durante la respiración mitocondrial, y la dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD) que forma parte del complejo multienzimático 2-oxoglutarato deshidrogenasa situado en la matriz mitocondrial (figura 4A). La disminución de COXIV en las líneas HEC-1A y MFE-296 puede explicarse por el llamado efecto "Warburg", fenómeno por el cual el aumento en el consumo de glucosa se destina a la biosíntesis de lactato y no a su metabolismo oxidativo en el interior de la mitocondria<sup>487</sup>. Este cambio metabólico facilita la síntesis de los intermediarios necesarios para un rápido crecimiento celular y mejora la capacidad antioxidante de las células cancerosas permitiendo afrontar el enorme estrés oxidativo generado con la pérdida de las interacciones célula-matriz. De esta manera el efecto "Warburg" no solo influye en el crecimiento del tumor sino que también facilita la progresión metastásica, por lo que las células cancerosas favorecen este fenómeno a través de mecanismos que regulan negativamente el metabolismo oxidativo de la glucosa. Uno de estos mecanismos es la inhibición de la expresión y la actividad de la citocromo C oxidasa a través del factor de transcripción Snail, un importante regulador del fenotipo invasivo que reprime el consumo de oxígeno y la respiración mitocondrial, favoreciendo así la progresión tumoral y la metástasis<sup>488</sup>. Por este motivo nos hemos basado en la expresión de la DLD como marcador del contenido

mitocondrial, siendo similar en las tres líneas tumorales de endometrio analizadas y descartando así que la reducida expresión de ENDOG en las líneas HEC-1A y MFE-296 se deba a que éstas presentan un menor número de mitocondrias.

Las células tumorales llevan a cabo un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT), en el que las células pierden la polaridad y los contactos célula-célula, expresan componentes mesenquimales así como proteínas que degradan la matriz extracelular y manifiestan un fenotipo migratorio. Estas células tumorales mesenquimales adquieren la capacidad de separarse del tumor primario, penetrar a través de la membrana e infiltrar tejidos contiguos para metastatizar<sup>489</sup>. La pérdida de la expresión de E-cadherina, una glicoproteína central en las uniones adherentes célula-célula, es clave en el proceso EMT<sup>490</sup>, llegando a establecerse una correlación entre niveles bajos de E-cadherina y una mayor invasión tumoral. La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina juega un papel importante en la inducción de los represores de E-cadherina a través de la inhibición de la fosforilación de la  $\beta$ -catenina mediada por GSK3 $\beta$ <sup>491</sup>. De acuerdo a su mayor capacidad invasiva, las líneas HEC-1A y MFE-296 tienen una menor expresión de  $\beta$ -Catenina y E-cadherina, así como una mayor expresión del marcador mesenquimal vimentina respecto a la línea tumoral IK. La disminución de la expresión de ENDOG en estas líneas tumorales endometriales se asocia al cambio fenotípico ligado a la invasividad, siendo la expresión mayor en un fenotipo epitelial (células IK) y menor en un fenotipo más mesenquimal (células HEC-1A y MFE-296) (figura 4A).

La confirmación definitiva de la reducida presencia de ENDOG en células tumorales de endometrio menos diferenciadas y más tumorigénicas viene del análisis de su expresión en muestras de tejido tumoral humano de endometrio de grado histológico II, cedidas por el biobanco del HUAV-IRBLleida (figura 4B). Contrariamente a este resultado, ENDOG se encuentra altamente expresada en muestras de tejido tumoral humano moderadamente diferenciado de colon, hígado, pulmón y, en menor grado de mama (figura 4B), indicándonos que ENDOG no sigue un patrón de expresión similar en los diferentes tumores sino que parece específico del tipo de cáncer; no obstante, el número de casos analizados por cada tejido tumoral es muy reducido y, en consecuencia, serían necesarios análisis complementarios a los presentados en este trabajo para corroborar estos resultados.

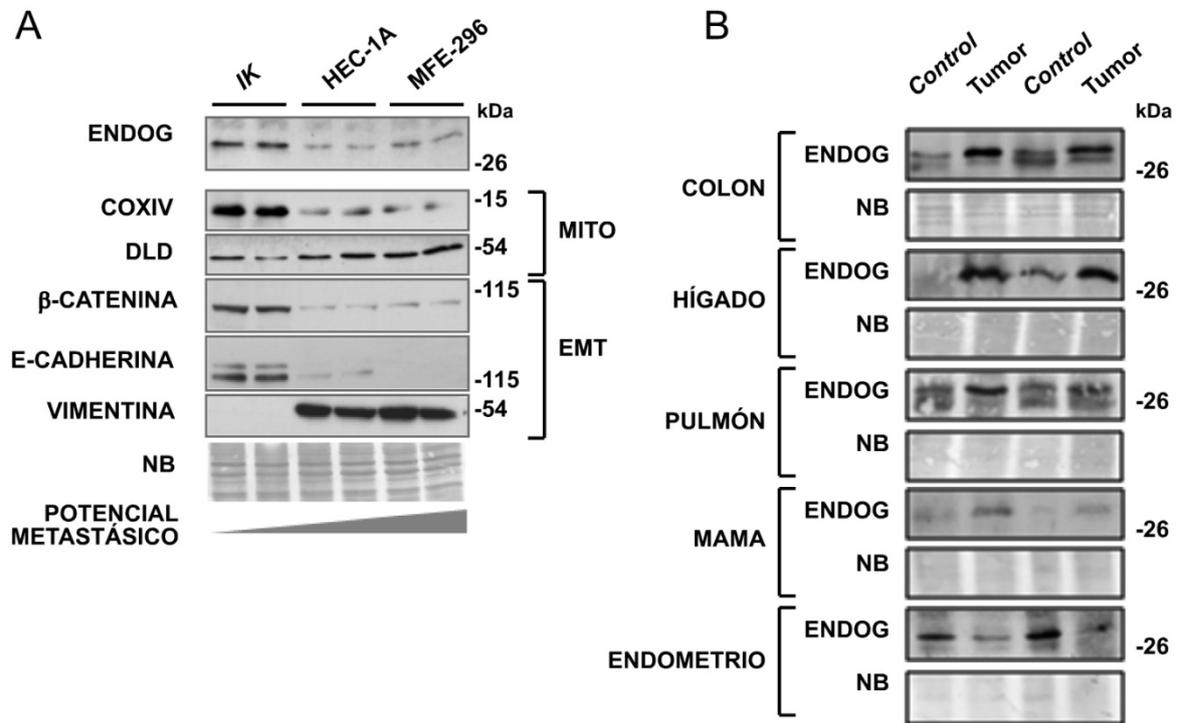


Figura 4. Análisis de la expresión de ENDOG en diferentes líneas tumorales derivadas de un carcinoma de endometrio humano con distinto potencial metastásico, así como en muestras humanas de diferentes tejidos no tumorales y tumorales cedidas por el biobanco del HUAUV-IRBLleida. **A.** Extractos totales de proteína procedentes de las células tumorales de endometrio IK, HEC-1A y MFE-296 en las que se ha analizado la expresión de ENDOG mediante *western blot*, así como los marcadores del contenido mitocondrial COXIV y DLD, y los marcadores de la transición epitelio-mesénquima β-catenina, E-cadherina y Vimentina. n=2. **B.** Extractos totales de proteína procedentes de muestras de diferentes tejidos humanos no tumorales y tumorales en las que se ha analizado la expresión de ENDOG mediante *western blot*. n=2. MITO: contenido mitocondrial. EMT: transición epitelio-mesénquima. COXIV: citocromo C oxidasa. DLD: dihidrolipoil deshidrogenasa. NB: azul de naftaleno. n= número de experimentos independientes realizados.

### 3. Detección de ROS y sus posibles efectos sobre las funciones alteradas en ausencia de ENDOG

#### 3.1. En células de roedores postmitóticas: cardiomiocitos primarios de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, y cardiomiocitos primarios de rata

Resultados previos de nuestro grupo demuestran que la reducida expresión de ENDOG en cardiomiocitos neonatales de rata incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) *in vitro*, y que la producción de ROS es mayor en las mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup> *in vivo*<sup>471</sup>. Estos datos junto con otras publicaciones de las que se ha hablado extensamente en la introducción, nos han llevado a sospechar si las ROS pueden actuar como mediadoras en el rol que ejerce ENDOG sobre la regulación del crecimiento y la división celular, de tal manera que sean los diferentes niveles de expresión de ENDOG los que puedan estar alterando la producción o abundancia de las ROS en la célula, siendo éstas las encargadas de activar o desactivar la señalización que lleva al crecimiento, tanto en tamaño como en número, en células deficientes o con insuficiente expresión de ENDOG.

Para ello el primer paso ha sido cuantificar la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en los diferentes tipos celulares deficientes en ENDOG, en paralelo a un tratamiento con un agente neutralizador de especies reactivas del oxígeno, la N-acetil-L-cisteína (NAC), precursor de la síntesis del glutatión pero también un potente agente reductor que neutraliza directamente los radicales libres mediante su grupo sulfhidrilo (-SH) libre. A continuación se ha estudiado si los efectos observados en estas células, aumento de crecimiento y disminución de la proliferación, son revertidos mediante el tratamiento con NAC, señalando así a las ROS como intermediarias del rol biológico de ENDOG.

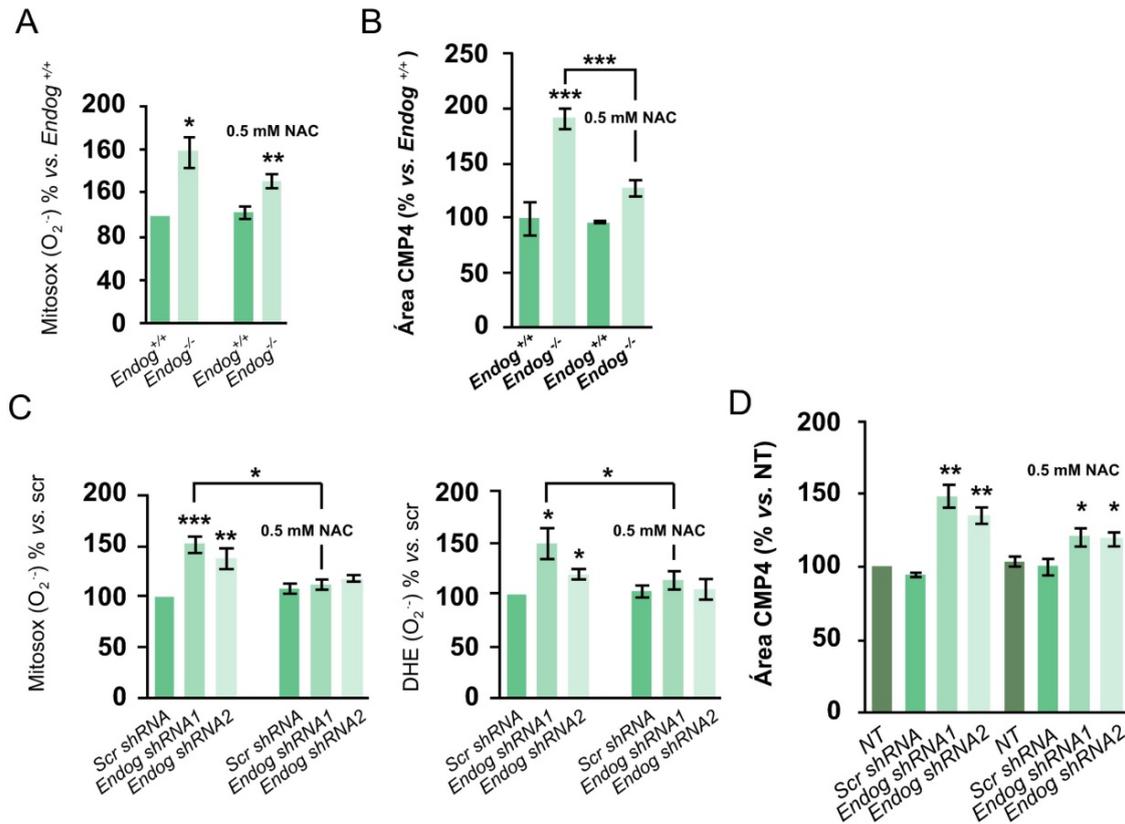
Para cuantificar la producción de ROS se han utilizado las sondas DHE (del inglés *Dihydroethidium*) y MitoSOX<sup>TM</sup> Red. La sonda MitoSOX<sup>TM</sup> Red es un reactivo derivado de la hidroxietidina (HE) que permite detectar de manera selectiva la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) producido en el interior de las mitocondrias de células vivas mediante citometría de flujo. Esta sonda posee carga positiva lo que facilita su entrada y acumulación específica en las mitocondrias, y la posterior emisión de fluorescencia como consecuencia de su oxidación y subsecuente unión al ADN mitocondrial. La sonda DHE también es un reactivo derivado de la hidroxietidina (HE) pero carece de carga positiva, de manera que queda retenida en el citoplasma permitiendo mayoritariamente la detección del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) presente en este

compartimento celular, oxidándose y emitiendo fluorescencia que es cuantificada mediante el citómetro de flujo.

En primer lugar se ha determinado la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial mediante marcaje con la sonda MitoSOX™ Red en cardiomiocitos neonatales primarios de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 5A), y en cardiomiocitos neonatales primarios de rata transducidos lentiviralmente con el *shrRNA* control, *Scr shrRNA*, y los *Endog shrRNA* 1 y 2 (figura 5C), simultáneamente al tratamiento con el agente reductor NAC (0.5mM) durante 48 horas. Los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup>, así como los cardiomiocitos de rata con una expresión disminuída de ENDOG, presentan niveles elevados del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial que son reducidos mediante el tratamiento con NAC, de manera significativa en el caso de los cardiomiocitos de rata transducidos lentiviralmente con el *Endog shrRNA* 1.

Dado que los efectos observados en los cardiomiocitos neonatales de rata deficientes en ENDOG se deben específicamente a la reducción de la expresión de ENDOG, y debido a la dificultad técnica de realizar un cultivo primario de cardiomiocitos a partir de corazones neonatales de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, se ha determinado la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) citoplasmático mediante marcaje con la sonda DHE únicamente en cardiomiocitos neonatales primarios de rata transducidos lentiviralmente con el *shrRNA* control, *Scr shrRNA*, y los *Endog shrRNA* 1 y 2 (figura 5C). También en este caso los cardiomiocitos de rata con una expresión reducida de ENDOG presentan niveles más altos del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) citoplasmático respecto a los cardiomiocitos control, y de nuevo el tratamiento con NAC consigue disminuirlos de manera significativa.

A continuación se ha comprobado si la reducción de la expresión de ENDOG mediante transducción lentiviral en cardiomiocitos neonatales de rata aumenta el tamaño de los mismos, tal y como ha sido publicado anteriormente<sup>471</sup> y como sucede en los cardiomiocitos neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 5B), y si ese incremento de tamaño puede frenarse a través de la eliminación del exceso de las ROS generadas en el interior celular, en este caso a través del tratamiento con NAC. La disminución de la expresión de ENDOG en cardiomiocitos neonatales de rata aumenta el tamaño de éstos (figura 5D), y tanto en ellos como en los cardiomiocitos neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> el tratamiento con el agente neutralizador de ROS, NAC, consigue reducir el agrandamiento de los cardiomiocitos *in vitro* (figura 5B y 5D).



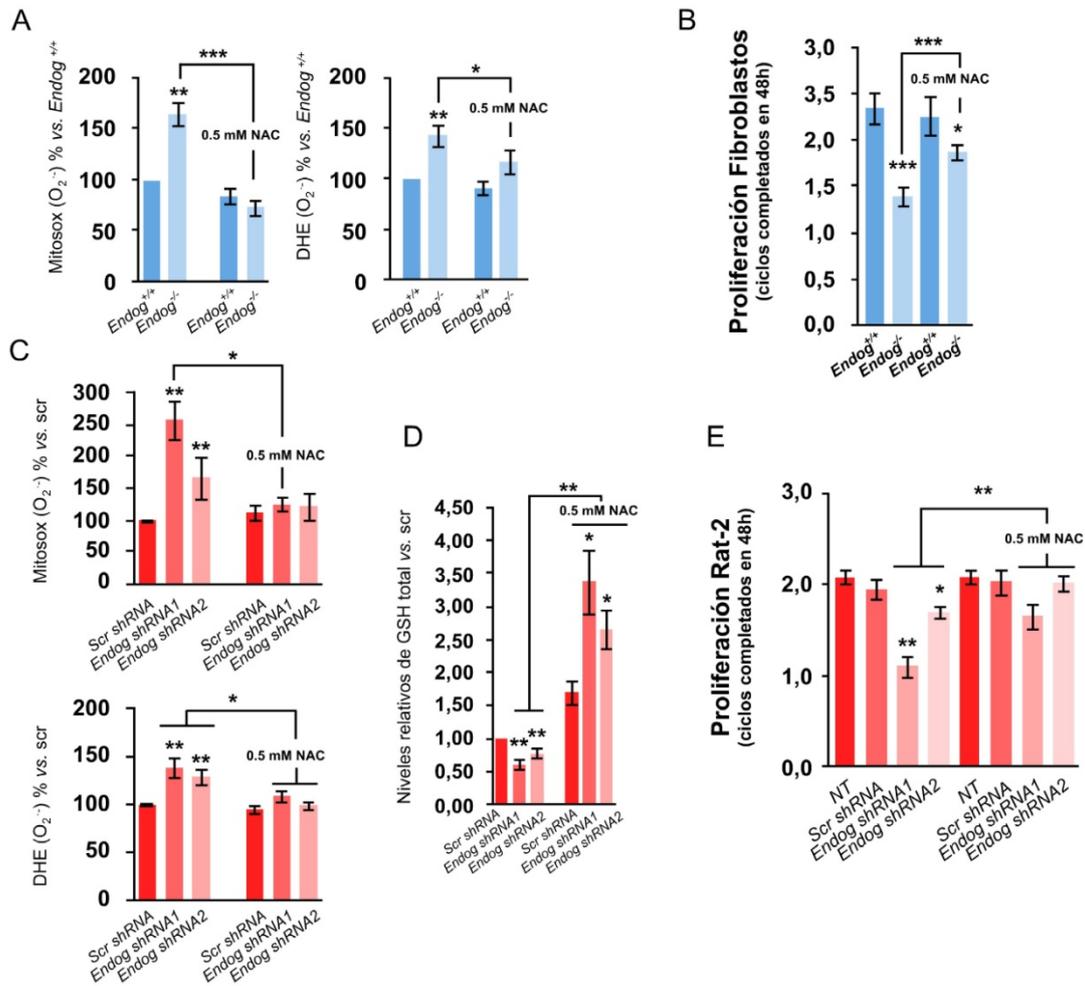
**Figura 5. Cuantificación de la producción de ROS asociada a la falta de ENDOG, y análisis del efecto del tratamiento con un agente neutralizador de radicales libres, NAC, en el tamaño celular de cardiomiocitos deficientes en ENDOG.** **A.** Determinación de la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial en cardiomiocitos neonatales primarios de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, mediante marcaje con la sonda MitoSOX™ Red y cuantificación por citometría de flujo, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 48 horas. n=3. **B.** Área de los cardiomiocitos neonatales primarios (n ≥ 30) de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, tratados con NAC (0.5mM) durante 48 horas y marcados mediante inmunofluorescencia con la  $\alpha$ -actinina (citoplasma) y hoechst (núcleo). **C.** Determinación de la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ Red y DHE respectivamente, y cuantificación por citometría de flujo, en cardiomiocitos neonatales primarios de rata transducidos lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1* y *2*, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 48 horas. n=5. **D.** Área de los cardiomiocitos neonatales primarios (n ≥ 30) de rata transducidos lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1* y *2*, tratados con NAC (0.5mM) durante 48 horas y marcados mediante inmunofluorescencia con la  $\alpha$ -actinina (citoplasma) y hoechst (núcleo). CM: cardiomiocitos. NT: No Transducido. Scr: *scrambled*. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001

### 3.2. En células de roedores en división: fibroblastos primarios de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> y fibroblastos de rata, Rat-2

Dado que el crecimiento anormal de los cardiomiocitos deficientes en ENDOG puede frenarse a través de un tratamiento que neutraliza el exceso de las ROS generadas en ellos, el siguiente paso ha sido comprobar si la insuficiente proliferación observada en células de roedores en división, con escasa o nula expresión de ENDOG, se debe a un aumento en la producción de ROS, y si este defecto en proliferación puede recuperarse igualmente con un tratamiento con NAC.

En primer lugar se ha determinado la producción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ Red y DHE respectivamente, en fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, así como en células Rat-2 transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *Endog shRNA 1 y 2*, en paralelo al tratamiento con el agente reductor NAC (0.5mM) durante 48 horas (figura 6A y 6C). Los fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup>, así como las células Rat-2 con una expresión disminuída de ENDOG, presentan niveles más altos del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) mitocondrial y citoplasmático respecto a sus controles, y son reducidos significativamente mediante el tratamiento con NAC. En estos tipos celulares la producción, así como la caída en presencia del agente reductor NAC, del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) mitocondrial es mayor que la citoplasmática en ausencia de ENDOG, lo que nos sugiere que la principal fuente generadora de ROS es la mitocondria y lo que se detecta en el citoplasma puede en parte derivar de ella.

Como ya se ha comentado en el punto 6.3. de la introducción, el glutatión reducido (GSH) mejora la capacidad antioxidante de las células al poder ceder un electrón a prácticamente todos los radicales libres, oxidándose y convirtiéndose en la forma GSSG. La relación entre la forma reducida y la oxidada (relación GSH/GSSG) es un indicador muy sensible del grado de estrés oxidativo dentro del sistema celular, de manera que la depleción del nivel total de GSH intracelular puede conseguirse a través de la oxidación del GSH reducido debido a una situación de estrés oxidativo continuado. En las células Rat-2 transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1 y 2*, sin y con el agente reductor NAC (0.5mM) durante 12 horas, se han cuantificado los niveles totales de GSH intracelulares (figura 6D), obteniéndose una disminución en fibroblastos Rat-2 con escasa expresión de ENDOG y



**Figura 6. Cuantificación de la producción de ROS asociada a la falta de ENDOG, y análisis del efecto del tratamiento con NAC, en la proliferación celular de células deficientes en ENDOG. A.C.** Determinación de la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ Red y DHE respectivamente, y cuantificación por citometría de flujo en fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (A), así como en células Rat-2 (C) transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog* 1 y 2, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 48 horas. n=5. **D.** Medida de los niveles de GSH intracelulares (U/ug proteína) mediante el kit ThiolTracker Violet (Molecular Probes) en células Rat-2 transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog* 1 y 2, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 12 horas. **B.E.** Número de ciclos que completan durante 48 horas los fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (B), así como células Rat-2 (E) transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog* 1 y 2, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 48 horas. n=4. NT: No Transducido. Scr: *scrambled*. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001.

una recuperación muy pronunciada de estos niveles en presencia de NAC, incluso en las Rat-2 control, ya que el agente reductor NAC es un precursor directo de la síntesis del GSH.

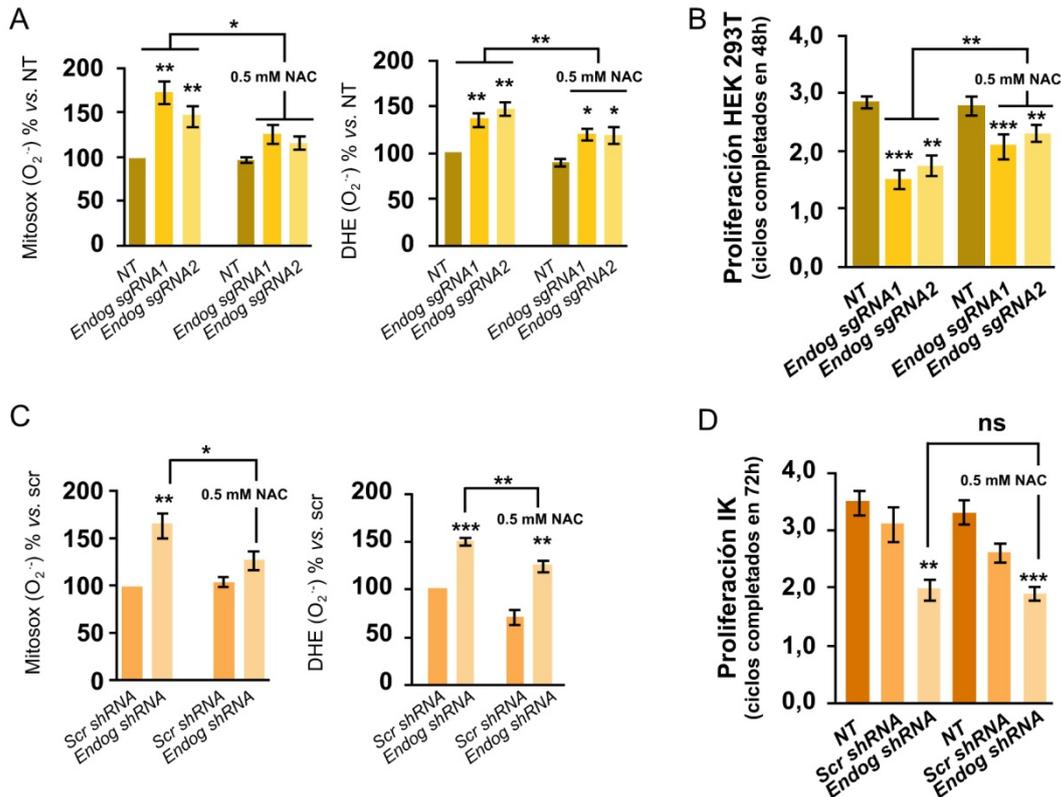
A continuación se ha comprobado si el defecto en proliferación observado en fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup> y en células Rat-2 ligado a la falta de ENDOG podía recuperarse a través de un tratamiento con NAC. En este caso el tratamiento con el agente neutralizador de ROS consigue una recuperación parcial de la proliferación, lo que sugiere que el defecto en proliferación observado en células en división con nula o insuficiente expresión de ENDOG está bajo el control de ROS (figura 6B y 6E).

### 3.3. En células humanas en división: HEK293T e Ishikawa

Los resultados hasta ahora expuestos indican que el aumento en la producción de ROS no es exclusivo de células del miocardio con una reducida expresión de ENDOG, sino que también sucede en otros tipos celulares como fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>-/-</sup> y fibroblastos de rata Rat-2, de modo que el siguiente paso ha sido confirmar si en células humanas con una expresión limitada de ENDOG se obtiene el mismo resultado.

Por un lado se ha cuantificado la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ Red y DHE respectivamente (figura 7A y 7C), en células embrionarias de riñón humano a las que se les ha eliminado completamente el gen de *Endog* mediante los ARN guías *Endog* *sgRNA* 1 y 2 (HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>), y células tumorales IK transducidas con el vector control, *Scr* *shRNA*, y el *Endog* *shRNA3*, en paralelo al tratamiento con el agente reductor NAC (0.5mM) durante 48 horas. Por otro lado se ha determinado la posible recuperación del fenotipo observado en estas células, la disminución de la proliferación celular, mediante el tratamiento con NAC (figura 7B y 7D). Las células humanas HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, así como las células tumorales IK con una expresión disminuída de ENDOG, presentan niveles más altos del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial y citoplasmático, siendo éstos reducidos significativamente mediante el tratamiento con NAC. La disminución de la producción de ROS en células humanas HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> produce una recuperación parcial de la proliferación, tal y como sucede en los fibroblastos Rat-2 y fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>-/-</sup>, sin embargo, en las células tumorales IK la disminución en la producción de ROS no conlleva una recuperación de la proliferación.

Estos resultados indican que la falta de ENDOG provoca un aumento en la producción de ROS en todos los tipos celulares estudiados, y que la disminución de la producción de ROS hace que los cardiomiocitos dejen de hipertrofiarse y las células en división, a excepción de la línea tumoral IK, recuperen parcialmente su proliferación pese a no tener ENDOG, señalando una relación directa entre la abundancia de las ROS y los cambios en el crecimiento celular ligados a la falta de ENDOG.



**Figura 7. Cuantificación de la producción de ROS asociada a la falta de ENDOG, y análisis del efecto del tratamiento con NAC, en la proliferación celular de células deficientes en ENDOG. A.C.** Determinación de la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ Red y DHE respectivamente, y cuantificación por citometría de flujo en células HEK293T y HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> (A), así como en células tumorales humanas Ishikawa (C) transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y el *shRNA* de *Endog 3*, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 48 horas. n=5. **B.D.** Número de ciclos que completan las células HEK293T y HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> durante 48 horas (B), así como las células tumorales humanas Ishikawa durante 72 horas (D) transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA* y el *shRNA* de *Endog 3*, en combinación con un tratamiento con NAC (0.5mM) durante 48/72 horas. n=4. NT: No Transducido. Scr: *scrambled*. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. ns: no significativo.

## 4. Caracterización de las vías de señalización implicadas en el fenotipo observado de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup>

### 4.1. La reducida proliferación de los cardiomiocitos en corazones *Endog*<sup>-/-</sup> en desarrollo

La reducción observada en el número de cardiomiocitos presentes en corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup>, asociada a un menor número de células positivas para el marcador de proliferación celular Ki-67 y a una caída en la expresión del gen *POLD1* implicado en la replicación del ADN (figura 1D, 1E, 1F), nos señaló una posible disminución en la actividad de las vías de señalización que favorecen la división celular, dirigiéndonos hacia la caracterización de una vía clásica que controla la proliferación celular, la vía AKT-GSK3 $\beta$  que acaba en el control de la expresión de la ciclina D1, en corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.

La proteína quinasa AKT se activa mediante fosforilaciones en los residuos de Ser473 y Thr308 potenciando la supervivencia celular, promoviendo el crecimiento (en masa celular) y la proliferación celular a través de múltiples vías. AKT activa fosforila directamente a GSK3 $\beta$  en los residuos de Ser9/21 produciendo la inhibición de su actividad, ya que ésta es una quinasa atípica que se encuentra basalmente activada en las células. GSK3 $\beta$  fosforila a las ciclinas D y E, así como a los factores de transcripción *c-myc* y *c-jun*, que juegan un papel fundamental en la transición G1-S del ciclo celular. Al fosforilarlos, los marca para su degradación en el proteosoma, de manera que AKT fosforilando e inhibiendo a GSK3 $\beta$  facilita la entrada en la fase S y la progresión del ciclo celular<sup>492,493</sup>.

Tal y como se observa en la figura 8, en los corazones perinatales P0 *Endog*<sup>-/-</sup>, cuando todavía los cardiomiocitos deberían estar dividiéndose a gran velocidad, hay una disminución de la fosforilación activadora de AKT (Ser473), de manera que su sustrato GSK3 $\beta$  también está menos fosforilado en la Ser9/21 y su activación lleva a una menor expresión de la ciclina D1 (CycD1), dificultando así la transición G1-S. Por otro lado, la expresión de ciclina B1 (CycB1) y de CDK1, no está disminuída en los corazones perinatales P0 *Endog*<sup>-/-</sup>, sino que es a P3 cuando se produce una caída de CycB1 y CDK1 y, por tanto, de su fosforilación en el residuo Y15; de modo que la transición G2-M en la que participan no está entorpecida hasta 3 días después del nacimiento donde la caída parece resultar de la detención completa del ciclo celular.

Estos resultados indican que justo en el momento del nacimiento, en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> ya se detecta una disminución de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1, o lo que es lo mismo, una caída en la actividad que está regulando el punto de control

celular G1-S y que termina unos días más tarde (P3) por frenar todo el ciclo, justo antes de que se produzca la salida natural del ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales.

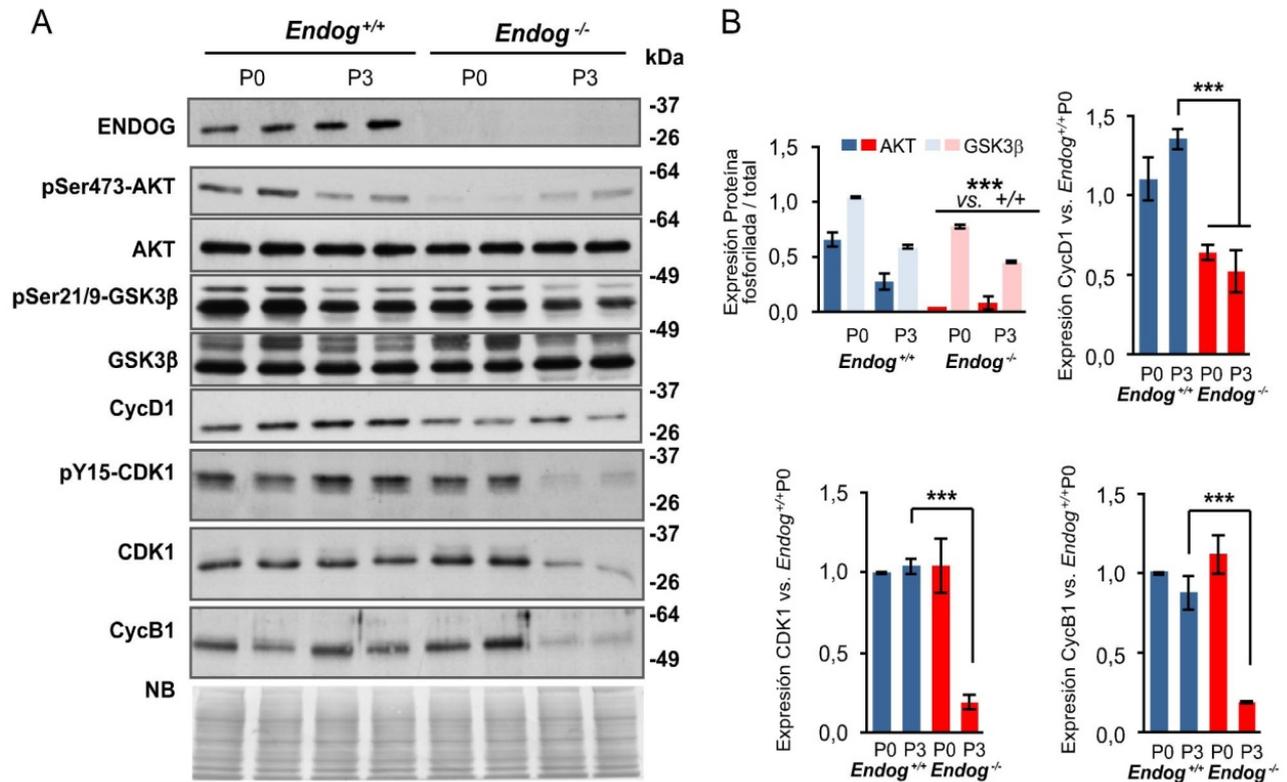


Figura 8. Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3β y de los reguladores del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CycB1 y CDK1, en corazones neonatales (P0-P3) de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. **A.** Los extractos totales de proteína procedentes de corazones neonatales de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. n=3. **B.** Análisis densitométrico de los *westerns blots* de pSer473-AKT, AKT, pSer21/9-GSK3β, GSK3β, CycD1, CDK1 y CycB1. n=3. n= número de experimentos independientes realizados. NB: Azul de naftaleno. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*\*\*p<0.001.

#### 4.2. El incremento de tamaño de los cardiomiocitos neonatales primarios *Endog*<sup>-/-</sup>

Como se ha comentado a lo largo del capítulo 4, la vía PI3K/AKT se activa por la mayoría de agonistas que inducen hipertrofia cardiaca, incluyendo la sobrecarga hemodinámica. AKT es capaz de activar a mTOR, un regulador central de la síntesis proteica por sus efectos sobre la biogénesis de ribosomas y la maquinaria de traducción de proteínas. Pero también fosforila e inhibe a GSK3β promoviendo la traducción de factores de transcripción relacionados con la inducción del programa hipertrófico.

Nuestros resultados indican que la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 se encuentra disminuída en corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 8), y se asocia a una pérdida de la capacidad proliferativa y a una salida del ciclo celular de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> durante las etapas embrionaria y perinatal; sin embargo, los cardiomiocitos de los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> son más grandes (figura 1A), y expresan más genes y proteínas que participan en el incremento de tamaño de los mismos (figura 1B), apuntando hacia una señalización hipertrófica que no sigue una vía clásica.

El incremento en la producción de ROS en los cardiomiocitos hipertrofiados *Endog*<sup>-/-</sup> y cardiomiocitos primarios de rata transducidos con los *Endog shRNA* (figura 5A y 5C), así como la reducción de su tamaño al ser tratados con un agente neutralizador de ROS, la N-acetil-L-cisteína (NAC), nos sugiere que las ROS pueden estar modulando las actividades de diversas moléculas y señales de transducción que llevan al agrandamiento de los cardiomiocitos deficientes en ENDOG (figura 5B y 5D). Como se ha detallado en el capítulo 4.4, estudios recientes han demostrado que las modificaciones dependientes de ROS y las fosforilaciones en las HDAC de clase II cooperan para controlar la expresión génica y, por ende, la hipertrofia cardiaca. Concretamente, durante una situación de estrés oxidativo HDAC4 se oxida rápidamente y se exporta al citosol, donde ya no puede suprimir la actividad de los reguladores positivos de la hipertrofia cardiaca, NFAT y MEF2<sup>266</sup>. Estos resultados proporcionan una nueva visión acerca del mecanismo a través del cual la señalización redox regula el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, y nos ha llevado a estudiar si las HDAC de clase II regulan el crecimiento de los cardiomiocitos deficientes en ENDOG mediante un mecanismo redox dependiente.

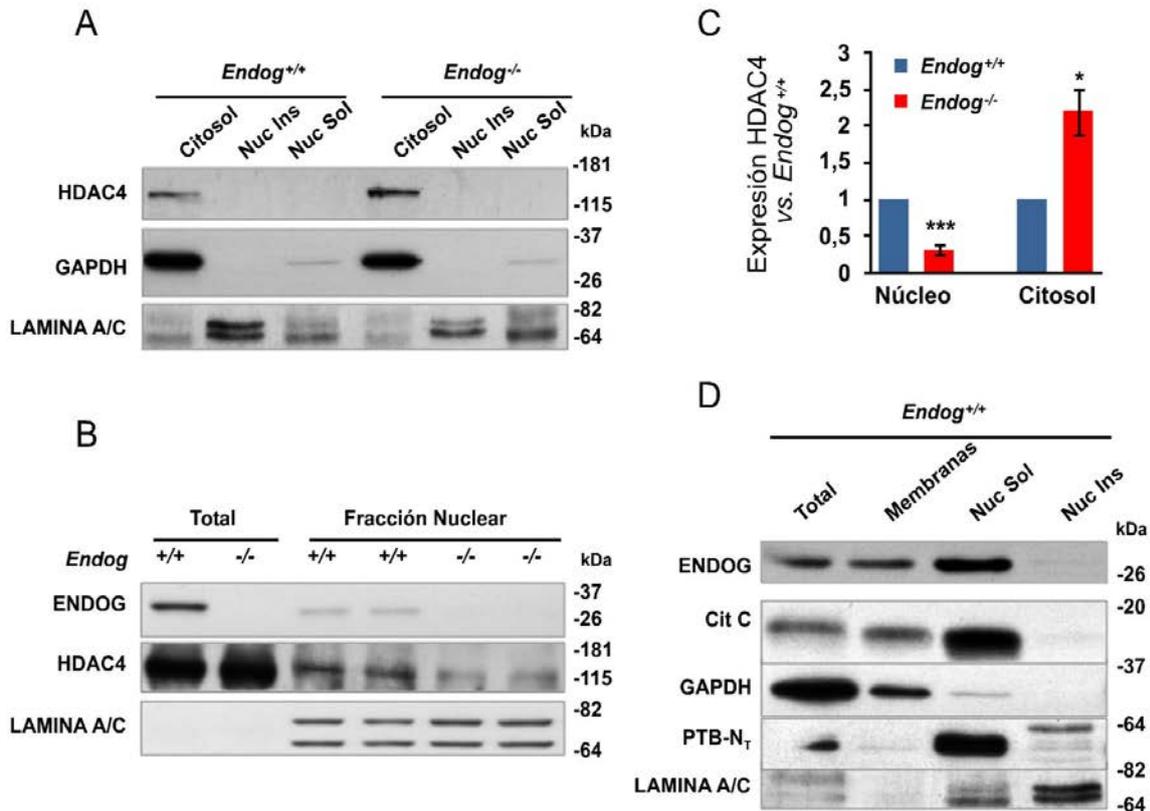
Con ese fin hemos analizado la abundancia de HDAC4 en la fracción citosólica y nuclear de cardiomiocitos neonatales primarios *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. El análisis de la expresión de HDAC4 mediante *western blot* en extractos proteicos de las diferentes fracciones subcelulares obtenidas con el kit *Subcellular protein fractionation for cultured cells* (Thermo scientific), indica que HDAC4 es más abundante en el citosol de los cardiomiocitos primarios *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 9A y 9C ); sin embargo, la división de la fracción nuclear en fracción nuclear soluble (Nuc Sol) e insoluble (Nuc Ins) que se obtiene con este kit comercial de subfraccionamiento, nos impide analizar la expresión nuclear de HDAC4 ya que no observamos banda en la imagen de *western blot* (figura 9A). La extracción nuclear a partir de un protocolo de subfraccionamiento que incluye al

detergente NP-40 nos permite estudiar su expresión en el núcleo de cardiomiocitos primarios *Endog*<sup>-/-</sup>, en donde esta HDAC de clase II se encuentra disminuída respecto a la fracción nuclear de cardiomiocitos primarios *Endog*<sup>+/+</sup> (figura 9B y 9C).

La mayor presencia de HDAC4 fuera del núcleo, junto a una mayor abundancia de ROS en los cardiomiocitos primarios *Endog*<sup>-/-</sup>, nos sugiere que esta acumulación citosólica de HDAC4 se produce por un mecanismo de oxidación en respuesta a ROS, desbloqueándose la expresión de genes prohipertróficos que llevan a un aumento de tamaño de los cardiomiocitos con nula o escasa expresión de ENDOG. De manera que, pese a que la vía AKT-GSK3 $\beta$  está silenciada en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> explicando la insuficiente proliferación de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> durante la etapa embrionaria y perinatal, al mismo tiempo parece existir otra vía independiente que está permitiendo que estos cardiomiocitos se hipertrofien en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> en desarrollo.

Por último, señalar en este apartado que en las diferentes fracciones subcelulares se han utilizado controles para demostrar el enriquecimiento de cada una de ellas detectando la expresión de proteínas que son específicas para cada una de las partes: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como marcador citosólico, Lamina A/C como marcador de membrana nuclear o fracción insoluble nuclear, proteína de unión al tracto de polipirimidinas (PTB-N<sub>i</sub>) como marcador de fracción nuclear soluble y Citocromo C (Cit C) como marcador mitocondrial. En la fracción nuclear de los cardiomiocitos primarios *Endog*<sup>+/+</sup> (figura 9B) se observa una ténue banda que indica una localización nuclear para ENDOG. Existe una extensa bibliografía, en la que se incluyen artículos publicados por nuestro grupo<sup>451,471</sup>, en los que se demuestra que ENDOG se localiza en el interior de las mitocondrias, si bien es cierto que en los últimos años se han publicado artículos en los que se enseña una pequeña presencia de ENDOG en el núcleo de células viables, no apoptóticas, indicando que su función en ellas no sólo se restringe a la degradación del ADN<sup>454,455,459,460</sup>. La localización nuclear de ENDOG en la fracción nuclear soluble (figura 9D) puede explicarse gracias al marcador mitocondrial Citocromo C (Cit C). El Cit C es una proteína que se localiza exclusivamente en las mitocondrias de células viables, de manera que su presencia en la fracción nuclear soluble indica que en la purificación de los núcleos se han arrastrado mitocondrias (seguramente aquellas que están unidas a la membrana nuclear), pero además, debido a la intensidad de la banda y al pequeño tamaño del Cit

C (12 Kda) es muy probable que en el proceso de purificación de la fracción mitocondrial se haya perdido una pequeña parte apareciendo en otro compartimento celular. Esto hace que no podamos descartar ni afirmar la existencia de ENDOG en el núcleo de cardiomiocitos no apoptóticos, siendo en todo caso su presencia minoritaria respecto a la mitocondria.



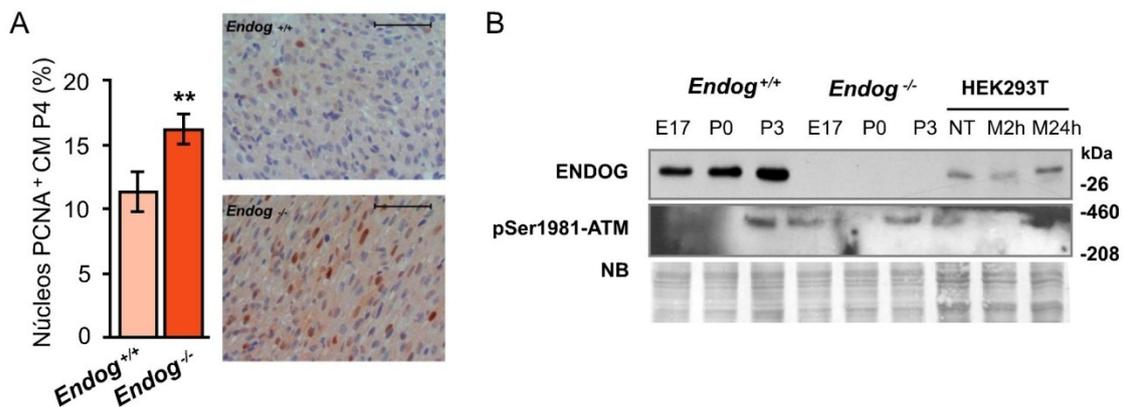
**Figura 9. Localización subcelular de ENDOG y HDAC4 en cardiomiocitos neonatales primarios de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.** A.D. Análisis de la expresión de HDAC4 (A) y ENDOG (D) mediante *western blot*, en extractos proteicos de diferentes partes subcelulares de cardiomiocitos neonatales obtenidas con el kit *Subcellular protein fractionation for cultured cells* (Thermo scientific). n=2. **B.** Análisis de la expresión de HDAC4 mediante *western blot*, en extractos proteicos nucleares de cardiomiocitos neonatales obtenidos siguiendo un protocolo de subfraccionamiento celular con NP-40. n=2. Para demostrar el enriquecimiento en cada una de las partes celulares se han hecho *westerns blots* con anticuerpos contra proteínas presentes específicamente en cada una de estas partes celulares. GAPDH: marcador citosólico. LAMINA A/C: marcador de membrana nuclear y fracción insoluble nuclear. PTB-N<sub>T</sub>: marcador de fracción soluble nuclear. Cit C: marcador mitocondrial. **D.** Análisis densitométrico de los *westerns blots* de HDAC4. n=2. Nuc Sol: fracción nuclear soluble. Nuc Ins: fracción nuclear insoluble. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p≤0.05, \*\*\*p≤0.001.

### 4.3 La activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR) en corazones *Endog*<sup>-/-</sup>

Para confirmar el resultado obtenido acerca del reducido número de cardiomiocitos presentes en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 1E), se analizó la expresión del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) junto al marcador de proliferación celular Ki-67 en corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. PCNA interacciona con las ADN polimerasas implicadas en el proceso de replicación del ADN, Pol δ y Pol ε, mejorando de esta manera su unión al ADN y aumentando su procesividad durante el proceso replicativo<sup>494</sup>, de modo que se utiliza regularmente en investigación como un marcador de proliferación celular; sin embargo, en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> la expresión de PCNA aparece incrementada (figura 10A) pese a que la expresión de Ki-67 está disminuída en ellos, así como la expresión del gen *POLD1* que participa en la replicación del ADN (figura 1F), sugiriéndonos un papel de PCNA no relacionado con el proceso replicativo en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>. Se ha descrito que PCNA también participa en la reparación del ADN donde es imprescindible para la identificación de una lesión, estableciendo el orden de intervención de las proteínas de reparación y estimulando la actividad de éstas<sup>495,496,497,498</sup>, advirtiéndonos así de posibles daños en el ADN de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> que requerirían de un proceso de reparación.

El aumento en la producción de ROS observado en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 5A), junto a la publicación de un estudio<sup>136</sup> (comentado en el capítulo 3.3 de la introducción) en el que se propone que el incremento en el contenido de oxígeno ambiental tras el nacimiento conduce a la activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR) a través de las ROS y ésta a la detención del ciclo celular de los cardiomiocitos, nos llevó a estudiar si en los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> la vía DDR podía estar activada, y de ahí el incremento en la expresión de PCNA en ellos, lo que podría conducir a la salida prematura del ciclo celular observada en los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 8A). Las ROS son la fuente principal de roturas de simple cadena (SSBs) en el ADN, y aunque se pueden reparar muy eficientemente, si el sistema de reparación falla, durante la replicación se pueden convertir en roturas de doble cadena (DSBs), cuyos efectos son mucho más graves. En respuesta a las DSBs, la proteína de la ataxia telangiectasia mutada (ATM) actúa rápidamente como mediador esencial de la activación de la respuesta al daño en el ADN y del sistema de control de la progresión del ciclo celular en respuesta a este daño, sufriendo una autofosforilación intermolecular en la serina 1981 (Ser1981) que resulta en una disociación del dímero en monómeros activos<sup>499</sup>.

Como se observa en la figura 10B, alrededor del tercer día postnatal (P3) se produce un incremento significativo de la fosforilación activadora de ATM (Ser1981) en los corazones *Endog*<sup>+/+</sup>, tal y como ha sido descrito por otros investigadores<sup>136</sup> a consecuencia del daño oxidativo en el ADN causado por el aumento en la respiración mitocondrial tras el nacimiento que conduce a la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos; sin embargo, en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> no se observa un patrón claro de activación de ATM, ya que la fosforilación en el residuo de Ser1981 no aparece aumentada en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> a P0 y P3 respecto a los corazones *Endog*<sup>+/+</sup>, estando en consonancia con nuestro anterior resultado en el que la expresión de ciclina B1 y CDK1, sobre las que actúa la vía activada por ATM (ATM-CHK2-CDC25C-inhibición CDK1-inhibición complejo CDK1/ciclina B ó ATM-p53-(p21-14-3-3-GADD45)-inhibición CDK1-inhibición complejo CDK1/ciclina B) se encuentra disminuída 3 días después del nacimiento como consecuencia de la detención completa del ciclo celular y no de la activación de la respuesta al daño en el ADN de los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>.



**Figura 10. Análisis de la expresión de proteínas de respuesta al daño en el ADN (DDR) en corazones neonatales (E17-P0-P3) de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.** **A.** Porcentaje de células positivas para PCNA e imágenes de la inmunohistoquímica contra PCNA en corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. Las células positivas presentan marcaje marrón y los núcleos sin marcar se visualizan en azul. Barra de escala: 100um. n=5. **B.** Los extractos totales de proteína procedentes de corazones neonatales de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. Como control positivo se ha utilizado un tratamiento con Menadiona (100 uM) durante 2 y 24 horas en células HEK293T. n=2. CM: cardiomiocitos. NT: No tratado. M: menadiona. NB: Azul de naftaleno. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*\*p≤0.01.

## 5. Estudio de los efectos de la disminución de ROS sobre las vías de señalización alteradas por la falta de ENDOG

### 5.1. En los cardiomiocitos primarios de rata con reducida expresión de ENDOG

La confirmación definitiva de que las ROS actúan como intermediarias del rol biológico de ENDOG sería la detección de una activación en la vía de señalización que lleva a la recuperación parcial de la proliferación celular observada en células deficientes en ENDOG, cuando se disminuye en ellas la abundancia de las ROS con el agente neutralizador NAC.

Para demostrar ésto, en primer lugar se ha determinado si la señalización en la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 que aparece disminuída en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 8) está influenciada por el aumento en la producción de ROS, analizando así la actividad de esta vía en cardiomiocitos neonatales de rata transducidos lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *Endog shRNA 1 y 2* en presencia del agente reductor NAC (0.5mM), ya que el bajo rendimiento que se obtiene en el aislamiento de cardiomiocitos a partir de corazones neonatales de ratón nos impide disponer de suficientes células para realizar en paralelo el tratamiento con NAC y la posterior caracterización de la señalización mediante *western blot* en cardiomiocitos neonatales primarios *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.

Como se observa en la figura 11A-B, en los cardiomiocitos primarios de rata transducidos con los *Endog shRNA 1 y 2*, y en ausencia de un tratamiento con NAC, hay una disminución de la fosforilación activadora de AKT (Ser473) que conlleva una disminución de la fosforilación inhibitoria de GSK3 $\beta$  (Ser9/21) y una menor expresión de la ciclina D1 (CycD1). También la expresión de CDK1, así como su fosforilación en el residuo de Y15, está disminuída en los cardiomiocitos primarios de rata transducidos con los *Endog shRNA 1 y 2*, mostrando el mismo patrón de expresión observado en los corazones neonatales P3 *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 8). La presencia del agente reductor NAC en los cardiomiocitos transducidos con los *Endog shRNA 1 y 2* aumenta la fosforilación del residuo de Ser473 de AKT, así como la fosforilación del residuo de Ser9/21 de GSK3 $\beta$  de manera significativa, pero no la expresión de ENDOG reducida mediante transducción lentiviral en estos cardiomiocitos, por lo tanto, los cambios detectados en las fosforilaciones de estas proteínas son debidos al efecto del tratamiento con NAC y no a una recuperación de la expresión de ENDOG. Por otro lado, la expresión disminuída de ciclina D1 (CycD1) y CDK1, así como su fosforilación en el residuo de Y15, no se recupera en presencia del agente reductor NAC, de manera que el tratamiento con este

neutralizador de ROS sólo obstaculiza los efectos sobre la fosforilación de AKT y GSK3 $\beta$  provocados por la deficiencia de ENDOG en cardiomiocitos primarios de rata.

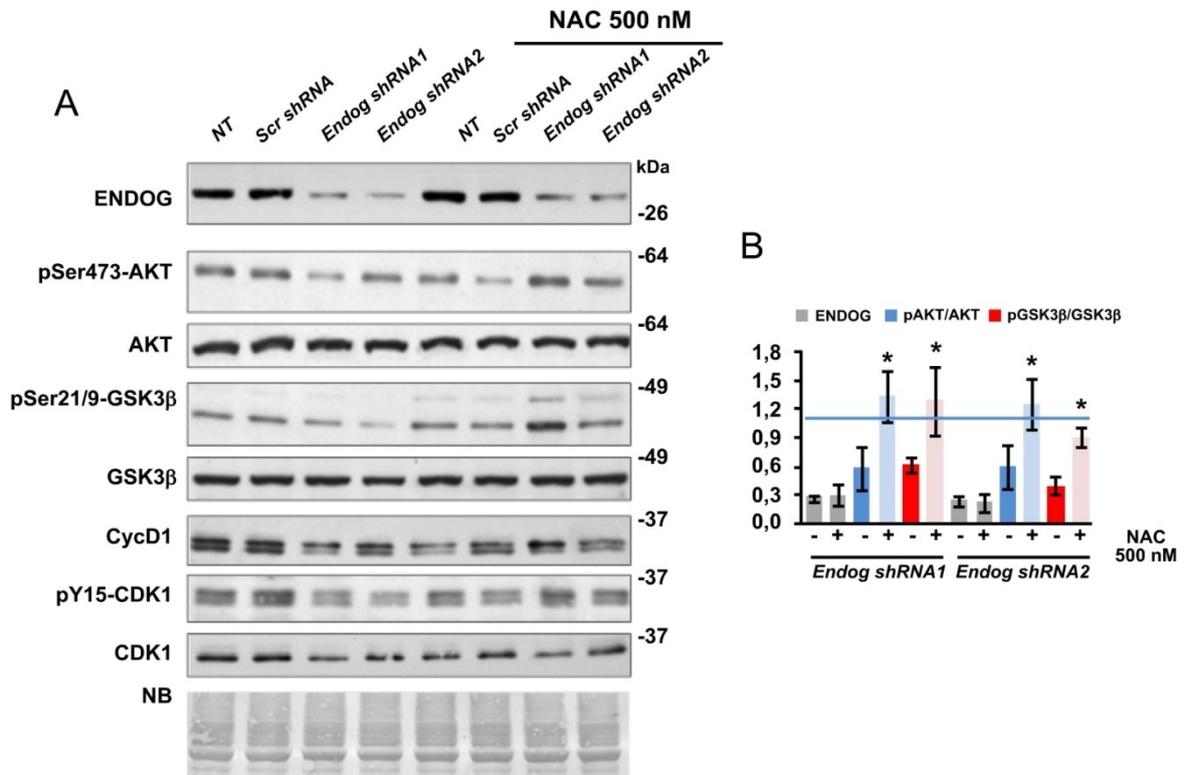


Figura 11. Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$  que termina en el control de la expresión de ciclina D1 (CycD1), así como del regulador del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CDK1, en cardiomiocitos neonatales primarios de rata transducidos lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1* y *2*. **A**. Los extractos totales de proteína procedentes de los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata transducidos lentiviralmente y tratados con NAC (0.5mM) durante 12 horas, se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. n=3. **B**. Análisis densitométrico de los *westerns blots* de ENDOG, pSer473-AKT, AKT, pSer21/9-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ . n=3. NB: Azul de naftaleno. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo  $*p \leq 0.05$ .

Hay que tener presente que a diferencia de la señalización caracterizada a partir del extracto total de proteína obtenido de los corazones neonatales de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 8), a una edad en la que los cardiomiocitos aún deben mantener su capacidad proliferativa (P0), el análisis de la señalización en cardiomiocitos de rata transducidos con los *Endog shRNA 1 y 2* se hace a partir del extracto total de proteína obtenido del cultivo primario de cardiomiocitos aislados de corazones de rata (figura 11), por tanto, a partir de cardiomiocitos que son forzados a diferenciarse por su mantenimiento *in vitro*. De modo que los posibles cambios en la recuperación de la expresión y/o fosforilación de proteínas que favorecen los procesos de proliferación y división celular en presencia de NAC se ven dificultados por el proceso de diferenciación que sufren los cardiomiocitos de rata *in vitro*, no siendo así el mejor modelo celular para este estudio ya que tampoco nos permite asociar los cambios a una posible recuperación de la proliferación de los cardiomiocitos, puesto que no se realizan recuentos celulares en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata que son frenados por su propio mantenimiento *in vitro*.

Por ello, el siguiente paso ha sido analizar si en células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> el tratamiento con un agente reductor dificulta la disminución en la activación de la vía de señalización afectada por la falta de ENDOG, en paralelo a la recuperación parcial de la proliferación observada *in vitro* en estas células cuando son tratadas con NAC (figura 7B), permitiendo establecer una relación directa entre la abundancia de las ROS y el nivel de activación de la vía de señalización que controla la proliferación celular en ausencia de ENDOG.

## 5.2. En células humanas HEK293T- *Endog*<sup>-/-</sup>

El primer paso en las células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> a las que se les ha eliminado completamente el gen de *Endog* mediante los ARN guías *Endog sgRNA 1 y 2*, ha sido estudiar si igual que sucede en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup>, la vía AKT-GSK3 $\beta$  que acaba en el control de la expresión de la ciclina E1 (ya que en ellas prácticamente no se detecta la expresión de ciclina D1) se encuentra disminuída. Como se puede observar en la figura 12A, en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> hay una disminución de la fosforilación activadora de AKT (Ser473), así como de la fosforilación inhibitoria de GSK3 $\beta$  (Ser9/21) que conduce a una caída en la expresión de  $\beta$ -catenina y de ciclina E1 (CycE1), dificultando la transición G1-S. La expresión de la ciclina B1 (CycB1) también se

encuentra disminuída, sin embargo, mientras CDK1 se mantiene, su fosforilación inhibitoria en el residuo Y15 se ha reducido, indicando una cierta actividad por parte de CDK1 que de no ser por la bajada en la expresión de CycB1 permitiría la formación de un complejo activo CycB1-CDK1 y la progresión a través de la transición G2-M. Estos resultados están en consonancia con los perfiles de ciclo celular obtenidos en células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> (figura 2G) en los que disminuye el porcentaje de células presentes en la fase S del ciclo celular, y aumenta el porcentaje de células que se acumulan en las fases G1 y G2-M, siendo mayor el porcentaje de células retenido en la fase G1 del ciclo celular.

A continuación se ha analizado si la recuperación parcial de la proliferación celular observada en células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> cuando son tratadas con el agente reductor NAC (0.5mM), se corresponde con una mayor actividad de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycE1 en ellas (figura 12B-C). Tras 12 horas de tratamiento con NAC se produce un aumento en las fosforilaciones de AKT (Ser473) y GSK3 $\beta$  (Ser9/21), y un incremento en la expresión de  $\beta$ -catenina, ciclina E1 (CycE1) y ciclina B1 (CycB1), que van decayendo paulatinamente hasta alcanzar niveles similares a los observados en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> control (sin NAC) a las 24 horas de tratamiento. Este pico de activación en la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycE1, que se produce en un punto inicial del tratamiento con NAC y que no se mantiene a lo largo de las 48 horas que las células permanecen en cultivo en presencia del agente reductor, sugiere que sólo durante este periodo inicial (primeras 12 horas) se favorece un estado redox celular que promueve los procesos de división y proliferación en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, y posiblemente esclarece la observación de una recuperación parcial de la proliferación basada en recuentos celulares que se realizan a las 48 horas de añadir el agente reductor al cultivo celular.

Estos resultados demuestran una asociación directa entre una menor abundancia de ROS y una mayor actividad de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycE1 que conduce a una mayor proliferación celular en ausencia de ENDOG, y señalan a las ROS como intermediarias del rol biológico de ENDOG sobre la regulación de la proliferación celular, modulando las señales de transducción que conducen al defecto en proliferación observado en células deficientes en ENDOG.

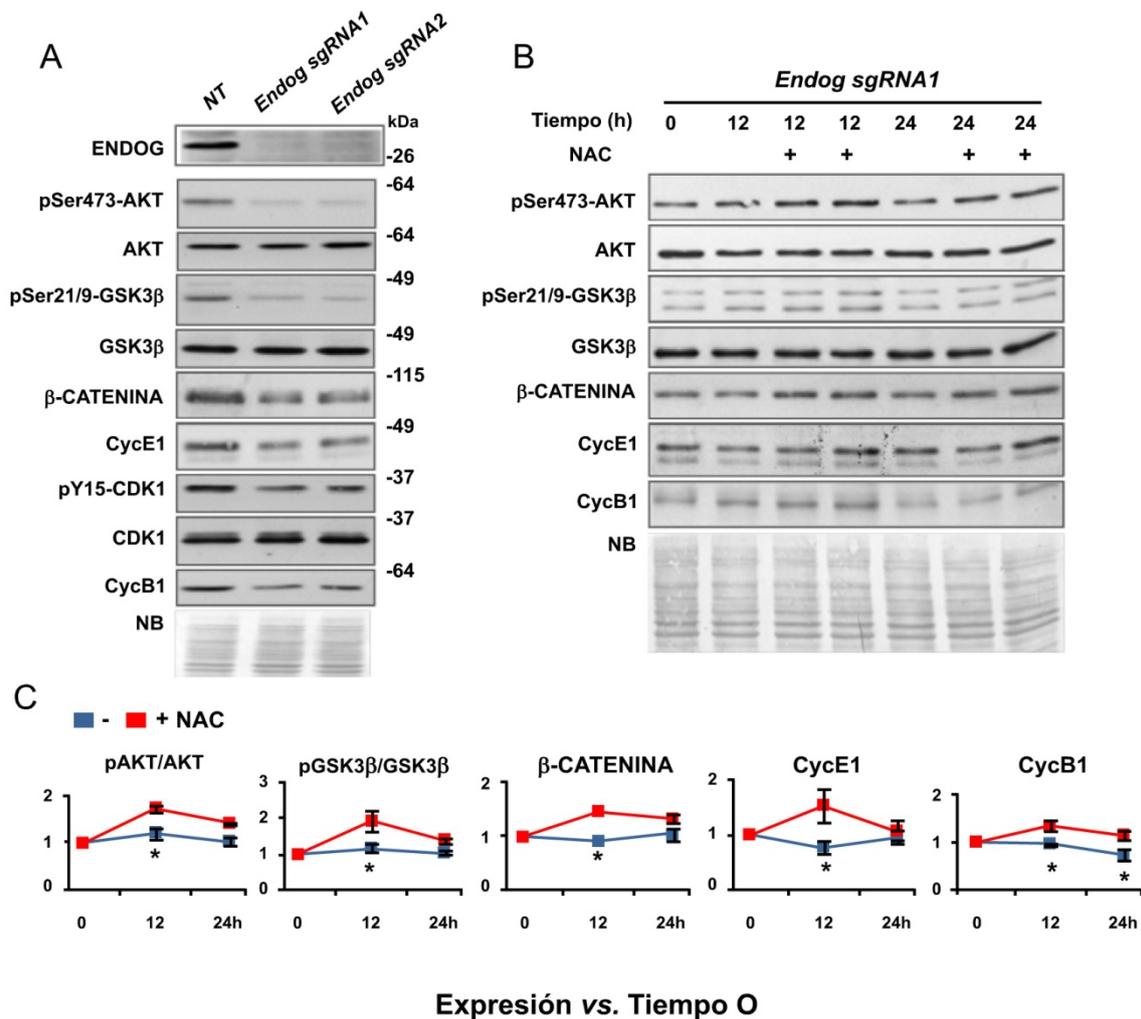


Figura 12. Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$  que termina en el control de la expresión de ciclina E1 (CycE1), así como de los reguladores del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CycB1 y CDK1, en células humanas HEK293T y HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>. **A.** Los extractos totales de proteína procedentes de células HEK293T y HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. n=3. **B.** Los extractos totales de proteína procedentes de células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> tratadas con NAC (0.5mM) durante 12 y 24 horas se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. n=3. **C.** Análisis densitométrico de los *westerns blots* de pSer473-AKT, AKT, pSer21/9-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, Ciclina E1 (CycE1) y Ciclina B1 (CycB1). n=3. NB: Azul de naftaleno. n= número de experimentos independientes realizados. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p $\leq$ 0.05.

### 5.3. En células tumorales humanas Ishikawa (IK) con reducida expresión de ENDOG

En la línea de células tumorales humanas Ishikawa (IK) la inactivación de PTEN es el defecto genético que las caracteriza, de modo que la ausencia de esta fosfatasa que regula negativamente la vía PI3K/AKT/mTOR conduce a la activación aberrante de AKT y a una actividad descontrolada de mTOR.

Como se ha explicado en el apartado 1.3 de los resultados, la reducción de la expresión de ENDOG en las IK dificulta la proliferación de éstas *in vitro* y limita su capacidad de generar tumores sólidos *in vivo* (figura 3), así que nuestro siguiente paso fue analizar si la ausencia de ENDOG en ellas conduce a una disminución de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -ciclina D1 que tienen activada por defecto.

El silenciamiento de ENDOG mediante el uso del vector lentiviral *Endog shRNA* 3 (figura 13A) disminuye la fosforilación activadora de AKT (Ser473) y, por consiguiente, la fosforilación inhibitoria de GSK3 $\beta$  (Ser9/21), reduciéndose la expresión de  $\beta$ -catenina y de ciclina D1 (CycD1). Del mismo modo que sucede en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> la expresión de la ciclina B1 (CycB1) también se encuentra disminuída, mientras que CDK1 se mantiene y su fosforilación inhibitoria en el residuo Y15 se reduce; sin embargo, pese a que la señalización sugiere que las transiciones G1-S y G2-M están dificultadas, en este caso el perfil de ciclo celular obtenido en células IK transducidas lentiviralmente con el *Endog shRNA* 3 (figura 3B) marca un aumento en el porcentaje de células que se acumulan en la fase S del ciclo celular.

A diferencia de lo que sucede en los fibroblastos primarios de piel *Endog*<sup>-/-</sup> y en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, la disminución de la producción de ROS mediante el tratamiento con NAC en células IK con una expresión reducida de ENDOG no produce una recuperación de la proliferación celular (figura 7D), cierto es que la caída en los niveles citoplasmáticos de ROS con el agente reductor NAC es pequeña (figura 7C). La caracterización de la vía AKT-GSK3 $\beta$  que acaba en el control de la expresión de la ciclina D1 en células IK transducidas lentiviralmente con el *Endog shRNA* 3 en presencia de NAC (figura 13B y C) no revela cambios en las fosforilaciones de AKT (Ser473) y GSK3 $\beta$  (Ser9/21), y aunque a las 12 horas de tratamiento se aprecia un ligero incremento en la expresión de  $\beta$ -catenina, ciclina D1 (CycD1) y ciclina B1 (CycB1) en ningún caso es significativo, de manera que el tratamiento con NAC en células IK con una expresión reducida de ENDOG no conduce a una mayor actividad de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1, acorde a la inexistente recuperación de la proliferación observada en estas células.

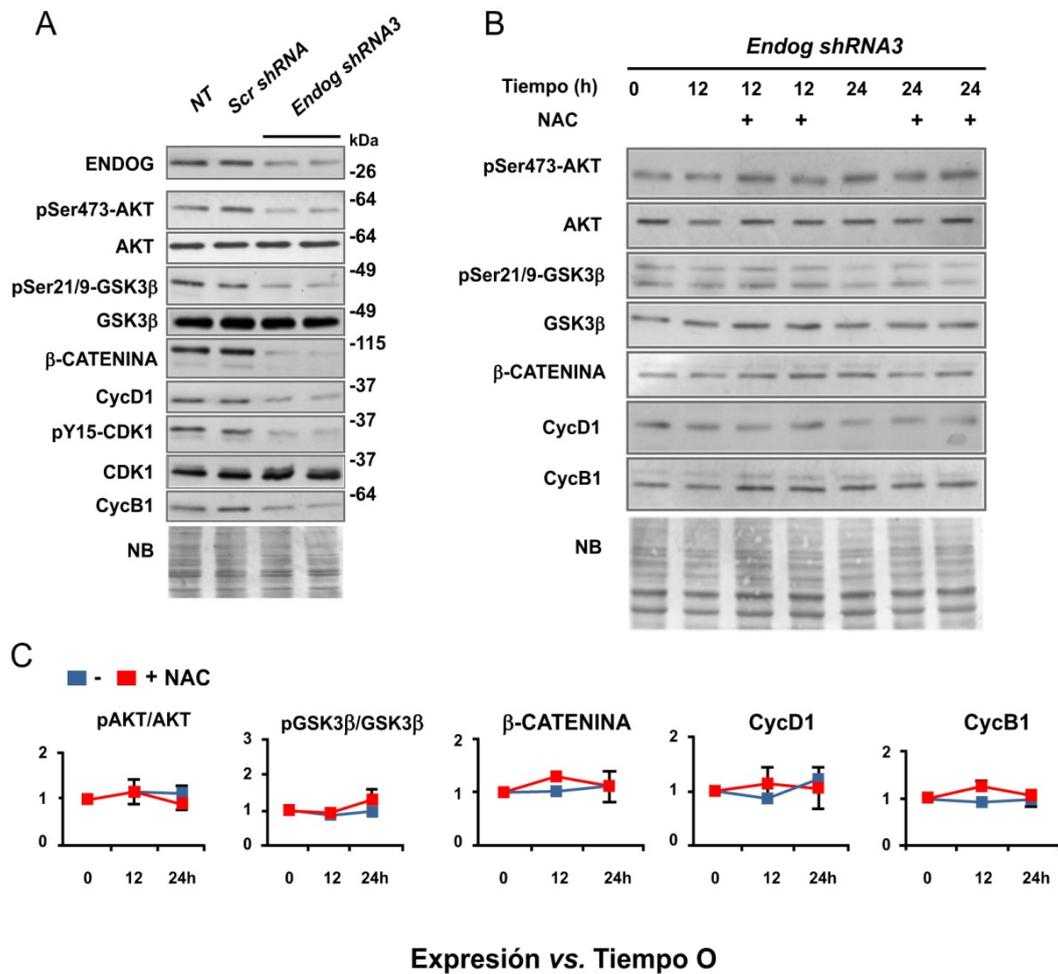


Figura 13. Expresión de las principales quinasas de la vía AKT-GSK3 $\beta$  que termina en el control de la expresión de ciclina D1 (CycD1), así como de los reguladores del ciclo celular en la etapa de transición G2-M, CycB1 y CDK1, en células IK con una reducida expresión de ENDOG. **A.** Los extractos totales de proteína procedentes de células IK transducidas lentiviralmente con el *shRNA* control, *Scr shRNA*, y el *shRNA* de *Endog 3*, se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. n=3. **B.** Los extractos totales de proteína procedentes de células IK transducidas con el *shRNA* de *Endog 3* y tratadas con NAC (0.5mM) durante 12 y 24 horas se analizaron mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas indicadas en el panel. n=3. **C.** Análisis densitométrico de los *westerns blots* de pSer473-AKT, AKT, pSer21/9-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, Ciclina D1 (CycD1) y Ciclina B1 (CycB1). n=3. NB: Azul de naftaleno. n= número de experimentos independientes realizados.

## 6. Función mitocondrial de ENDOG

Para poder entender la manera en que ENDOG, una nucleasa mitocondrial, puede regular los niveles celulares de ROS que conducen a los efectos biológicos descritos sobre el crecimiento y la división celular, profundizamos en el estudio de cómo su expresión puede afectar a la biología del ADNmit.

Como se ha comentado en la introducción a lo largo del capítulo 7, diferentes publicaciones han sugerido una posible participación de ENDOG en los procesos de replicación, reparación y recombinación del ADNmit; sin embargo, se trata de estudios muy forzados *in vitro* que se centran principalmente en su actividad endonucleasa sobre el ADNmit, quedando pendientes de una confirmación definitiva *in vivo*.

Del mismo modo, resultados previos publicados por nuestro grupo<sup>471</sup> demuestran una reducción de aproximadamente el 30% en el contenido de ADNmit en los corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup>, basándose en el ratio del ADNmit respecto al ADN genómico obtenido a partir de tejido, pero sin que la expresión de los principales reguladores del programa de biogénesis mitocondrial PGC1- $\alpha$ , NRF1 y TFAM se encuentre disminuída en estos corazones y, por tanto, sugiriendo que el efecto en el número de copias de ADNmit es debido a una posible función de ENDOG en el mantenimiento del genoma mitocondrial, y no a un menor número de mitocondrias en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>.

Puesto que aún hoy sigue sin adjudicarse un papel concreto a ENDOG en la regulación de la función mitocondrial, hemos analizado cómo su expresión modula el metabolismo del ADNmit a través de su posible función en el mantenimiento (procesos de reparación y replicación del ADNmit) y expresión del genoma mitocondrial.

### 6.1. En la reparación del ADNmit

Mutaciones puntuales en genes del ADNmit que codifican para proteínas, tRNAs y rRNAs, así como reorganizaciones (deleciones y duplicaciones) del genoma mitocondrial, pueden terminar provocando un fenotipo molecular de depleción mitocondrial.

Por este motivo se ha secuenciado el genoma mitocondrial completo de los corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> y se han analizado posibles diferencias en función del genotipo (figura 14), detectándose únicamente una mutación simple (59C>T) en heteroplasmia dentro del gen que codifica para el tRNA<sup>Phe</sup> pero en proporciones similares en los corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>, indicando que la

secuencia del genoma mitocondrial entre ellos es prácticamente indistinguible y que posibles daños que conducen a mutaciones puntuales y/o reorganizaciones del genoma mitocondrial por incompetencia de la maquinaria de reparación, como puede ser el daño oxidativo causado por ROS que genera transversiones (GC→TA), son eficientemente reparados y, por tanto, descarta un papel de ENDOG en el proceso de reparación del ADNmit.

	<i>Endog</i> <sup>+/+</sup>		<i>Endog</i> <sup>-/-</sup>	
	Cases	% heteroplasmy	Cases	% heteroplasmy
<b>m.59C&gt;T</b>	2/8	6-8%	4/8	2-18%

Figura 14. Secuenciación del genoma mitocondrial completo a partir 8 corazones neonatales de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> mediante la plataforma MiSeq de Illumina.

## 6.2. En la replicación del ADNmit

Para estudiar el papel de ENDOG en la replicación del ADNmit se aislaron mitocondrias directamente de corazones adultos *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> y se mantuvieron en un medio de cultivo con un nucleótido marcado ((metil-<sup>3</sup>H)dTTP), permitiendo el seguimiento del proceso replicativo *in vitro* a través de la cuantificación de la incorporación de este nucleótido marcado a la cadena de ADNmit naciente de mitocondrias *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.

Estas mitocondrias libres de la influencia del núcleo-citoplasma replican el ADNmit de un modo similar a como sucede *in vivo*, y la cuantificación de la incorporación del nucleótido marcado (metil-<sup>3</sup>H)dTTP a la cadena de ADNmit naciente revela que las mitocondrias *Endog*<sup>-/-</sup> tienen una reducida capacidad de síntesis del ADNmit, es decir, que su proceso replicativo es mucho más lento en ausencia de ENDOG. Este es el primer dato que se tiene de una función en el control de la replicación del genoma mitocondrial que se le puede asignar a la nucleasa mitocondrial ENDOG.

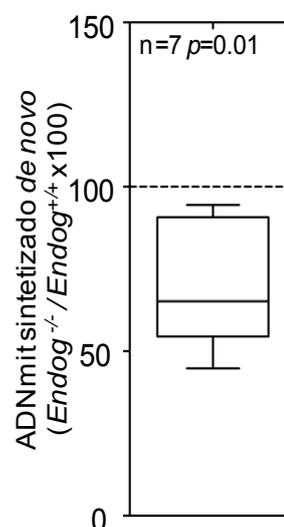
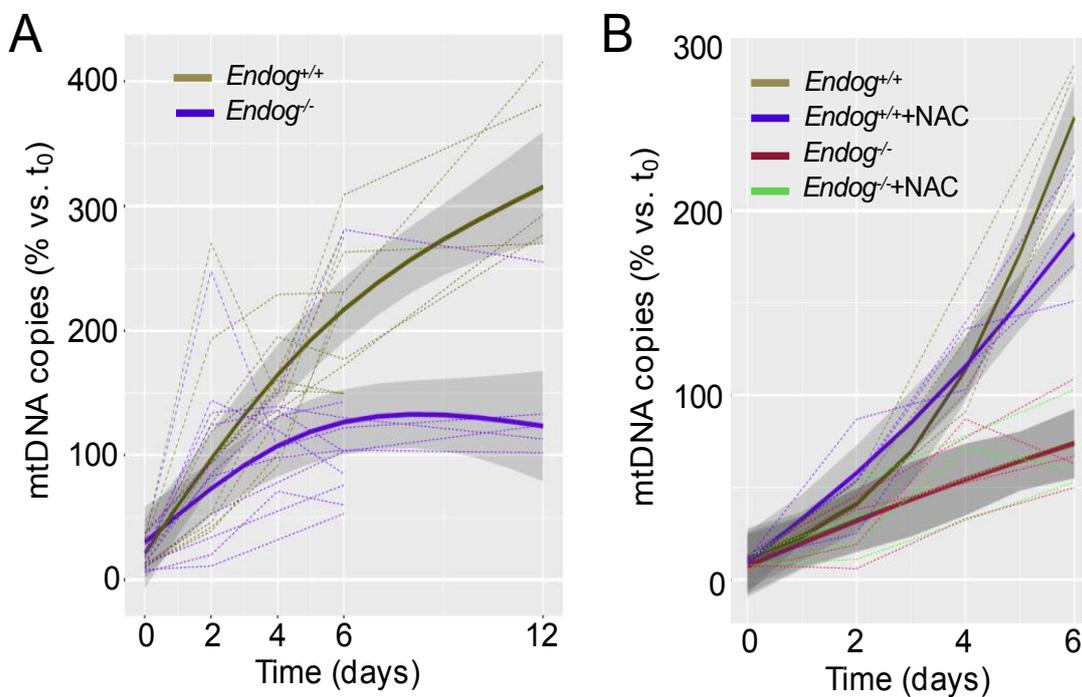


Figura 15. Cuantificación de la incorporación de (metil-<sup>3</sup>H)dTTP a la cadena de ADNmit naciente de mitocondrias aisladas de 7 corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (fmoles de (metil-<sup>3</sup>H)dTTP por ng de ADNmit). Análisis estadístico con el t-student siendo \*\*p≤0.01.

A continuación se utilizó un enfoque alternativo para confirmar el papel de ENDOG en la replicación mitocondrial, deplecionando el ADNmit de fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> y cuantificando la recuperación posterior del número de copias de ADNmit en estas células. Para ello los MEFs *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> fueron tratados durante 1 semana con Bromuro de Etidio (BrEt), a una concentración de 25ng/ml que permite reducir los niveles de ADNmit hasta alcanzar un mínimo similar en los fibroblastos de ambos genotipos, a partir del cual se inicia una recuperación del número de copias de ADNmit hasta alcanzar los valores normales para cada tipo celular una vez se ha retirado el BrEt del medio de cultivo.



**Figura 16.** Recuperación del número de copias de ADNmit en fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> tras su depleción transitoria con Bromuro de Etidio (BrEt). **A.** Los MEFs de 7 ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se mantienen en cultivo con BrEt (25ng/ml) durante 1 semana hasta alcanzar niveles mínimos y similares en el contenido de ADNmit de ambos genotipos, momento a partir del cual se retira el BrEt del medio de cultivo (tiempo 0) y se recogen muestras de MEFs *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> en paralelo cada 2 días durante 2 semanas, cuantificándose mediante PCR en tiempo real (qPCR) el número de copias de ADNmit que contienen estos fibroblastos embrionarios *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. **B.** Los MEFs de 5 ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> a los que se les ha deplecionado transitoriamente el ADNmit con BrEt, se mantienen en cultivo sin y con el agente reductor NAC a partir del momento que se retira del medio el BrEt (tiempo 0), renovándose el tratamiento con NAC cada día a lo largo de 1 semana en la que se recogen muestras cada 2 días para cuantificar mediante PCR en tiempo real (qPCR) el número de copias de ADNmit presente en los MEFs *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. Los análisis de las trayectorias a lo largo del tiempo se han realizado con el software R (R Core Team).

Como se observa en la figura 16A la falta de ENDOG dificulta la recuperación del número de copias de ADNmit en los fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup>, estancándose los niveles de ADNmit en ellos a los 8 días de la retirada del BrEt, y no logrando alcanzar los valores presentes en los fibroblastos *Endog*<sup>+/+</sup> ni siquiera 12 días después del inicio del proceso de recuperación del número de copias de ADNmit; asimismo, el tratamiento de los MEFs *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> con el agente reductor NAC durante los 6 días siguientes a la retirada del BrEt del medio de cultivo no mejora la recuperación del número de copias de ADNmit en los fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 16B). Estos resultados sugieren un papel de ENDOG en el mantenimiento del genoma mitocondrial, concretamente en la replicación del ADNmit, puesto que ni la protección frente a un posible daño oxidativo en las moléculas de ADNmit con el agente reductor NAC, con el que se observa una recuperación parcial de la proliferación celular en fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 2C), se consigue una recuperación del número de copias de ADNmit en ausencia de ENDOG.

Finalmente, para determinar si la función de ENDOG en la replicación mitocondrial está por encima de los efectos observados en la división celular, analizamos la capacidad proliferativa de la línea celular Rat2-Rho(0) en ausencia de ENDOG. La línea celular Rat2-Rho(0) son fibroblastos de rata, Rat-2, a los que se les ha eliminado completamente el ADNmit mediante un tratamiento prolongado con BrEt, de manera que se caracterizan por una actividad reducida o ausente de los complejos de la cadena de transporte electrónico, pero que sobreviven y proliferan lentamente si se les proporciona piruvato y uridina en el medio de cultivo. El primero es necesario para la regeneración del NAD<sup>+</sup> y así que la glicólisis funcione eficientemente como fuente generadora de ATP y, el segundo, porque la síntesis de *novo* de uridina requiere de una cadena respiratoria funcional<sup>500</sup>.

Una vez corroborada la depleción del ADNmit en las células Rat2-Rho(0), confirmando que los niveles de expresión de ENDOG son similares en las líneas Rat2 y Rat2-Rho(0) puesto que se trata de un nucleasa mitocondrial codificada por un gen nuclear (figura 17A), y que la expresión de la citocromo C oxidasa (COXIV) está disminuída en las células Rat2-Rho(0) al estar formada por algunos componentes codificados por el genoma mitocondrial, se determinó la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ Red y DHE respectivamente.

Como se aprecia en la figura 17B, no hay un incremento en los niveles del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) citoplasmático en células Rat2-Rho(0) que tienen disminuída la expresión de ENDOG, a diferencia del aumento observado anteriormente en células Rat-2 con insuficiente expresión de ENDOG (figura 6C); sin embargo, sí que se produce un pequeño incremento significativo del anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) mitocondrial en células Rat2-Rho(0) transducidas con los *Endog shRNA 1 y 2*, siendo este incremento mínimo respecto al obtenido en células Rat-2 deficientes en ENDOG (figura 6C). Estos resultados por un lado, sugieren algún componente y/o función codificado por el genoma mitocondrial como responsable de la generación de ROS en ausencia de ENDOG y, por otro lado, señalan que posiblemente las ROS cuantificadas en el citoplasma de las células Rat-2 transducidas con los *Endog shRNA 1 y 2* procedan de la mitocondria.

Seguidamente se analizó la capacidad de división celular de las células Rat2-Rho(0) cuando se reduce en ellas la expresión de ENDOG (figura 17C). Mientras que los fibroblastos Rat-2 transducidos lentiviralmente con los *Endog shRNA 1 y 2* completan un menor número de ciclos respecto a su control, la falta de ENDOG en células que carecen de ADNmit no disminuye el número de ciclos concluídos durante las 48 horas que permanecen en cultivo respecto a las células Rat2-Rho(0) control, por lo tanto, su capacidad proliferativa no está limitada en ausencia de ENDOG.

El conjunto de resultados presentados en este apartado sugieren un papel de ENDOG en la replicación del ADNmit por encima de la regulación de la producción de ROS, de manera que cuando las células no tienen ADNmit se pierde el efecto biológico que ejerce ENDOG sobre la división celular.

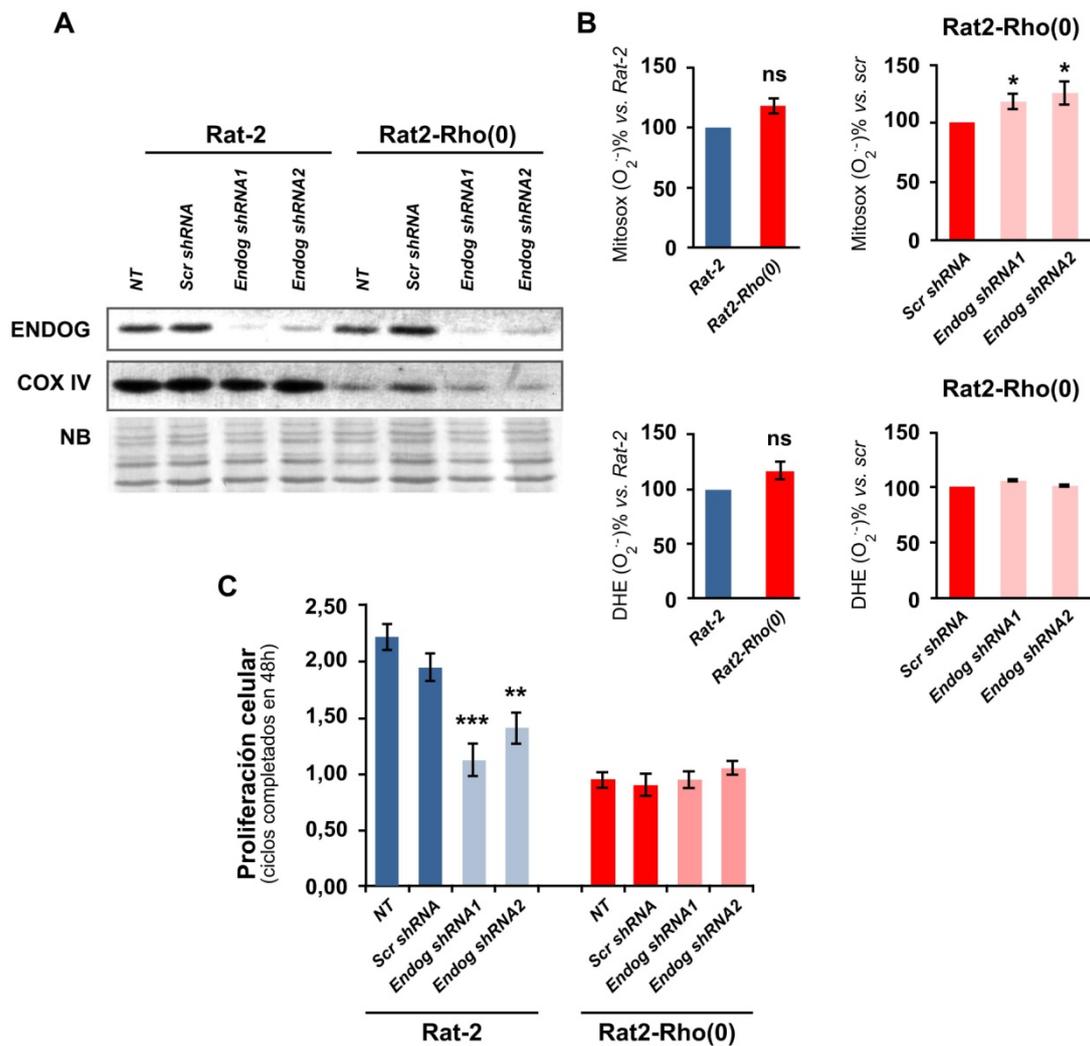


Figura 17. Estudio de los efectos de la falta de ENDOG en la producción de ROS y la proliferación de células que carecen de ADNmit, Rat2-Rho(0). **A.** Análisis de la expresión de ENDOG y COXIV mediante *western blot* a partir de extractos totales de proteína procedentes de cultivos de células Rat-2 y Rat2-Rho(0) transducidas lentiviralmente con el vector control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1* y *2*. n=3. **B.** Determinación de la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) mitocondrial y citoplasmático mediante marcaje con las sondas MitoSOX™ y DHE respectivamente, y cuantificación por citometría de flujo, en células Rat-2 y Rat2-Rho(0) transducidas lentiviralmente con el vector control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1* y *2*. n=3. **C.** Número de ciclos que completan durante 48 horas las células Rat-2 y Rat2-Rho(0) transducidas lentiviralmente con el vector control, *Scr shRNA*, y los *shRNA* de *Endog 1* y *2*. n=3. n= número de experimentos independientes realizados. NT: No Transducido. Scr: *scrambled*. NB: Azul de naftaleno. Análisis estadístico con el test t-student siendo \*p≤0.05, \*\*p≤0.01, \*\*\*p≤0.001. ns: no significativo.

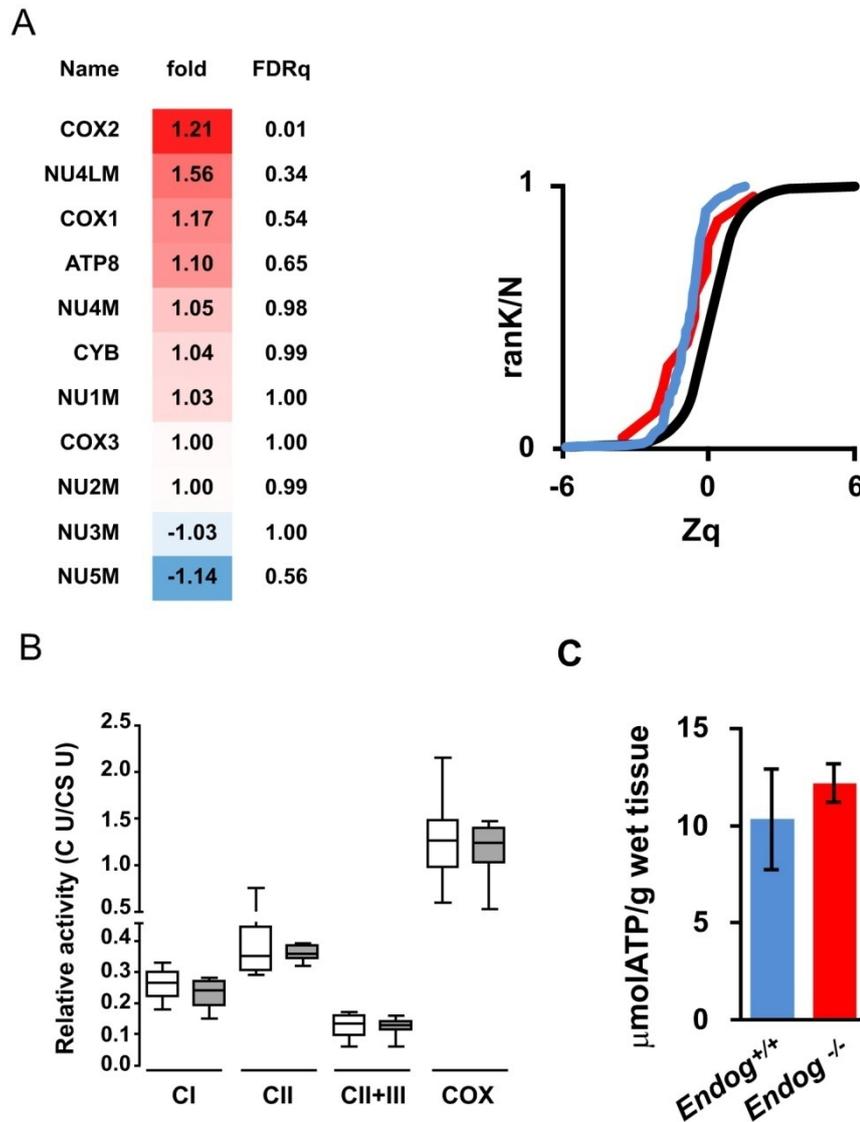
### 6.3. En la expresión del ADNmit y en la función respiratoria mitocondrial

La menor capacidad replicativa hallada en las mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 15), junto a la presencia de un menor número de moléculas de ADNmit en los corazones adultos *Endog*<sup>-/-471</sup>, llevó a plantearnos si esta reducción en el número de copias de ADNmit podía estar afectando a la expresión del genoma mitocondrial y, en consecuencia, al metabolismo energético celular; el 90% de la energía celular en forma de ATP es producida por el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y de los 37 genes que contiene el ADNmit, 13 codifican para diferentes subunidades estructurales que forman parte de los complejos del sistema de OXPHOS: 7 subunidades de las 46 que forman el complejo I o NADH deshidrogenasa (NU1M, NU2M, NU3M, NU4M, NU4LM, NU5M y NU6M), 1 subunidad de las 11 que forman el complejo III (CYB), 3 subunidades de las 13 del complejo IV o citocromo C oxidasa (COX1, COX2, COX3) y 2 subunidades de las 16 que forman el complejo V o ATP sintasa (ATP6 y ATP8). El resto de genes mitocondriales codifican para 2 ARNr (16S y 22S) y un conjunto de 22 ARNt que son esenciales para la síntesis de proteínas en el interior de la mitocondria<sup>277</sup>.

Por este motivo, en primer lugar se analizó el efecto de la disminución del número de copias de ADNmit en la expresión de los péptidos codificados por el genoma mitocondrial y, en segundo lugar, el impacto de este menor contenido de ADNmit en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y en la producción mitocondrial de ATP. El análisis cuantitativo de los proteomas mitocondriales de corazones adultos *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> permitió detectar y cuantificar 11 de los 13 péptidos codificados por el genoma mitocondrial (figura 18A). Sólo la subunidad 2 del complejo citocromo C oxidasa (COX2) muestra un aumento muy leve pero significativo en las mitocondrias *Endog*<sup>-/-</sup>, mientras que la expresión del resto de componentes de la cadena respiratoria y del complejo ATP sintasa no se encuentra alterada; asimismo, la medida de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y del contenido de ATP en los corazones adultos *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> (figura 18B y 18C) no revela cambios significativos en la actividad de los complejos respiratorios ni en los niveles de ATP en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>.

Estos resultados descartan un papel de ENDOG en la expresión del genoma mitocondrial y, además, confirman que una depleción del 30% en el número de copias de ADNmit<sup>471</sup> no conduce a una disminución proporcional en la síntesis de proteínas

mitocondriales que forman parte de la cadena respiratoria en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>, manteniéndose en ellos un nivel normal de producción de energía en forma de ATP.



**Figura 18.** Estudio de la expresión del ADNmit y de la función respiratoria mitocondrial en corazones adultos de ratones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. **A.** Análisis diferencial de la abundancia de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial presentes en los proteomas de corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. Las proteínas de mitocondrias *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> se digieren en péptidos que son marcados mediante marcaje isobárico para su cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ), fraccionados por intercambio catiónico y analizados por LC-MS/MS. **B.** Medida de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales (C U/CS U) a partir de mitocondrias aisladas de corazones adultos *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>. La suspensión de mitocondrias intactas se congela y descongela 3 veces para romper las membranas y liberar los complejos. Las actividades enzimáticas específicas (C) se normalizan en función de la actividad de la citrato sintasa (CS), enzima de la matriz mitocondrial que constituye un marcador de la riqueza mitocondrial. **C.** Cuantificación de ATP (umol/g tejido) en corazones adultos *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.





*Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos.*

*William Lawrence Bragg*



## 1. La falta de ENDOG incrementa el tamaño de los cardiomiocitos y frena la proliferación de los mismos durante el desarrollo del corazón en ratones *Endog*<sup>-/-</sup>

La endonucleasa G (ENDOG) es una nucleasa mitocondrial altamente conservada y muy conocida en la comunidad científica por ser la responsable de la fragmentación del ADN durante el proceso de muerte celular apoptótica que ocurre de manera independiente a las caspasas. Sin embargo, los primeros estudios con ratones *Endog*<sup>-/-</sup> mostraron un proceso normal de muerte celular ante una gran variedad de estímulos apoptóticos aplicados, así como un perfecto desarrollo hasta la edad adulta sin defectos obvios, sugiriendo que ENDOG no es necesaria para los procesos de embriogénesis y apoptosis<sup>436,448</sup>. Con el tiempo se ha demostrado que estos dos estudios han resultado insuficientes para probar el verdadero rol de ENDOG en el complejo proceso de generación de un organismo, así como en su muerte celular. En primer lugar, porque utilizaron modelos celulares donde la ejecución del proceso de muerte celular es dependiente de caspasas y los resultados publicados por nuestro grupo demuestran que la actividad apoptótica de ENDOG solo es relevante en ausencia de caspasas como, por ejemplo, en la muerte de cardiomiocitos isquémicos<sup>451,452</sup>. En segundo lugar, porque analizaron posibles diferencias tisulares y celulares mediante técnicas histológicas descartando así la existencia de cambios plausibles a nivel bioquímico y molecular en los ratones *Endog*<sup>-/-</sup>.

A diferencia de lo publicado en estos dos trabajos, los resultados aquí presentados demuestran que la nucleasa mitocondrial ENDOG, más allá de su función apoptótica, es fundamental y necesaria para el correcto desarrollo del corazón. Pese a su presencia ubicua en los diferentes tejidos y tipos celulares, su expresión aumenta especialmente durante el desarrollo y diferenciación del miocardio, contrariamente a lo que ocurre con las caspasas y la mayoría de genes apoptóticos que son silenciados postnatalmente en el corazón<sup>450,451</sup>, indicándonos el desempeño de una función importante en él. En los últimos años un estudio publicado por nuestro grupo ha permitido identificar la pérdida de la función de ENDOG como el determinante primario de la hipertrofia cardiaca, señalando un efecto directo de esta nucleasa en el control del tamaño de los cardiomiocitos<sup>471</sup>. Los cardiomiocitos de corazones adultos de ratones *Endog*<sup>-/-</sup> son más grandes en ausencia de una estimulación hipertrófica, sin embargo, estos corazones *Endog*<sup>-/-</sup> no presentan un mayor volumen respecto a los de tipo salvaje.

Dado que la falta de cardiomiocitos genera una hipertrofia adaptativa a *posteriori* para poder hacer frente a la demanda energética que se le exige al corazón<sup>450</sup>, y que la disminución de la expresión de ENDOG en un cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata produce un crecimiento de los mismos y un aumento en la expresión de biomarcadores hipertróficos<sup>471</sup>, en un sistema *in vitro* donde no hay una organización estructural a nivel de órgano y, por tanto, no se ejerce ningún tipo de presión hemodinámica sobre ellos, nos planteamos que en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> debían ocurrir paralelamente dos procesos, una menor proliferación de los cardiomiocitos y un agrandamiento de los mismos, que anularían las posibles diferencias de tamaño entre corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.

Nuestros resultados demuestran que el aumento de tamaño observado en los cardiomiocitos de corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup> también está presente en la etapa neonatal, puesto que los cardiomiocitos neonatales de los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> son más grandes y expresan más genes y proteínas estructurales que forman parte de los sarcómeros, descartando así el desarrollo de una hipertrofia adaptativa a *posteriori* en los corazones adultos y señalando el agrandamiento de los cardiomiocitos como una consecuencia directa de la falta de ENDOG en ellos.

Pese a ésto e igual que sucede en los corazones adultos, los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> tienen el mismo tamaño que los corazones *Endog*<sup>+/+</sup> debido a que están formados por un menor número de cardiomiocitos de mayor volumen, advirtiéndonos de la pérdida de su capacidad proliferativa durante las etapas embrionaria y perinatal, como bien señala la expresión disminuída en ellos de marcadores implicados en los procesos de replicación del ADN y división celular.

De modo que este reducido número de cardiomiocitos presente en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> no conduce a una compensación del tamaño de los mismos a *posteriori* sino que ambos procesos se producen simultáneamente, probablemente permitiendo así el desarrollo de una función cardíaca normal en los ratones *Endog*<sup>-/-</sup>. Por otros modelos de ratones que tenemos en el laboratorio sabemos que el desarrollo de una hipertrofia moderada en el corazón no conlleva necesariamente alteraciones en su función cardíaca. El ratón nulo cardioespecífico de las caspasas 3 y 7 (*DKO 3*<sup>-/-</sup> *7*<sup>-/-</sup>) desarrolla una ligera hipertrofia adaptativa en el corazón adulto en respuesta a una deficiencia en el número de cardiomiocitos y, sin embargo, tiene una función cardíaca normal<sup>501</sup>.

A pesar de la expresión incrementada del gen *NPPA* en los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup>, un marcador hipertrófico que diversos estudios también señalan como indicador de un fallo cardiaco causado por una cardiomiopatía hipertrófica, hipertensión o cardiomiopatía dilatada<sup>502</sup>, los corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup> no desarrollan una hipertrofia ventricular izquierda en ausencia de una estimulación hipertrófica<sup>471</sup>; de manera que no hay un exceso de músculo cardiaco que obstruya la zona de expulsión de sangre y que termine agotando la función contráctil del corazón, puesto que pese a la hipertrofia de los cardiomiocitos individuales *Endog*<sup>-/-</sup> no hay diferencias en los parámetros ecocardiográficos de peso y grosor de la pared ventricular entre corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup><sup>471</sup> al estar formado éste último por un menor número de células, lo que nos sugiere un correcto funcionamiento del corazón *Endog*<sup>-/-</sup>. Esto no descarta que pueda ser más susceptible a diferentes fuentes de estrés y, en este caso, que la función cardiaca se vea más afectada en ratones *Endog*<sup>-/-</sup>.

En conjunto, nuestros resultados confirman un rol de ENDOG en la regulación del crecimiento y la proliferación de los cardiomiocitos durante el desarrollo del corazón, y dado que ENDOG se expresa de forma ubicua y que el corazón está formado por diferentes tipos celulares que contribuyen al correcto funcionamiento del mismo, podemos hipotetizar que aunque estas células no dispongan del enorme contenido mitocondrial propio de los cardiomiocitos, de alguna manera ENDOG también debe estar influyendo en el crecimiento y la división celular de éstas para un correcto desarrollo del corazón.

## 2. La deficiencia en ENDOG limita la proliferación de células de roedores y humanas en división

Se ha descrito previamente que la disminución de la expresión de ENDOG, mediante silenciamiento post-transcripcional con shRNA/siRNA específicos, provoca una disminución de la proliferación *in vitro* en diferentes tipos celulares que se caracteriza por una acumulación de células en la fase G2-M del ciclo celular<sup>454,455,456</sup>.

Disponer del ratón nulo para el gen *Endog* nos ha permitido analizar la capacidad de división celular de fibroblastos de piel *Endog*<sup>-/-</sup> *in vitro*, descartando que los efectos observados en la proliferación sean debidos a artefactos por el sistema de silenciamiento utilizado y confirmando así que son consecuencia directa de eliminar el gen *Endog*. Los fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>-/-</sup> presentan una reducida capacidad proliferativa *in vitro*, fenotipo que también comparten las células humanas HEK293T a las que se les elimina el gen de *Endog* mediante el sistema CRISPR/Cas9, así como las células tumorales endometriales Ishikawa (IK) a las que se les disminuye la expresión de ENDOG mediante transducción lentiviral.

A diferencia de los estudios publicados en los que se sugiere que la falta de ENDOG conduce a una acumulación de células en la fase G2-M del ciclo celular debido a la presencia de ADN dañado no reparado<sup>454,455</sup>, sin que esto último haya sido demostrado, en los fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>-/-</sup>, así como en los fibroblastos Rat-2 con una reducida expresión de ENDOG y en las células humanas HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, disminuye el porcentaje de células presentes en la fase S del ciclo celular y aumenta el porcentaje de células que se acumulan mayoritariamente en las fase G1 del ciclo celular, detectándose únicamente un pequeño pico en la fase G2-M en los fibroblastos *Endog*<sup>-/-</sup> y en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>.

El punto de control G1, cercano a la transición G1-S, gobierna dos tipos de situaciones diferentes. Por un lado, aquí se detiene el ciclo celular cuando el ADN ha sufrido algún daño para que la célula pueda proceder a su reparación antes de que éste sea replicado. Por otro lado, en ese punto se toma la decisión de continuar el ciclo celular si todas las señales son propicias, o no avanzar y estabilizarse en la fase G1 temporal o permanentemente, lo que supone a la célula escoger entre cuatro decisiones posibles: diferenciarse, permanecer en un estado de quiescencia (G0), sufrir un proceso de senescencia o morir por apoptosis<sup>89,99</sup>.

En los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> la ausencia de una activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR), junto al aumento en la expresión del gen de la cadena pesada de la

alfa miosina cardiaca (*MYH6*), nos sugiere que la salida del ciclo celular de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> se debe a un proceso de diferenciación de los mismos que permita mantener la función contráctil del corazón con un menor número de células. En el caso de los fibroblastos primarios de piel *Endog*<sup>-/-</sup>, parece acelerarse la disminución del limitado potencial proliferativo que presentan todas las células primarias en cultivo y que conduce a un estado de detención terminal del crecimiento o senescencia. Se ha descrito que en células endoteliales aisladas de venas de cordón umbilical humano<sup>456</sup> y en algunos tipos de fibroblastos primarios humanos<sup>503</sup>, la disminución de la expresión de ENDOG produce un retraso significativo en la proliferación celular acompañado por un aumento en el porcentaje de células positivas para la β-galactosidasa, un marcador clásico de senescencia replicativa, indicando que la falta de ENDOG induce en estas células un proceso de senescencia prematura. No sucede lo mismo en los fibroblastos Rat-2 con una reducida expresión de ENDOG, así como en las HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, ya que a pesar del aumento en el porcentaje de células que se acumulan en la fase G1 del ciclo celular, al tratarse de líneas inmortalizadas éstas mantienen cierta capacidad proliferativa respecto a sus controles en los sucesivos pases.

En las células tumorales IK, a diferencia de lo observado en las anteriores líneas celulares, aumenta el porcentaje de células que se acumulan en la fase S del ciclo celular y disminuye el porcentaje de células presentes en la fase G2-M del ciclo celular. Hay que tener presente que en las células IK las proteínas PTEN y pRB están ausentes<sup>504,505</sup>, y es esta falta de pRB la que determina una elevada actividad de los factores de transcripción E2F, activándose la transcripción de una serie de genes que obligan a la célula a entrar en la fase S del ciclo celular. Ésto junto a los elevados niveles de ciclina D1 y E1<sup>504</sup> presentes en las células IK nos sugiere una transición G1-S forzada en las células deficientes en ENDOG que finalmente terminan frenándose en la fase S del ciclo celular.

En resumen, el conjunto de estos resultados confirman que ENDOG es capaz de regular la proliferación de células de roedores y humanas en división, y apoyan que el menor número de cardiomiocitos presente en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> en el momento del nacimiento sea debido a una pérdida de su capacidad proliferativa durante el desarrollo embrionario del corazón.

### 3. La reducida expresión de ENDOG frena la división de células tumorales *in vitro* y la formación de tumores sólidos *in vivo*

El cáncer de endometrio es la neoplasia maligna ginecológica más frecuente y la cuarta más común en mujeres después del cáncer de mama, el cáncer colorrectal y el de pulmón. En las células tumorales endometriales IK la disminución de la expresión de ENDOG dificulta su proliferación *in vitro* y reduce su capacidad de generar tumores *in vivo* cuando son inyectadas subcutáneamente en ratones SCID. La inyección ectópica de estas células a nivel subcutáneo, fuera del órgano o tejido donde se produce el tumor en humanos, genera un tumor aislado que no nos permite estudiar la invasión tumoral y la generación de metástasis, siendo ésta la principal causa de mortalidad por cáncer. Pese a ello, nuestros resultados indican que el nivel de expresión de ENDOG varía considerablemente entre líneas tumorales de endometrio con distinto potencial metastásico. Su presencia se correlaciona positivamente con un mayor grado de diferenciación celular y una menor agresividad tumoral, siendo la expresión de ENDOG mayor en las células Ishikawa, más diferenciadas y menos invasivas, y menor en las células inmaduras HEC-1A y MFE-296 que han desarrollado la capacidad metastásica propia de las células tumorales malignas. Asimismo, la disminución de la expresión de ENDOG en muestras de tejido tumoral humano de endometrio de grado histológico II confirma que su deficiencia está ligada de alguna forma con la fisiopatología del cáncer endometrioide.

La supresión del proceso apoptótico desempeña un papel importante en la carcinogénesis al permitir la supervivencia inadecuada de células genéticamente aberrantes<sup>506,507</sup>. Diversos estudios han descrito una correlación inversa entre la invasividad tumoral y la capacidad de producir una respuesta apoptótica tras una lesión celular en cáncer de próstata<sup>508</sup>, cáncer de mama<sup>509,510,511</sup>, cáncer de colon<sup>512,513</sup>, melanoma<sup>514</sup>, carcinoma hepatocelular<sup>515</sup> y otros tipos de neoplasias malignas. En las líneas tumorales de próstata y de mama más agresivas se ha descrito una disminución de la expresión de ENDOG que se asocia con una mayor resistencia a agentes quimioterapéuticos que inducen la apoptosis tales como, cisplatino y etopósido<sup>516,517</sup>. Estos estudios sugieren que la presencia de ENDOG en células tumorales no invasivas determina su sensibilidad a la apoptosis, y dado que ENDOG es una endonucleasa apoptótica, hipotetizan que su deficiencia juega un papel importante en la supervivencia de estas células cancerosas a un nuevo entorno.

Esta premisa general de que el desarrollo del cáncer está ligado a la disminución del fenómeno apoptótico no parece ajustarse al proceso de carcinogénesis en el endometrio<sup>518,519</sup>, donde el reducido número de células apoptóticas presente en una hiperplasia endometrial aumenta progresivamente con el grado de malignidad tumoral, alcanzando un máximo en un adenocarcinoma endometrial de grado II que presenta una mayor expresión de proteínas proapoptóticas tales como, Bax y Caspasa 3, así como una menor expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y NF-κB. Tanto Bcl-2 como Bax son miembros de una misma familia de proteínas clave en la vía intrínseca de la apoptosis, sin embargo, en el desarrollo y la progresión de la tumorigénesis endometrial la expresión de Bcl-2 disminuye hasta llegar a ser insignificante en un adenocarcinoma endometrial de grado II, sugiriendo un papel de Bcl-2 en la protección celular frente al proceso apoptótico en una hiperplasia y un carcinoma endometrial temprano<sup>520,521,522</sup>. Es probable que, en las primeras etapas, los tumores que expresen Bcl-2 tengan más posibilidades de acumular otras anomalías genéticas que les permita lograr una posterior transformación maligna; después, el comportamiento biológico agresivo del tumor debe depender de factores distintos de Bcl-2.

Siendo ENDOG una nucleasa apoptótica, en la transformación de ese entorno antiapoptótico de las etapas tempranas más benignas al entorno proapoptótico de las etapas más avanzadas de un carcinoma endometrial, ésta sigue un patrón de expresión decreciente que se ajusta al de una proteína antiapoptótica como Bcl-2, sugiriéndonos un rol de ENDOG en el inicio del proceso tumorigénico pero no en la progresión más agresiva del cáncer. Se necesitarán más estudios para conocer la importancia de ENDOG en la transformación neoplásica del endometrio, si bien es cierto que las alteraciones en su expresión pueden ser el efecto y no la causa de la carcinogénesis endometrial.

A diferencia del patrón de expresión de ENDOG en las diferentes líneas y muestras de tejido tumoral humano de endometrio analizadas, esta nucleasa mitocondrial se encuentra altamente expresada en las muestras de tejido tumoral humano de colon, hígado, pulmón y, en menor grado de mama, cedidas por el biobanco del HUAV-IRBLleida. Pese al reducido número de casos analizados en cada tipo tumoral, la publicación de un estudio que muestra la elevada presencia de ENDOG en carcinomas gástricos y colorrectales<sup>523</sup> refuerza nuestros resultados y nos indica que

el perfil de expresión de ENDOG varía en función del tipo de cáncer o el estadio de su desarrollo.

El conjunto de resultados presentados en este apartado, junto a los anteriores que señalan a ENDOG como un regulador de la proliferación de células humanas en división, nos sugieren que ENDOG podría desempeñar un papel facilitador de la oncogénesis, bien en las etapas tempranas o preneoplásicas favoreciendo la iniciación y la promoción tumoral como sucedería en la carcinogénesis endometrial, o posteriormente en la adquisición y mantenimiento de un fenotipo maligno que permitiese su progresión en determinados tipos de cáncer como el gástrico y colorrectal.

En estos últimos 5 años existe un creciente reconocimiento de que determinados miembros apoptóticos pueden promover el desarrollo de un fenotipo maligno<sup>524,525,526</sup>; concretamente, dos estudios recientes<sup>527,528</sup> desafían la idea establecida sobre la activación de la maquinaria apoptótica como barrera natural frente al desarrollo del cáncer, ya que ésta puede promover la inestabilidad genómica y la transformación oncogénica cuando los desencadenantes fisiológicos de la apoptosis no logran causar la muerte celular. Históricamente se ha considerado al proceso de permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) como el punto de no retorno en el programa de apoptosis, sin embargo, en determinadas circunstancias de estrés citotóxico no letal, un conjunto limitado de mitocondrias puede sufrir el proceso de MOMP y activar las caspasas ejecutoras sin llegar a desencadenar la muerte celular, pero impulsando un daño en el ADN e inestabilidad genómica y promoviendo así la transformación celular y la tumorigénesis. Mecánicamente, ENDOG parece estar relacionada con las roturas persistentes en las hebras de ADN que conducen a la inestabilidad genómica<sup>528</sup>, apoyando así un papel de ENDOG en la transformación oncogénica y desvelando que la relación entre apoptosis y carcinogénesis puede no ser tan sencilla como hasta ahora se pensaba.

#### 4. La abundancia de ROS regula los cambios en el crecimiento y la proliferación celular asociados a la falta de ENDOG

El mantenimiento de un balance redox intracelular es un requisito esencial en todos los organismos aeróbicos. La estricta regulación entre la producción y la eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) representa la base de una homeostasis redox apropiada cuya perturbación tiene un profundo impacto en la fisiología celular. Numerosos estudios han demostrado la función de ROS en el proceso hipertrofico, aunque todavía no está claro el mecanismo exacto que conduce al aumento de tamaño de los cardiomiocitos a través de éstas<sup>529,530</sup>. Se ha descrito que la estimulación de la hipertrofia cardiaca con hormonas peptídicas como la angiotensina II se produce a través de las ROS generadas en la mitocondria, cuya excesiva amplificación conduce a una disminución del potencial de membrana y a un aumento del daño oxidativo en el ADN y proteínas mitocondriales que termina provocando un fallo cardiaco<sup>314</sup>.

Resultados anteriores publicados por nuestro grupo<sup>471</sup> sugerían que el rol de ENDOG en el control del tamaño de los cardiomiocitos debía producirse a través de un mecanismo dependiente de ROS, puesto que en las mitocondrias aisladas de los corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup> se detectaba una mayor producción de ROS y el tratamiento con angiotensina II aumentaba significativamente el tamaño de los cardiomiocitos y corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup> respecto a los *Endog*<sup>+/+</sup>. *In vitro* también se confirmaba que la disminución de la expresión de ENDOG en cardiomiocitos neonatales de rata producía un aumento de los niveles de ROS, sin llegar a verificar si este incremento determinaba el agrandamiento de los cardiomiocitos o bien era secundario a la hipertrofia de los mismos.

Para poder diferenciar entre ambas posibilidades la estrategia adoptada consistió en analizar el efecto de neutralizar la abundancia de las ROS en el tamaño de los cardiomiocitos hipertrofiados con escasa o nula expresión de ENDOG. La disminución de los niveles del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) mitocondrial y citoplasmático con el agente reductor NAC consigue reducir el agrandamiento de los cardiomiocitos neonatales primarios *Endog*<sup>-/-</sup> y de los cardiomiocitos neonatales primarios de rata con reducida expresión de ENDOG *in vitro*, indicando por un lado que son los diferentes niveles de expresión de ENDOG los que modifican la abundancia celular de las ROS y, por otro lado, señalando a éstas como las intermediarias en el control que ejerce ENDOG sobre el crecimiento de los cardiomiocitos.

Cada vez está más aceptado que existe un ciclo redox vinculado fisiológicamente a la progresión del ciclo celular<sup>531</sup>, de manera que para que transcurra la división celular es importante que los niveles de ROS generados no se encuentren por encima del nivel umbral que estimula el crecimiento. En esta regulación redox del ciclo celular es especialmente importante la transición G1-S, en la que valores muy oxidantes condicionan y limitan el mantenimiento de unos niveles apropiados de las ciclinas y Cdks que determinan el avance hacia la fase S del ciclo celular.

En los fibroblastos primarios de piel de ratones *Endog*<sup>-/-</sup>, fibroblastos Rat-2 con una reducida expresión de ENDOG, así como en las células humanas HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup>, la transición G1-S se encuentra dificultada y la cuantificación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial y citoplasmático muestra un incremento en los niveles de ROS que es neutralizado en presencia del agente reductor NAC, recuperándose parcialmente la insuficiente proliferación observada en estas células en división con escasa o nula expresión de ENDOG. Estos resultados indican, en primer lugar, que el aumento en la abundancia de las ROS se produce en cualquier tipo celular deficiente en ENDOG y, en segundo lugar, e igual que sucede en los cardiomiocitos, que las ROS actúan como mediadoras en el control que ejerce ENDOG sobre la proliferación de células en división.

En las células tumorales la función de ROS sigue siendo objeto de intensos debates. Las células tumorales tienen a nivel basal una producción aumentada de ROS, como consecuencia de alteraciones genéticas y metabólicas, que hiperactivan las vías de señalización necesarias para la transformación celular y la tumorigénesis<sup>532</sup>. Niveles excesivamente altos de ROS son tóxicos tanto para las células normales como para las células tumorales, sin embargo, éstas últimas son capaces de ajustar estratégicamente su capacidad antioxidante especialmente en momentos de fuerte estrés oxidativo<sup>533</sup>, como ocurre durante el crecimiento del tumor sólido debido a las regiones internas más hipóxicas y privadas de glucosa, y en la transición epitelio-mesénquima (EMT) cuando las células cancerosas se separan de la matriz extracelular, invaden la membrana basal y entran en el ambiente oxidante de la sangre. Es en este entorno redox alterado donde las células cancerosas tienen una alta tasa de producción de ROS equilibrada por un eficiente sistema de detoxificación, lo que les permite mantener los niveles de ROS justo por debajo del umbral de muerte celular necesario para modular los cambios estructurales y las respuestas adaptativas que promueven la invasión local y la

metástasis. Muchos fármacos utilizados actualmente en la práctica clínica contra el cáncer actúan directa o indirectamente como prooxidantes perturbando la homeostasis redox de las células cancerosas e induciendo su muerte celular<sup>534,535</sup>; pese a ello, la eficacia de esta estrategia se pone en duda por el riesgo de que las células normales del paciente sufran daño oxidativo o carcinogénesis y, también, por la observación de diferentes grupos de investigación de que las terapias prooxidantes detienen el crecimiento e inducen la muerte celular en células cancerosas con niveles basales de ROS muy elevados, mientras que en aquellas con niveles modestamente aumentados de ROS son más efectivas las terapias antioxidantes<sup>536</sup>. Esto último junto al papel causal de ROS en la tumorigénesis ha llevado al uso de antioxidantes para suprimir las funciones oncogénicas de ROS<sup>537</sup>, sin embargo, la idea de que su reducción puede erradicar las células cancerosas es cada vez más una simplificación excesiva. Varios estudios clínicos prospectivos a gran escala han demostrado que la suplementación dietética con antioxidantes como  $\beta$ -caroteno, vitamina A o vitamina E aumenta la incidencia de cáncer<sup>538,539,540</sup>. En consonancia con estos hallazgos, se ha descrito que mutaciones activadoras en el factor respiratorio nuclear 2 (Nrf2) de células tumorales<sup>541</sup>, el cual regula los niveles de ROS mediante el aumento en la expresión de genes antioxidantes, o el tratamiento de éstas con antioxidantes no sólo reducen los niveles de ROS en ellas sino que también promueven actividades oncogénicas y metastásicas<sup>542,543,544</sup>.

En base a esto, nos planteamos si la disminución de los niveles de ROS observados en las células tumorales IK con una reducida expresión de ENDOG mediante el tratamiento con NAC dificultaría aún más la proliferación de estas células *in vitro* o, por el contrario e igual que sucede en las células no tumorales, favorecería la recuperación de la proliferación celular, tal y como se ha descrito anteriormente en algunos trabajos publicados que revelan la complejidad del uso de antioxidantes para el tratamiento del cáncer. Nuestros resultados indican que la bajada en los niveles del anión superóxido mitocondrial con NAC no modifica la limitada proliferación asociada a la falta de ENDOG en esta línea tumoral, lo que nos sugiere que el defecto en proliferación observado en las células IK deficientes en ENDOG no parece estar bajo el control de ROS.

## 5. La deficiencia de ENDOG provoca cambios en las vías de señalización que regulan el crecimiento y la división celular a través de ROS

La acumulación de resultados sugiriendo una pérdida de la capacidad proliferativa y una salida del ciclo celular de los cardiomiocitos presentes en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> durante las etapas embrionaria y perinatal, nos llevó a estudiar la señalización de una vía clásica que controla la proliferación celular, la vía AKT-GSK3 $\beta$  que termina en el control de la expresión de la ciclina D1, en los corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup>.

Nuestros resultados indican una menor actividad de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (P0), así como una caída en la expresión de los reguladores de ciclo en la transición G2-M, CycB1 y CDK1, en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> (P3), resultando en la detención completa del ciclo celular antes de que se produzca la salida natural del ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales que ocurre alrededor del séptimo día tras el nacimiento.

La retirada del ciclo celular de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> no se produce como consecuencia de la activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR), puesto que en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> P0 y P3 no se observa una activación de la proteína ATM, pese al modesto incremento en la expresión de PCNA que plantea un posible proceso de reparación<sup>494</sup>, e incluso su participación en rutas de tolerancia<sup>545,546</sup> a lesiones en el ADN que no llegan a activar la vía DDR en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>. Estos resultados sugieren que el aumento en la producción de ROS en los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> disminuye su capacidad proliferativa, más que generar un daño en el ADN que termine activando la vía DDR, desactivando la señalización que favorece la división celular de los mismos.

A su vez, el exceso de ROS debe modular las señales de transducción que llevan el agrandamiento de los cardiomiocitos deficientes en ENDOG puesto que el tratamiento con el agente reductor NAC consigue reducir el tamaño de los cardiomiocitos hipertrofiados *Endog*<sup>-/-</sup> y de los cardiomiocitos primarios de rata con una reducida expresión de ENDOG. Nuestros resultados muestran que en los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> hay acumulación citosólica de la histona deacetilasa 4 (HDAC4), una HDAC de clase II sensible a ROS<sup>266</sup>, y una disminución consecuente de su presencia en el núcleo, donde normalmente bloquea la expresión de genes prohipertróficos. Esto sugiere un proceso de exportación nuclear a través de un mecanismo de oxidación en

respuesta a ROS que permitiría desbloquear la expresión de genes prohipertróficos y, por tanto, el aumento de tamaño de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup>.

Por el momento, la confirmación del papel de las ROS como intermediarias del rol biológico de ENDOG se ha limitado a estudios *in vitro*, en los que se ha examinado el efecto del agente reductor NAC. Los resultados nos han permitido establecer una relación directa entre la abundancia de las ROS y el nivel de activación de la vía de señalización que lleva a la recuperación parcial de la proliferación. En el caso de los cardiomiocitos neonatales de rata transducidos lentiviralmente con los *Endog shRNAs* 1 y 2, el tratamiento con NAC únicamente produce un aumento significativo en las fosforilaciones de AKT (Ser473) y GSK3 $\beta$  (Ser9/21) que no pueden asociarse a cambios en la proliferación de estos cardiomiocitos al tratarse de un cultivo primario que sufre un proceso de diferenciación por su propio mantenimiento *in vitro*. Por tanto, sólo podemos deducir en este caso que la disminución de los indicadores de activación de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 está influenciada por el aumento en la producción de ROS. En las células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> la vía AKT-GSK3 $\beta$  que acaba en el control de la expresión de la ciclina E1 se encuentra disminuída, y el tratamiento con NAC produce un aumento en las fosforilaciones de AKT (Ser473) y GSK3 $\beta$  (Ser9/21), así como un incremento en la expresión de  $\beta$ -catenina, ciclina E1 (CycE1) y ciclina B1 (CycB1), que se asocia con la recuperación parcial de la proliferación celular observada en células HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> cuando se disminuye en ellas la producción de ROS.

Estos resultados demuestran una relación directa entre la abundancia de ROS y la actividad de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1/E1 que afecta a la proliferación celular en ausencia de ENDOG, y señalan a las ROS como mediadoras del rol biológico de ENDOG sobre la regulación de la proliferación celular.

En las células IK deficientes en ENDOG la actividad de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 está disminuída, sin embargo, el tratamiento con NAC no parece inducir cambios en las fosforilaciones de AKT (Ser473) y GSK3 $\beta$  (Ser9/21), ni un incremento significativo en la expresión de  $\beta$ -catenina, ciclina D1 (CycD1) y ciclina B1 (CycB1). Esto está de acuerdo con la incapacidad del agente reductor NAC de inducir una recuperación de la proliferación en la línea celular IK, y sugiere que ROS no parece intervenir en el control que ejerce ENDOG sobre la proliferación en estas células tumorales.

6. ENDOG es necesaria para el mantenimiento del genoma mitocondrial mediante su participación en la replicación del ADNmit.

Durante muchos años el estudio de la función de ENDOG se ha centrado principalmente en el contexto de la muerte celular programada, al representar la actividad nucleasa más abundante en relación a su expresión ubicua en todos los tejidos y tipos celulares. Curiosamente, los trabajos iniciales sobre su posible papel en la célula apuntaron hacia a una función vital, específicamente en la replicación del ADNmit<sup>433</sup>; sin embargo, y pese a que esta nucleasa mitocondrial ha sido ampliamente caracterizada en las últimas cinco décadas, todavía hoy se desconoce cuál es su función molecular exacta dentro de la mitocondria.

Puesto que nuestros resultados anteriores sugieren que son los diferentes niveles de ROS los encargados de activar o desactivar la señalización que lleva al crecimiento, tanto en tamaño como en número, en células deficientes o con insuficiente expresión de ENDOG, nos planteamos si la manera en que esta nucleasa mitocondrial regula la producción celular de ROS podría estar relacionada con una función de ENDOG en los procesos de mantenimiento (reparación y/o replicación) y expresión del ADNmit. Por este motivo, en esta última parte del trabajo nos hemos centrado en el estudio de las posibles alteraciones en el metabolismo del genoma mitocondrial relacionadas con la falta de ENDOG.

La correcta ejecución de las funciones celulares depende de la expresión coordinada de los genomas nuclear y mitocondrial a través de vías de ajuste establecidas entre las mitocondrias y el núcleo. Uno de los mecanismos implicados en estas vías de señalización "retrógradas" son las especies reactivas del oxígeno (ROS), principales candidatos difusibles y mediadores reactivos en la señalización, que parten de las mitocondrias para comunicar el estado funcional de las mismas al núcleo<sup>547</sup>; sin embargo, pese a su importante función señalizadora, las ROS generadas como subproductos durante la fosforilación oxidativa (OXPHOS) son la principal fuente endógena de daño en el ADNmit<sup>548</sup>. La estrecha proximidad del ADNmit a los principales sitios productores de ROS, así como la falta de histonas protectoras, resultan en una mayor susceptibilidad del genoma mitocondrial al daño oxidativo, lo que supone un reto adicional para las mitocondrias ya que éstas deben responder a dos demandas opuestas: generar ATP y minimizar los daños causados por ROS. La otra fuente endógena de daño son errores espontáneos de la propia maquinaria de

replicación y de reparación mitocondrial que se producen principalmente a causa de las modificaciones que introducen las ROS en las bases y hebras de ADNmit. Muchas lesiones oxidativas son una fuente importante de errores durante la síntesis del ADNmit<sup>549</sup>, y un ejemplo de ello es la lesión 8-oxodG (8-oxo-2'-desoxiguanosina), mínimamente citotóxica pero cuya incorporación al ADNmit es altamente mutagénica ya que conduce a la transición GC→TA en la subsiguiente ronda de replicación, introduciendo cambios en la integridad del genoma mitocondrial. La acumulación de moléculas de ADNmit defectivas puede incrementar aún más los niveles de ROS, precipitando un ciclo de generación de daño oxidativo que no sólo afecta a la función mitocondrial sino que también compromete el destino celular.

Inicialmente se propuso que ENDOG era la nucleasa responsable de degradar selectivamente el ADNmit en base a su fuerte afinidad *in vitro* por sitios con daño oxidativo<sup>463</sup>; sin embargo, a diferencia de lo que sucede en organismos inferiores<sup>469</sup>, en mamíferos ENDOG carece de la actividad 5' exonucleasa necesaria para procesar los extremos 5' de las moléculas de ADNmit dañadas y, además, estudios posteriores no revelaron diferencias significativas en la tasa de mutación, ni anomalías estructurales en el ADNmit aislado de tejido hepático de ratones *Endog*<sup>-/-</sup><sup>448</sup>, sugiriendo que ENDOG no debía ser la nucleasa encargada de la degradación del ADNmit dañado.

Dada la importancia del mantenimiento de la integridad del genoma mitocondrial en la función mitocondrial y, por ende, en la fisiología celular, se secuenció el genoma mitocondrial completo de los corazones neonatales *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> con la plataforma MiSeq de Illumina, confirmando así la alta similitud de secuencia del ADNmit entre ambos genotipos y, por tanto, la ausencia de cambios en el genoma mitocondrial de los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>. De este modo el posible daño oxidativo con potencial mutagénico, generado en base al incremento cuantificado en la producción de ROS en mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup>, debe ser eficientemente eliminado por el sistema de reparación mitocondrial. Este resultado descarta un papel de ENDOG en el proceso de reparación del ADNmit, ya sea a través de su participación en alguna de las vías de reparación que operan en la mitocondria o mediante la degradación de moléculas defectivas de ADNmit.

Recientemente se ha identificado la presencia en mamíferos de EXOG<sup>550,551</sup>, una 5'exo/endonucleasa mitocondrial necesaria para el procesamiento de los extremos 5' de las moléculas de ADNmit dañadas sobre las que actúa el sistema de reparación por

escisión de bases (BER), principal mecanismo de reparación del daño oxidativo en el genoma mitocondrial. EXOG surge de la duplicación de un gen ancestral que generó las subfamilias parálogas ENDOG y EXOG en eucariotas superiores; de modo que, en mamíferos, estas nucleasas podrían tener funciones complementarias que en eucariotas inferiores estarían desempeñadas por una misma exo/endonucleasa como, el homólogo de ENDOG en levaduras llamado NUC1.

A principios de los 90 se planteó la posibilidad de que ENDOG participase en la replicación del ADNmit como una nucleasa de tipo RNasa H, que corta el transcrito primario de ARN para generar el final 3' de un cebador maduro requerido en el inicio de la replicación mitocondrial<sup>433</sup>; sin embargo, las dudas acerca de la especificidad de su actividad RNasa sobre el transcrito primario de ARN en los orígenes de replicación mitocondrial, junto a la demostración *in vitro* en aquella época de que los cebadores de ARN procesados por la RNasa MRP<sup>552</sup> (del inglés *mitochondrial RNA processing endoribonuclease*) podían servir como sustrato para su extensión por parte de la ADN polimerasa gamma (POLy), llevaron a desestimar un papel de ENDOG en la replicación del ADNmit durante dos décadas. En 2011 el estudio de *McDermott-Roe*<sup>471</sup> *et al.* en el que participa nuestro grupo, restablece de nuevo el vínculo entre ENDOG y el metabolismo del ADNmit. Uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo es la identificación de ENDOG como miembro de una compleja red de señalización involucrada en la biogénesis mitocondrial, señalando que los efectos de la pérdida de la función de ENDOG en la hipertrofia cardíaca podrían proceder de perturbaciones en la fisiología mitocondrial. Nuestros resultados incluidos en este trabajo demuestran que los corazones adultos *Endog*<sup>-/-</sup> presentan una disminución en el número de copias del ADNmit, no acompañada de cambios significativos en la expresión de PGC1- $\alpha$ , NRF1 y TFAM<sup>471</sup>, principales reguladores del programa de biogénesis mitocondrial y, por tanto, sugiriendo que el efecto en el número de copias de ADNmit es debido a un papel de ENDOG en la replicación del genoma mitocondrial y no a un menor número de mitocondrias en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>, quedando aún por confirmar las funciones previamente propuestas para ENDOG en el metabolismo del genoma mitocondrial.

La necesidad de una reevaluación cuidadosa del papel de ENDOG en el mantenimiento del ADNmit, nos llevó a esclarecer su posible participación en el proceso de replicación del ADNmit desde dos aproximaciones metodológicas diferentes. Por un lado, se analizó el efecto de la falta de ENDOG en la síntesis del ADNmit, en un sistema

*in vitro* que refleja el proceso replicativo *in vivo* a partir de mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup> y, por otro lado, se examinó el impacto de la ausencia de ENDOG en la recuperación del número de copias de ADNmit tras su depleción transitoria con bromuro de etidio (BrEt) en fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones *Endog*<sup>-/-</sup>. La confirmación de una unión directa de ENDOG a la región control o bucle D del genoma mitocondrial<sup>471</sup>, junto a la menor capacidad replicativa hallada en las mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup> y la insuficiente recuperación observada en el número de copias de ADNmit deplecionadas en los MEFs *Endog*<sup>-/-</sup>, y teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que los inhibidores de ROS no afectan a dicho proceso como se discutirá más adelante, sugieren que la nucleasa mitocondrial **ENDOG es necesaria para el mantenimiento del genoma mitocondrial, posiblemente a través de una participación directa en el proceso replicativo de las moléculas de ADNmit.**

Pese a que, en los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento acerca de los principios generales y los factores clave implicados en la organización y mantenimiento del ADNmit, el mecanismo de replicación del genoma mitocondrial no se entiende completamente, existiendo aún hoy mucha controversia y desacuerdo entre los diferentes modelos de replicación propuestos. Gran parte de la confusión se debe a que no existe en mamíferos un único mecanismo de replicación, siendo probable que este proceso consista en una combinación de modelos propuestos o que diferentes modelos coexistan dentro de un mismo tipo celular; dada la complejidad del proceso y las limitaciones técnicas, no podemos asegurar que la fase de la replicación mitocondrial en la que participa ENDOG sea el inicio, ya que el fenotipo observado en los MEFs *Endog*<sup>-/-</sup> también es consistente con un defecto en la eliminación de los cebadores de ARN para su reemplazamiento por ADN en la terminación de la replicación mitocondrial, un paso fundamental que de no producirse conduciría a una inestabilidad genómica e impediría la recuperación del número de copias de ADNmit después de una depleción transitoria.

Recientemente se ha sugerido que la replicación del genoma mitocondrial en el corazón humano puede estar asociada a un proceso de recombinación molecular<sup>553</sup>. Una gran parte del ADNmit en cardiomiocitos humanos parece estar organizado en complejos agregados de docenas de genomas equivalentes, los cuales contienen abundantes uniones entre las distintas moléculas que indican un proceso activo de recombinación ligado a la replicación del ADNmit, de un modo similar a lo que sucede

en el fago T4, en levaduras y algunas plantas. En seres humanos estas formas recombinantes de replicación son enormemente dependientes de la edad<sup>554</sup>, estando ausentes en recién nacidos y adquiriéndolas gradualmente conforme se adopta un modo adulto de mantenimiento del ADNmit, que se correlaciona con un drástico aumento en el número de copias de ADNmit. No sería sorprendente la intervención de ENDOG en este mecanismo de replicación, dado el paralelismo con su patrón de expresión en el miocardio y las funciones previamente propuesta de ENDOG en procesos de recombinación<sup>455,459, 460,461</sup>.

A diferencia de lo comentado anteriormente respecto a la capacidad mutagénica de muchas lesiones oxidativas presentes en las bases del ADNmit, algunas de las lesiones oxidativas tienen una baja mutagenicidad pero representan un bloqueo para el avance de las polimerasas replicativas, y cuando se acumulan por encima de un nivel umbral inducen la degradación de las moléculas de ADNmit dañadas. El análisis de la recuperación del número de copias de ADNmit, en presencia del agente reductor NAC en MEFs de ratones *Endog*<sup>-/-</sup>, descarta que la disminución en la replicación del genoma mitocondrial sea debida a la presencia de estas lesiones oxidativas inhibitorias respecto a las acciones de la Poly pero, además, señala que la recuperación parcial de la proliferación celular observada en células con una insuficiente expresión de ENDOG se debe al bloqueo de la función señalizadora de las ROS por el agente reductor NAC, y no a una mejora de la capacidad replicativa del ADNmit en estas células; asimismo, en células Rho(O) que carecen de ADNmit la disminución de la expresión de ENDOG no aumenta considerablemente los niveles de ROS y, en consecuencia, se pierde el efecto biológico ligado a la falta de ENDOG sobre la división celular.

Nuestros resultados destacan la importancia de ENDOG en el mantenimiento del genoma mitocondrial, siendo ahora menos cuestionable la evidencia de un papel directo de ENDOG en la replicación de las moléculas de ADNmit, por encima de su función en el control del crecimiento y la división celular a través de la regulación de los niveles celulares de ROS.

## 7. ENDOG no es necesaria para la expresión de los péptidos estructurales codificados por el genoma mitocondrial.

Una característica singular de las mitocondrias es que poseen un sistema genético propio que codifica para un pequeño número de polipéptidos componentes del sistema de OXPHOS, así como los ARN necesarios para la síntesis de los mismos; sin embargo, no son del todo autónomas ya que dependen en gran medida del genoma nuclear, tanto para la expresión de su sistema genético como para la biogénesis del sistema de OXPHOS, cuyo funcionamiento exacto permite a las mitocondrias proporcionar la mayor parte de la energía que necesita la célula.

Con este propósito, una célula contiene cientos de mitocondrias y cada una de ellas engloba de 2 a 10 moléculas de ADNmit, siendo el número total de copias de ADNmit por célula muy elevado. Esto ha llevado al concepto relativo de "Efecto Umbral"<sup>555</sup>, que hace referencia a la mínima proporción de ADNmit necesaria para que no exista una manifestación fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial. La falta de un alto contenido de moléculas de ADNmit resulta en una disminución severa y global de la síntesis de proteínas mitocondriales, posiblemente debido a la escasez de uno o más ARNt mitocondriales; sin embargo, la depleción de una pequeña cantidad de copias de ADNmit permite una traducción suficiente de proteínas mitocondriales, debido a mecanismos compensatorios que ocurren a nivel transcripcional y/o traduccional impidiendo el desarrollo de un fenotipo defectivo. Este fenómeno mitocondrial nos permite explicar porqué en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> la reducción del 30% en el número de copias de ADNmit<sup>471</sup> no conduce a una disminución proporcional en la síntesis de proteínas codificadas por el genoma mitocondrial y, por tanto, en la actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria; en definitiva, el menor contenido de ADNmit en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> no supera un valor crítico para que se vea afectada la función respiratoria mitocondrial.

Dado que los corazones *Endog*<sup>-/-</sup> están formados por un menor número de cardiomiocitos de mayor tamaño, y que los principales reguladores del programa de biogénesis mitocondrial no indican un mayor contenido mitocondrial<sup>471</sup> en los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup>, deben existir compensaciones entre diversas vías bioenergéticas que jueguen un papel regulador del metabolismo celular y que permitan mantener una producción normal de ATP en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>; en cualquier caso, la importancia de estos resultados radica en el hecho de que la menor proliferación de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> y el agrandamiento de los mismos no parecen estar

relacionados con la pérdida y/o disminución de la función bioenergética mitocondrial en los corazones *Endog*<sup>-/-</sup>. En conjunto, nuestros resultados indican que el déficit en ENDOG implica una reducción de la replicación del ADNmit sin efectos importantes en la actividad de la cadena respiratoria que justifiquen ser la causa de la alteración observada en el crecimiento y la división celular y, por consiguiente, determinándonos a seguir en la búsqueda del mecanismo implicado en los cambios biológicos asociados a la falta de ENDOG.

En esta última década han aparecido una serie de estudios de especial importancia para nuestro trabajo, en los que se desvela que la molécula de ADNmit es mucho más rica de lo que hasta ahora se pensaba, puesto que la información que contiene no se limita únicamente a la síntesis de los componentes de la cadena respiratoria. El primero de estos trabajos demuestra que en células Rho(0) de *Saccharomyces cerevisiae* la pérdida del ADNmit resulta en una marcada ralentización de la transición G1-S del ciclo celular<sup>556</sup>; sin embargo, en células normales de levadura la sustitución de los genes codificantes por ADN no codificante en el genoma mitocondrial, así como la eliminación de la subunidad Va de la citocromo C oxidasa o la inhibición de la ATP sintasa, no afecta a la progresión G1-S del ciclo celular, sugiriendo que el defecto en proliferación es causado por la ausencia del ADNmit y no por la pérdida de la expresión de los genes que codifican para las distintas subunidades del sistema de OXPHOS. Paralelamente a este estudio fue conociéndose que el genoma mitocondrial tiene el potencial necesario para codificar ARNs similares a los miARN<sup>557</sup> (del inglés *micro ARN*) o lncRNA<sup>558</sup> (del inglés *Long non-coding RNAs*) nucleares, que pueden modular funciones mitocondriales esenciales y contribuir, directa o indirectamente, a las señales derivadas de las mitocondrias implicadas en las respuestas celulares adaptativas<sup>559</sup>. Del mismo modo pero, sorprendentemente, la molécula de ADNmit contiene marcos de lectura abiertos (ORFs), previamente no anotados e insertados en genes clásicos, que pueden traducirse en péptidos y proteínas pequeñas, los cuales regulan determinadas actividades metabólicas de la célula, participando así en la conocida señalización retrógrada entre las mitocondrias y el núcleo<sup>547</sup>.

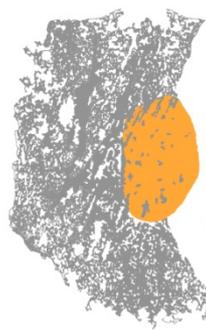
En células humanas la búsqueda de genes que protegen contra la muerte celular mediada por la proteína  $\beta$ -amiloide llevó al descubrimiento de una ORF dentro del gen mitocondrial que codifica para el ARN ribosomal 16S<sup>560</sup>. Esta ORF produce un péptido pequeño de 24 aminoácidos llamado Humanin, cuya expresión parece proteger

a las células de la muerte celular causada por la acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide, detectándose niveles elevados de Humanin en las neuronas y glía del lóbulo occipital de pacientes con la enfermedad del Alzheimer<sup>561</sup>, así como en los cardiomiocitos de ratón después de un lesión cardíaca por isquemia/reperfusión<sup>562,563</sup>, y también en el músculo esquelético de los pacientes con MELAS (Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares)<sup>564</sup>.

La evidencia cada vez mayor del efecto antioxidante que Humanin parece ejercer en el corazón a través del control sobre la producción de ROS<sup>565,566,567,568</sup>, preservando de esta manera la función mitocondrial cardíaca, nos ha suscitado la posibilidad de que el menor contenido de ADNmit ligado a la reducida capacidad replicativa hallada en las mitocondrias *Endog*<sup>-/-</sup>, pese a no estar afectando a la abundancia de péptidos estructurales que forman parte de los complejos del sistema de OXPHOS, sí que podría estar alterando los niveles de estos péptidos más cortos que son capaces de regular diversos procesos celulares.

Esto ha inspirado la continuidad del trabajo presentado en esta tesis en el estudio de la influencia de ENDOG sobre la expresión de Humanin en el miocardio, así como el análisis de los efectos de este péptido mitocondrial en los procesos regulados por ENDOG en el miocito. Los primeros resultados obtenidos en esta nueva etapa revelan que la adición del péptido sintético de Humanin al medio de cultivo frena los efectos sobre ROS y el tamaño celular en los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup>, estimulándonos a profundizar si los diferentes niveles de expresión de ENDOG regulan el crecimiento celular a través de cambios en el contenido de ADNmit, los cuales dirigen la expresión y actividad de péptidos cortos implicados en la señalización retrógrada, mediante la modulación de procesos biológicos tan importantes como la generación de ROS.



A stylized letter 'C' logo composed of a grey, textured, irregular shape with a solid orange oval in the center.

# Conclusiones

*La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada.*

*Karl R. Popper*



La **conclusión general** de este trabajo es que ENDOG tiene un papel provida regulando a la vez el crecimiento y la división celular de los cardiomiocitos durante el desarrollo del corazón, así como la proliferación de otros tipos celulares en división, mediante el control de la replicación del ADNmit y la regulación de los niveles celulares de ROS, a través de los cuales termina dirigiendo el crecimiento celular, tanto en tamaño como en número de células.

**En concreto, nuestros resultados permiten definir las siguientes conclusiones:**

**Primera.** La falta de ENDOG incrementa el tamaño de los cardiomiocitos, y frena la proliferación de los mismos durante el desarrollo del corazón.

**Segunda.** En los corazones neonatales *Endog*<sup>-/-</sup> la disminución de la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 se asocia con la pérdida de la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup>, y la acumulación citosólica de HDAC4 en ellos con la expresión de genes prohipertróficos que impulsan su crecimiento.

**Tercera.** La eliminación del exceso de las ROS producidas en los cardiomiocitos con reducida o nula expresión de ENDOG conduce a una reducción de los mismos, y sugiere una señalización ROS dependiente que lleva al crecimiento.

**Cuarta.** La deficiencia en ENDOG dificulta la proliferación de células de roedores y humanas *in vitro*, y limita la capacidad de las células tumorales de formar tumores *in vivo*.

**Quinta.** La disminución de la producción de ROS en las células humanas HEK293T-*Endog*<sup>-/-</sup> produce una recuperación parcial de su proliferación *in vitro* a través de la activación de la vía AKT-GSK3 $\beta$  que termina en el control de CycE1.

**Sexta.** La disminución de la producción de ROS en las células tumorales IK deficientes en ENDOG no activa la vía AKT-GSK3 $\beta$ -CycD1 ni produce una recuperación de su proliferación celular *in vitro*.

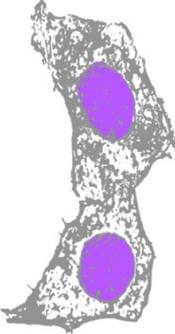
**Séptima.** La presencia de ENDOG es menor en líneas tumorales endometriales con una mayor capacidad invasiva *in vitro*, así como en tejido tumoral endometrial humano *in vivo*.

**Octava.** Las secuencias de los genomas mitocondriales procedentes de los corazones *Endog*<sup>+/+</sup> y *Endog*<sup>-/-</sup> son prácticamente indistinguibles.

**Novena.** Las mitocondrias aisladas de corazones *Endog*<sup>-/-</sup> tienen una menor capacidad replicativa, y los MEFs *Endog*<sup>-/-</sup> no consiguen recuperar los niveles normales de ADNmit tras un proceso de depleción transitoria con bromuro de etidio (BrEt), incluso en presencia del agente reductor NAC.

**Décima.** En células Rat2-Rho(0) que carecen de ADNmit la ausencia de ENDOG no dificulta la proliferación celular.

**Undécima.** El menor número de copias de ADNmit en cardiomiocitos *Endog*<sup>-/-</sup> no afecta a la abundancia de péptidos estructurales que forman parte de los complejos del sistema de OXPHOS, ni a la actividad de los mismos en la cadena respiratoria.



ibliografía



1. Xin, M., Olson, E. N. & Bassel-Duby, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Publ. Gr.* **14**, 529–541 (2013).
2. Anderson, R. H., Razavi, R. & Taylor, A. M. Cardiac anatomy revisited. *J. Anat.* **205**, 159–77 (2004).
3. Dini, F. L. *et al.* The left ventricle as a mechanical engine: from Leonardo da Vinci to the echocardiographic assessment of peak power output-to-left ventricular mass. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*. **14**, 214–20 (2013).
4. Severs, N. J. The cardiac muscle cell. *BioEssays* **22**, 188–199 (2000).
5. Torrent-Guasp, F. *et al.* Towards new understanding of the heart structure and function. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **27**, 191–201 (2005).
6. Heineke, J. & Ritter, O. Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 62–73 (2012).
7. Golob, M., Moss, R. L. & Chesler, N. C. Cardiac Tissue Structure, Properties, and Performance: A Materials Science Perspective. *Ann. Biomed. Eng.* **42**, 2003–2013 (2014).
8. Gregorio, C. C., Antin, P. B., Gregorio, C. C. & Antin, P. B. To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* **10**, 355–62 (2000).
9. Walker, C. A. & Spinale, F. G. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **118**, 375–82 (1999).
10. Olson, E. N. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat. Med.* **10**, 467–474 (2004).
11. Meilhac, S. M. *et al.* A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development* **130**, 3877–89 (2003).
12. Rosenquist, G. C. Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: The heart-forming portion of the primitive streak. *Dev. Biol.* **22**, 461–475 (1970).
13. Yang, X. *et al.* Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev. Cell* **3**, 425–37 (2002).
14. Wagner, M. & Siddiqui, M. A. Q. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **232**, 852–65 (2007).
15. Lough, J. & Sugi, Y. Endoderm and heart development. *Dev. Dyn.* **217**, 327–342 (2000).
16. Snarr, B. S., Kern, C. B. & Wessels, A. Origin and fate of cardiac mesenchyme. *Dev. Dyn.* **237**, 2804–2819 (2008).
17. Eisenberg, L. M. & Markwald, R. R. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* **77**, 1–6 (1995).
18. Männer, J. On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: new insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **278**, 481–92 (2004).
19. Drake, C. J., Wessels, A., Trusk, T. & Little, C. D. Elevated vascular endothelial cell growth factor affects mesocardial morphogenesis and inhibits normal heart bending. *Dev. Dyn.* **235**, 10–8 (2006).
20. Männer, J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat. Rec.* **259**, 248–62 (2000).
21. Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 826–837 (2005).
22. Srivastava, D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell* **126**, 1037–1048 (2006).
23. Kelly, R. G., Brown, N. A. & Buckingham, M. E. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell* **1**, 435–40 (2001).

24. 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* **5**, 877–89 (2003).
25. Zaffran, S., Kelly, R. G., Meilhac, S. M., Buckingham, M. E. & Brown, N. A. Right Ventricular Myocardium Derives From the Anterior Heart Field. *Circ. Res.* **95**, 261–268 (2004).
26. Ilagan, R. *et al.* Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development* **133**, 2435–2445 (2006).
27. Moorman, A. F. ., Christoffels, V. M., Anderson, R. H. & van den Hoff, M. J. . The heart-forming fields: one or multiple? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**, 1257–1265 (2007).
28. Schultheiss, T. M., Xydas, S. & Lassar, A. B. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* **121**, 4203–14 (1995).
29. Ehrman, L. A. & Yutzey, K. E. Lack of regulation in the heart forming region of avian embryos. *Dev. Biol.* **207**, 163–75 (1999).
30. Brand, T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev. Biol.* **258**, 1–19 (2003).
31. Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M. & Lassar, A. B. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* **15**, 316–27 (2001).
32. Solloway, M. J. & Harvey, R. P. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc. Res.* **58**, 264–77 (2003).
33. Schultheiss, T. M., Burch, J. B. & Lassar, A. B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* **11**, 451–62 (1997).
34. Olson, E. N. Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. *Science (80-. )* **313**, 1922–1927 (2006).
35. Schneider, V. A. & Mercola, M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **15**, 304–15 (2001).
36. Lyons, I. *et al.* Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* **9**, 1654–66 (1995).
37. Black, B. L. & Olson, E. N. TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF MUSCLE DEVELOPMENT BY MYOCYTE ENHANCER FACTOR-2 (MEF2) PROTEINS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 167–196 (1998).
38. Yu, Y. T. *et al.* Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* **6**, 1783–98 (1992).
39. Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C. & Olson, E. N. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276**, 1404–7 (1997).
40. Vong, L. H., Ragusa, M. J. & Schwarz, J. J. Generation of conditional *Mef2*loxP/loxP mice for temporal- and tissue-specific analyses. *Genesis* **43**, 43–8 (2005).
41. Naya, F. J. *et al.* Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat. Med.* **8**, 1303–9 (2002).
42. Kim, Y. *et al.* The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 124–32 (2008).
43. Charron, F. & Nemer, M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 85–91 (1999).
44. Hatcher, C. J. *et al.* TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis. *Dev. Biol.* **230**, 177–88 (2001).
45. Hatcher, C. J. *et al.* A role for *Tbx5* in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol. Genomics* **18**, 129–140 (2004).
46. 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* **106**, 709–21 (2001).
47. Srivastava, D. & Olson, E. N. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* **407**, 221–226 (2000).
  48. Srivastava, D. *et al.* Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat. Genet.* **16**, 154–160 (1997).
  49. Riley, P. R., Gertsenstein, M., Dawson, K. & Cross, J. C. Early exclusion of hand1-deficient cells from distinct regions of the left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos. *Dev. Biol.* **227**, 156–68 (2000).
  50. Yamagishi, H. *et al.* The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Dev. Biol.* **239**, 190–203 (2001).
  51. Zaffran, S. & Frasch, M. Early signals in cardiac development. *Circ. Res.* **91**, 457–69 (2002).
  52. Abu-Issa, R. & Kirby, M. L. Heart Field: From Mesoderm to Heart Tube. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 45–68 (2007).
  53. Lien, C.-L., McAnally, J., Richardson, J. A. & Olson, E. N. Cardiac-specific activity of an Nkx2-5 enhancer requires an evolutionarily conserved Smad binding site. *Dev. Biol.* **244**, 257–66 (2002).
  54. Evans, S. M. Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 73–83 (1999).
  55. Nicholas, S. B. & Philipson, K. D. Cardiac expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger NCX1 is GATA factor dependent. *Am. J. Physiol.* **277**, H324–30 (1999).
  56. Dyer, L. A. & Kirby, M. L. The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev. Biol.* **336**, 137–144 (2009).
  57. Hutson, M. R. *et al.* Arterial pole progenitors interpret opposing FGF/BMP signals to proliferate or differentiate. *Development* **137**, 3001–3011 (2010).
  58. Zak, R. Cell proliferation during cardiac growth. *Am. J. Cardiol.* **31**, 211–9 (1973).
  59. Soufan, A. T. *et al.* Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. *Circ. Res.* **99**, 545–52 (2006).
  60. de Boer, B. A., van den Berg, G., de Boer, P. A. J., Moorman, A. F. M. & Ruijter, J. M. Growth of the developing mouse heart: an interactive qualitative and quantitative 3D atlas. *Dev. Biol.* **368**, 203–13 (2012).
  61. Martin-Puig, S., Wang, Z. & Chien, K. R. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* **2**, 320–31 (2008).
  62. Dorn, G. W., Robbins, J. & Sugden, P. H. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ. Res.* **92**, 1171–5 (2003).
  63. Li, F., Wang, X., Bunker, P. C. & Gerdes, A. M. Formation of Binucleated Cardiac Myocytes in Rat Heart: I. Role of Actin–myosin Contractile Ring. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1541–1551 (1997).
  64. Li, F., Wang, X. & Gerdes, A. M. Formation of Binucleated Cardiac Myocytes in Rat Heart: II. Cytoskeletal Organisation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1553–1565 (1997).
  65. Li, F., Wang, X., Capasso, J. M. & Gerdes, A. M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 1737–46 (1996).
  66. Leu, M., Ehler, E. & Perriard, J. C. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat. Embryol. (Berl)*. **204**, 217–24 (2001).
  67. Naqvi, N. *et al.* A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell* **157**, 795–807 (2014).
  68. Alkass, K. *et al.* No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice. *Cell* **163**, 1026–1036 (2015).
  69. Hirai, M., Cattaneo, P., Chen, J. & Evans, S. M. Revisiting Preadolescent Cardiomyocyte Proliferation in Mice. *Circ. Res.* **118**, 916–919 (2016).

70. Soonpaa, M. H. *et al.* Cardiomyocyte Cell-Cycle Activity during Preadolescence. *Cell* **163**, 781–782 (2015).
71. Naqvi, N. *et al.* Cardiomyocytes Replicate and their Numbers Increase in Young Hearts. *Cell* **163**, 783–784 (2015).
72. Engel, F. B., Schebesta, M. & Keating, M. T. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 601–12 (2006).
73. Mollova, M. *et al.* Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1446–51 (2013).
74. Bergmann, O. *et al.* Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* **161**, 1566–1575 (2015).
75. Jonker, S. S. *et al.* Myocyte enlargement, differentiation, and proliferation kinetics in the fetal sheep heart. *J. Appl. Physiol.* **102**, 1130–42 (2007).
76. Thornburg, K. *et al.* Regulation of the cardiomyocyte population in the developing heart. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **106**, 289–299 (2011).
77. Owens, G. K. & Schwartz, S. M. Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ. Res.* **53**, 491–501 (1983).
78. Brodsky, W. Y. & Uryvaeva, I. V. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* **50**, 275–332 (1977).
79. Ahuja, P., Sdek, P., MacLellan, W. R. & MacLellan, R. W. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease and Regeneration. *Physiol. Rev.* **87**, 521–544 (2007).
80. Andrés, V. & Walsh, K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J. Cell Biol.* **132**, 657–66 (1996).
81. van Amerongen, M. J. & Engel, F. B. Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration: Stem Cells Review Series. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 2233–2244 (2008).
82. Naqvi, N., Li, M., Yahiro, E., Graham, R. M. & Husain, A. Insights into the characteristics of mammalian cardiomyocyte terminal differentiation shown through the study of mice with a dysfunctional c-kit. *Pediatr. Cardiol.* **30**, 651–8 (2009).
83. Li, M. *et al.* c-kit is required for cardiomyocyte terminal differentiation. *Circ. Res.* **102**, 677–85 (2008).
84. Claycomb, W. C. Atrial-natriuretic-factor mRNA is developmentally regulated in heart ventricles and actively expressed in cultured ventricular cardiac muscle cells of rat and human. *Biochem. J.* **255**, 617–20 (1988).
85. Siedner, S. *et al.* Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J. Physiol.* **548**, 493–505 (2003).
86. Wang, C. & Hu, S. M. Developmental regulation in the expression of rat heart glucose transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 1095–100 (1991).
87. Nigg, E. A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**, 471–80 (1995).
88. Johnson, D. G. & Walker, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 295–312 (1999).
89. Graña, X. & Reddy, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* **11**, 211–9 (1995).
90. Gao, C. Y. & Zelenka, P. S. Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *BioEssays* **19**, 307–315 (1997).
91. Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. & Reed, S. I. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of

- cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1669–79 (1994).
92. Reed, S. I. Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* **29**, 7–23 (1997).
  93. Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. & Pagano, M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2612–24 (1995).
  94. Ewen, M. E. Where the cell cycle and histones meet. *Genes Dev.* **14**, 2265–70 (2000).
  95. Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**, 961–71 (1992).
  96. Blanchard, J. M. Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1179–84 (2000).
  97. Ito, M. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol.* **43**, 677–90 (2000).
  98. Jin, P., Hardy, S. & Morgan, D. O. Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J. Cell Biol.* **141**, 875–85 (1998).
  99. Obaya, A. J. & Sedivy, J. M. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 126–42 (2002).
  100. Quelle, D. E. *et al.* Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* **11**, 635–45 (1995).
  101. SHEIKH, F. *et al.* Inhibition of TGF $\beta$  signaling potentiates the FGF-2-induced stimulation of cardiomyocyte DNA synthesis. *Cardiovasc. Res.* **64**, 516–525 (2004).
  102. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149–63 (1995).
  103. Perkins, N. D. Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* **1**, 39–41 (2002).
  104. Servant, M. J., Coulombe, P., Turgeon, B. & Meloche, S. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J. Cell Biol.* **148**, 543–56 (2000).
  105. Ikenishi, A. *et al.* Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev. Growth Differ.* **54**, 731–8 (2012).
  106. Gan, J., Sonntag, H.-J., Tang, M. Kuen, Cai, D. & Lee, K. K. H. Integrative Analysis of the Developing Postnatal Mouse Heart Transcriptome. *PLoS One* **10**, e0133288 (2015).
  107. Kang, M. J., Kim, J. S., Chae, S. W., Koh, K. N. & Koh, G. Y. Cyclins and cyclin dependent kinases during cardiac development. *Mol. Cells* **7**, 360–6 (1997).
  108. Brooks, G., Poolman, R. A., McGill, C. J. & Li, J.-M. Expression and Activities of Cyclins and Cyclin-dependent Kinases in Developing Rat Ventricular Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 2261–2271 (1997).
  109. Flink, I. L., Oana, S., Maitra, N., Bahl, J. J. & Morkin, E. Changes in E2F Complexes Containing Retinoblastoma Protein Family Members and Increased Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Activities During Terminal Differentiation of Cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 563–578 (1998).
  110. Kang, M. J. & Koh, G. Y. Differential and Dramatic Changes of Cyclin-dependent Kinase Activities in Cardiomyocytes During the Neonatal Period. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1767–1777 (1997).
  111. Yoshizumi, M. *et al.* Disappearance of cyclin A correlates with permanent withdrawal of cardiomyocytes from the cell cycle in human and rat hearts. *J. Clin. Invest.* **95**, 2275–2280 (1995).
  112. Burton, P. B., Yacoub, M. H. & Barton, P. J. Cyclin-dependent kinase inhibitor expression in human heart failure. A comparison with fetal development. *Eur. Heart J.* **20**, 604–11 (1999).
  113. Li, J. M. & Brooks, G. Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in pressure-overload hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **273**, H1358–67 (1997).

114. Kozar, K. *et al.* Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins. *Cell* **118**, 477–491 (2004).
115. Berthet, C. *et al.* Combined Loss of Cdk2 and Cdk4 Results in Embryonic Lethality and Rb Hypophosphorylation. *Dev. Cell* **10**, 563–573 (2006).
116. Malumbres, M. *et al.* Mammalian Cells Cycle without the D-Type Cyclin-Dependent Kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493–504 (2004).
117. Di Stefano, V., Giacca, M., Capogrossi, M. C., Crescenzi, M. & Martelli, F. Knockdown of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors Induces Cardiomyocyte Re-entry in the Cell Cycle. *J. Biol. Chem.* **286**, 8644–8654 (2011).
118. Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Dev. Cell* **19**, 491–505 (2010).
119. Heallen, T. *et al.* Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science (80-. )*. **332**, 458–461 (2011).
120. Xin, M. *et al.* Regulation of Insulin-Like Growth Factor Signaling by Yap Governs Cardiomyocyte Proliferation and Embryonic Heart Size. *Sci. Signal.* **4**, ra70–ra70 (2011).
121. von Gise, A. *et al.* YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2394–2399 (2012).
122. Xin, M. *et al.* Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13839–44 (2013).
123. Xin, M., Olson, E. N. & Bassel-Duby, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Publ. Gr.* **14**, 529–541 (2013).
124. Liang, Q. & Molkentin, J. D. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 1385–94 (2003).
125. Engel, F. B. *et al.* p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* **19**, 1175–87 (2005).
126. Engel, F. B., Hsieh, P. C. H., Lee, R. T. & Keating, M. T. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15546–15551 (2006).
127. Cuevas, P. *et al.* Fibroblast growth factor-1 prevents myocardial apoptosis triggered by ischemia reperfusion injury. *Eur. J. Med. Res.* **2**, 465–8 (1997).
128. D’Uva, G. & Tzahor, E. The key roles of ERBB2 in cardiac regeneration. *Cell Cycle* **14**, 2383–2384 (2015).
129. Mahmoud, A. I. *et al.* Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* **497**, 249–53 (2013).
130. Giacca, M. & Zacchigna, S. Harnessing the microRNA pathway for cardiac regeneration. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **89**, 68–74 (2015).
131. Porrello, E. R. *et al.* Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science (80-. )*. **331**, 1078–1080 (2011).
132. Porrello, E. R. *et al.* Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 187–192 (2013).
133. Eulalio, A. *et al.* Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* **492**, 376–81 (2012).
134. Thompson, R. P. *et al.* The oldest, toughest cells in the heart. *Novartis Found. Symp.* **250**, 157–74–6, 276–9 (2003).
135. Sedmera, D. *et al.* Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anat. Rec.* **274A**, 773–777 (2003).
136. Puente, B. N. *et al.* The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest

- through DNA Damage Response. *Cell* **157**, 565–579 (2014).
137. Turrens, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **17**, 3–8 (1997).
  138. Koopman, W. J. H. *et al.* Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1431–1470 (2010).
  139. Marnett, L. J., Riggins, J. N. & West, J. D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* **111**, 583–593 (2003).
  140. Hoeijmakers, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1475–1485 (2009).
  141. Kocabas, F. *et al.* The Hypoxic Epicardial and Subepicardial Microenvironment. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 654–665 (2012).
  142. Smart, N. *et al.* De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* **474**, 640–644 (2011).
  143. Wei, C., Kumar, S., Kim, I.-K. & Gupta, S. Thymosin Beta 4 Protects Cardiomyocytes from Oxidative Stress by Targeting Anti-Oxidative Enzymes and Anti-Apoptotic Genes. *PLoS One* **7**, e42586 (2012).
  144. van Oorschot, A. A. M., Smits, A. M., Pardali, E., Doevendans, P. A. & Goumans, M.-J. Low oxygen tension positively influences cardiomyocyte progenitor cell function. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2723–2734 (2011).
  145. Jopling, C., Suñé, G., Faucherre, A., Fabregat, C. & Izpisua Belmonte, J. C. Hypoxia induces myocardial regeneration in zebrafish. *Circulation* **126**, 3017–27 (2012).
  146. Guimarães-Camboa, N. *et al.* HIF1 $\alpha$  Represses Cell Stress Pathways to Allow Proliferation of Hypoxic Fetal Cardiomyocytes. *Dev. Cell* **33**, 507–521 (2015).
  147. Matsuyama, D. & Kawahara, K. Oxidative stress-induced formation of a positive-feedback loop for the sustained activation of p38 MAPK leading to the loss of cell division in cardiomyocytes soon after birth. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 815–828 (2011).
  148. Murray, T. V. A. *et al.* Redox regulation of cardiomyocyte cell cycling via an ERK1/2 and c-Myc-dependent activation of cyclin D2 transcription. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **79**, 54–68 (2015).
  149. Han, P. *et al.* Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. *Cell Res.* **24**, 1091–107 (2014).
  150. Buggisch, M. *et al.* Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J. Cell Sci.* **120**, 885–94 (2007).
  151. Sutton, M. G. & Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* **101**, 2981–8 (2000).
  152. Jessup, M. & Brozena, S. Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2007–2018 (2003).
  153. Beltrami, A. P. *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763–76 (2003).
  154. Oh, H. *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12313–8 (2003).
  155. Dimmeler, S., Zeiher, A. M. & Schneider, M. D. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest.* **115**, 572–83 (2005).
  156. Laugwitz, K.-L. *et al.* Postnatal isl1<sup>+</sup> cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* **433**, 647–653 (2005).
  157. Anversa, P., Leri, A., Kajstura, J. & Nadal-Ginard, B. Myocyte Growth and Cardiac Repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 91–105 (2002).
  158. Rubart, M. & Field, L. J. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 29–49 (2006).
  159. Wang, J. *et al.* The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development* **138**, 3421–3430 (2011).

160. Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M. & Field, L. J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am. J. Physiol.* **271**, H2183-9 (1996).
161. Gräbner, W. & Pfitzer, P. Number of nuclei in isolated myocardial cells of pigs. *Virchows Arch. B, Cell Pathol.* **15**, 279–94 (1974).
162. Porrello, E. R. *et al.* Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science (80-. )*. **331**, 1078–1080 (2011).
163. Bergmann, O. *et al.* Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science (80-. )*. **324**, 98–102 (2009).
164. Senyo, S. E. *et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* **493**, 433–436 (2012).
165. Ali, S. R. *et al.* Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 8850–8855 (2014).
166. Senyo, S. E., Lee, R. T. & Kühn, B. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Res.* **13**, 532–541 (2014).
167. Eduardo Carreño, J., Apablaza, F., Paz Ocaranza, M. & E. Jalil, J. Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Rev. Española Cardiol.* **59**, 473–486 (2006).
168. Hood, D. A., Irrcher, I., Ljubcic, V. & Joseph, A.-M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* **209**, 2265–2275 (2006).
169. Chien, K. R., Knowlton, K. U., Zhu, H. & Chien, S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* **5**, 3037–46 (1991).
170. Heineke, J. & Molkentin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 589–600 (2006).
171. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkentin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 38–48 (2013).
172. Houser, S. R. *et al.* Animal Models of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ. Res.* **111**, 131–150 (2012).
173. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac Plasticity. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1370–1380 (2008).
174. Molkentin, J. D. Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells. *Circ. Res.* **113**, 16–9 (2013).
175. van Berlo, J. H., Maillet, M. & Molkentin, J. D. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J. Clin. Invest.* **123**, 37–45 (2013).
176. Shiojima, I. & Walsh, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* **20**, 3347–65 (2006).
177. 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.* **89**, 977–82 (2001).
178. Dorn, G. W. & Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **115**, 527–537 (2005).
179. Matsui, T. *et al.* Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J. Biol. Chem.* **277**, 22896–901 (2002).
180. Shioi, T. *et al.* The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **19**, 2537–48 (2000).
181. Cross, D. A. E., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–789 (1995).
182. Haq, S. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J. Cell Biol.* **151**, 117–30 (2000).

183. Walsh, K. & Shiojima, I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. *J. Clin. Invest.* **117**, 3176–9 (2007).
184. Shiojima, I. *et al.* Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J. Clin. Invest.* **115**, 2108–18 (2005).
185. Bueno, O. F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19**, 6341–50 (2000).
186. 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.* **104**, 14074–9 (2007).
187. Kehat, I. *et al.* Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ. Res.* **108**, 176–83 (2011).
188. Kehat, I. & Molkentin, J. D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling in cardiac hypertrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1188**, 96–102 (2010).
189. Brancaccio, M. *et al.* Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **70**, 422–33 (2006).
190. Franchini, K. G., Torsoni, A. S., Soares, P. H. & Saad, M. J. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ. Res.* **87**, 558–65 (2000).
191. Wu, C. & Dedhar, S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J. Cell Biol.* **155**, 505–10 (2001).
192. Liao, Y., Cooper, R. S., McGee, D. L., Mensah, G. A. & Ghali, J. K. The relative effects of left ventricular hypertrophy, coronary artery disease, and ventricular dysfunction on survival among black adults. *JAMA* **273**, 1592–7
193. Frohlich, E. D. *et al.* The Heart in Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **327**, 998–1008 (1992).
194. Lee, Y. I. *et al.* Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *Eur. J. Appl. Physiol.* **97**, 216–224 (2006).
195. Wu, X. *et al.* Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J. Clin. Invest.* **116**, 675–82 (2006).
196. Frey, N., McKinsey, T. A. & Olson, E. N. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat. Med.* **6**, 1221–7 (2000).
197. Wilkins, B. J. & Molkentin, J. D. Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1178–1191 (2004).
198. Crabtree, G. R. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611–4 (1999).
199. Klee, C. B., Ren, H. & Wang, X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* **273**, 13367–70 (1998).
200. Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. & Healy, J. I. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855–8 (1997).
201. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205–2232 (2003).
202. Sei, C. A. *et al.* The alpha-adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways. *J. Biol. Chem.* **266**, 15910–6 (1991).
203. Sonnenberg, H. Mechanisms of release and renal tubular action of atrial natriuretic factor. *Fed. Proc.* **45**, 2106–10 (1986).

204. LaPointe, M. C., Deschepper, C. F., Wu, J. P. & Gardner, D. G. Extracellular calcium regulates expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **15**, 20–8 (1990).
205. Terrell, A. M. *et al.* Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* **26**, 226–34 (2006).
206. Iemitsu, M., Maeda, S., Miyauchi, T., Matsuda, M. & Tanaka, H. Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiol. Scand.* **185**, 259–270 (2005).
207. Sano, M. *et al.* Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 29717–23 (2000).
208. Sano, M. *et al.* ERK and p38 MAPK, but not NF- $\kappa$ B, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* **89**, 661–9 (2001).
209. Yoshida, K. *et al.* Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 407–11 (1996).
210. Jacoby, J. J. *et al.* Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12929–34 (2003).
211. Kunisada, K. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 315–9 (2000).
212. Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1005-28 (2000).
213. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
214. Sabri, A., Hughie, H. H. & Lucchesi, P. A. Regulation of Hypertrophic and Apoptotic Signaling Pathways by Reactive Oxygen Species in Cardiac Myocytes. *Antioxid. Redox Signal.* **5**, 731–740 (2003).
215. Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R.-D. V. & Huang, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1343–74 (2008).
216. Kwon, S. H., Pimentel, D. R., Remondino, A., Sawyer, D. B. & Colucci, W. S. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 615–21 (2003).
217. Nakashima, I. *et al.* Redox-Linked Signal Transduction Pathways for Protein Tyrosine Kinase Activation. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 517–531 (2002).
218. Nakamura, K. *et al.* Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II. *Circulation* **98**, 794–9 (1998).
219. Shih, N.-L. *et al.* Reactive Oxygen Species Modulate Angiotensin II-Induced  $\beta$ -Myosin Heavy Chain Gene Expression via Ras/Raf/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 143–148 (2001).
220. Brasier, A. R., Jamaluddin, M., Han, Y., Patterson, C. & Runge, M. S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) transcription factor. *Mol. Cell. Biochem.* **212**, 155–69 (2000).
221. Hirotsani, S. *et al.* Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* **105**, 509–15 (2002).
222. WU, S. *et al.* Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1601–1610 (2005).
223. Kuster, G. M. *et al.* Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras. *Circulation* **111**, 1192–8

- (2005).
224. Lakshmi, S. V. V., Padmaja, G., Kuppusamy, P. & Kutala, V. K. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J. Biochem. Biophys.* **46**, 421–40 (2009).
  225. Sumimoto, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* **275**, 3249–3277 (2008).
  226. Gray, S. P. & Jandeleit-Dahm, K. A. M. The role of NADPH oxidase in vascular disease--hypertension, atherosclerosis & stroke. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 5933–44 (2015).
  227. Sirker, A., Zhang, M., Murdoch, C. & Shah, A. M. Involvement of NADPH Oxidases in Cardiac Remodelling and Heart Failure. *Am. J. Nephrol.* **27**, 649–660 (2007).
  228. Paravicini, T. M. & Touyz, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S170-80 (2008).
  229. Bendall, J. K., Cave, A. C., Heymes, C., Gall, N. & Shah, A. M. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* **105**, 293–6 (2002).
  230. Byrne, J. A. *et al.* Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **93**, 802–5 (2003).
  231. Satoh, M. *et al.* Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7432–7 (2006).
  232. Grieve, D. J. *et al.* Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, 817–26 (2006).
  233. Matsushima, S. *et al.* Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **112**, 651–63 (2013).
  234. Ago, T. *et al.* Upregulation of Nox4 by Hypertrophic Stimuli Promotes Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **106**, 1253–1264 (2010).
  235. Theccanat, T. *et al.* Regulation of cellular oxidative stress and apoptosis by G protein-coupled receptor kinase-2; The role of NADPH oxidase 4. *Cell. Signal.* **28**, 190–203 (2016).
  236. Wei, S., Rothstein, E. C., Fliegel, L., Dell'Italia, L. J. & Lucchesi, P. A. Differential MAP kinase activation and Na(+)/H(+) exchanger phosphorylation by H(2)O(2) in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1542-50 (2001).
  237. Snabaitis, A. K., Hearse, D. J. & Avkiran, M. Regulation of sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange by hydrogen peroxide in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **53**, 470–80 (2002).
  238. Caldiz, C. I. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium. *J. Physiol.* **584**, 895–905 (2007).
  239. Pimentel, D. R. *et al.* Strain-stimulated hypertrophy in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species-dependent Ras S-glutathiolation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 613–22 (2006).
  240. El Benna, J., Faust, R. P., Johnson, J. L. & Babior, B. M. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 6374–8 (1996).
  241. Aikawa, R. *et al.* Reactive Oxygen Species in Mechanical Stress-Induced Cardiac Hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 901–907 (2001).
  242. Marín-García, J., Pi, Y. & Goldenthal, M. J. Mitochondrial-nuclear cross-talk in the aging and failing heart. *Cardiovasc. drugs Ther.* **20**, 477–91 (2006).
  243. Storz, P., Döppler, H. & Toker, A. Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and

- detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8520–30 (2005).
244. Erickson, J. R. *et al.* A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **133**, 462–74 (2008).
  245. McKinsey, T. A. & Olson, E. N. Cardiac histone acetylation--therapeutic opportunities abound. *Trends Genet.* **20**, 206–13 (2004).
  246. Verdin, E., Dequiedt, F. & Kasler, H. G. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* **19**, 286–93 (2003).
  247. Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L. & Olson, E. N. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4070–4075 (2000).
  248. Zhang, C. L. *et al.* Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* **110**, 479–88 (2002).
  249. Fischle, W. *et al.* Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol. Cell* **9**, 45–57 (2002).
  250. Zhang, C. L., McKinsey, T. A. & Olson, E. N. Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7302–12 (2002).
  251. Hohl, M. *et al.* HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. *J. Clin. Invest.* **123**, 1359–70 (2013).
  252. Eom, G. H. *et al.* Regulation of acetylation of histone deacetylase 2 by p300/CBP-associated factor/histone deacetylase 5 in the development of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **114**, 1133–43 (2014).
  253. Grozinger, C. M., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4868–73 (1999).
  254. McKinsey, T. A., Zhang, C. L. & Olson, E. N. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6312–21 (2001).
  255. Harrison, B. C. *et al.* The CRM1 nuclear export receptor controls pathological cardiac gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10636–49 (2004).
  256. Miska, E. A. *et al.* HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* **18**, 5099–107 (1999).
  257. Wei, J. Q. *et al.* Quantitative control of adaptive cardiac hypertrophy by acetyltransferase p300. *Circulation* **118**, 934–46 (2008).
  258. He, J. *et al.* Structure of p300 bound to MEF2 on DNA reveals a mechanism of enhanceosome assembly. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4464–74 (2011).
  259. Vega, R. B. *et al.* Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8374–85 (2004).
  260. Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S. & Olson, E. N. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **116**, 1853–64 (2006).
  261. Ha, C. H. *et al.* PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15467–72 (2010).
  262. Chang, C.-W. J. *et al.* Acute  $\beta$ -adrenergic activation triggers nuclear import of histone deacetylase 5 and delays G(q)-induced transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **288**, 192–204 (2013).
  263. Walkinshaw, D. R. *et al.* Dephosphorylation at a conserved SP motif governs cAMP sensitivity and nuclear localization of class IIa histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **288**, 5591–605 (2013).
  264. Little, G. H., Bai, Y., Williams, T. & Poizat, C. Nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$

- preferentially transmits signals to histone deacetylase 4 in cardiac cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 7219–31 (2007).
265. Backs, J., Backs, T., Bezprozvannaya, S., McKinsey, T. A. & Olson, E. N. Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3437–45 (2008).
266. Ago, T. *et al.* A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell* **133**, 978–93 (2008).
267. Haworth, R. S., Stathopoulou, K., Candasamy, A. J. & Avkiran, M. Neurohormonal regulation of cardiac histone deacetylase 5 nuclear localization by phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent mechanisms. *Circ. Res.* **110**, 1585–95 (2012).
268. Fernández-Vizarra, E., López-Pérez, M. J. & Enriquez, J. A. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* **26**, 292–7 (2002).
269. Smits, P., Smeitink, J. & van den Heuvel, L. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 737385 (2010).
270. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci.* **125**, 807–15 (2012).
271. Schenkel, L. C. & Bakovic, M. Formation and regulation of mitochondrial membranes. *Int. J. Cell Biol.* **2014**, 709828 (2014).
272. Arco, A. del & Satrustegui, J. New mitochondrial carriers: an overview. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2204–2227 (2005).
273. Schmidt, O., Pfanner, N. & Meisinger, C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 655–667 (2010).
274. Falkenberg, M., Larsson, N.-G. & Gustafsson, C. M. DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 679–699 (2007).
275. Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W. & Nagley, P. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res.* **31**, e61 (2003).
276. Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A. & Montoya, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* **88**, 41–56 (2003).
277. Finsterer, J. Mitochondriopathies. *Eur. J. Neurol.* **11**, 163–86 (2004).
278. Hutchison, C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S. & Edgell, M. H. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**, 536–8 (1974).
279. Bogenhagen, D. & Clayton, D. A. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* **11**, 719–27 (1977).
280. Wai, T., Teoli, D. & Shoubridge, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* **40**, 1484–1488 (2008).
281. Martínez-Diez, M., Santamaría, G., Ortega, A. D. & Cuezva, J. M. Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS One* **1**, e107 (2006).
282. Lee, S., Kim, S., Sun, X., Lee, J.-H. & Cho, H. Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 111–7 (2007).
283. Chatre, L. & Ricchetti, M. Prevalent coordination of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication with the cell cycle. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3068–3078 (2013).
284. Lefai, E. *et al.* Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase gamma results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 37–46 (2000).
285. Ruiz De Mena, I., Lefai, E., Garesse, R. & Kaguni, L. S. Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *Drosophila*. *J. Biol.*

- Chem.* **275**, 13628–36 (2000).
286. Bogenhagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L. & Kobayashi, R. Protein Components of Mitochondrial DNA Nucleoids in Higher Eukaryotes. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1205–1216 (2003).
  287. Garrido, N. *et al.* Composition and Dynamics of Human Mitochondrial Nucleoids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1583–1596 (2003).
  288. Garesse, R. & Vallejo, C. G. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1–16 (2001).
  289. Kasamatsu, H. & Vinograd, J. Unidirectionality of replication in mouse mitochondrial DNA. *Nat. New Biol.* **241**, 103–5 (1973).
  290. Clayton, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693–705 (1982).
  291. Holt, I. J., Lorimer, H. E. & Jacobs, H. T. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**, 515–24 (2000).
  292. Bowmaker, M. *et al.* Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J. Biol. Chem.* **278**, 50961–9 (2003).
  293. Montoya, J., Ojala, D. & Attardi, G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**, 465–70 (1981).
  294. Spremulli, L. L., Coursey, A., Navratil, T. & Hunter, S. E. Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **77**, 211–61 (2004).
  295. Zhang, Y. & Spremulli, L. L. Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1443**, 245–50 (1998).
  296. Koopman, W. J. H., Distelmaier, F., Smeitink, J. A. & Willems, P. H. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J.* **32**, 9–29 (2012).
  297. Enriquez, J. A. & Lenaz, G. Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes. *Mol. Syndromol.* **5**, 119–40 (2014).
  298. Ghezzi, D. & Zeviani, M. in *Advances in experimental medicine and biology* **748**, 65–106 (2012).
  299. Kim, H. J., Khalimonchuk, O., Smith, P. M. & Winge, D. R. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1604–16 (2012).
  300. Mick, D. U., Fox, T. D. & Rehling, P. Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 14–20 (2011).
  301. Acin-Perez, R. & Enriquez, J. A. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 444–450 (2014).
  302. Genova, M. L. & Lenaz, G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 427–443 (2014).
  303. Porras, C. A.-M. & Bai, Y. Respiratory supercomplexes: plasticity and implications. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **20**, 621–34 (2015).
  304. Chaban, Y., Boekema, E. J. & Dudkina, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 418–26 (2014).
  305. Boveris, A. & Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707–16 (1973).
  306. Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* **80**, 780–7 (2002).
  307. Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A. & Staniek, K. Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? *Redox Rep.* **8**, 135–41 (2003).
  308. Barja, G. Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently

- Modulated: Implications for Aging Studies. *Rejuvenation Res.* **10**, 215–224 (2007).
309. Kushnareva, Y., Murphy, A. N. & Andreyev, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem. J.* **368**, 545–53 (2002).
  310. Antunes, F. & Cadenas, E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* **475**, 121–6 (2000).
  311. Suliman, H. B., Carraway, M. S., Welty-Wolf, K. E., Whorton, A. R. & Piantadosi, C. A. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 41510–8 (2003).
  312. Lee, H. C., Yin, P. H., Lu, C. Y., Chi, C. W. & Wei, Y. H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* **348 Pt 2**, 425–32 (2000).
  313. Lee, H.-C., Yin, P.-H., Chi, C.-W. & Wei, Y.-H. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J. Biomed. Sci.* **9**, 517–26 (2002).
  314. Dai, D.-F. *et al.* Mitochondrial Oxidative Stress Mediates Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Gq Overexpression-Induced Heart Failure. *Circ. Res.* **108**, 837–846 (2011).
  315. Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M. THE MITOCHONDRIAL DEATH/LIFE REGULATOR IN APOPTOSIS AND NECROSIS. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 619–642 (1998).
  316. Imai, H. & Nakagawa, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 145–69 (2003).
  317. Wei, Y.-H. & Lee, H.-C. Mitochondrial DNA mutations and oxidative stress in mitochondrial diseases. *Adv. Clin. Chem.* **37**, 83–128 (2003).
  318. Wei, Y.-H. & Lee, H.-C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **227**, 671–82 (2002).
  319. López-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P. & de Cabo, R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp. Gerontol.* **43**, 813–819 (2008).
  320. Wu, S.-B., Ma, Y.-S., Wu, Y.-T., Chen, Y.-C. & Wei, Y.-H. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol. Neurobiol.* **41**, 256–66 (2010).
  321. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–24 (1999).
  322. Larsson, N. G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* **18**, 231–6 (1998).
  323. Scarpulla, R. C. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 1–14 (2002).
  324. Virbasius, C. A., Virbasius, J. V & Scarpulla, R. C. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* **7**, 2431–45 (1993).
  325. Karbowski, M. *et al.* Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **114**, 281–91 (2001).
  326. Bache, R. J. & Dai, X. Z. Myocardial oxygen consumption during exercise in the presence of left ventricular hypertrophy secondary to supravalvular aortic stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **15**, 1157–64 (1990).
  327. Finck, B. N., Lehman, J. J., Barger, P. M. & Kelly, D. P. Regulatory networks controlling mitochondrial energy production in the developing, hypertrophied, and diabetic heart. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **67**, 371–82 (2002).
  328. Rabinowitz, M. & Zak, R. Mitochondria and cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **36**, 367–76 (1975).

329. Wiesner, R. J., Rüegg, J. C. & Morano, I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 553–9 (1992).
330. Van den Bogert, C. *et al.* Regulation of the expression of mitochondrial proteins: relationship between mtDNA copy number and cytochrome-c oxidase activity in human cells and tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 177–83 (1993).
331. Klingenspor, M. *et al.* Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem. J.* 607–13 (1996).
332. Wiesner, R. J., Kurowski, T. T. & Zak, R. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1458–67 (1992).
333. Knutti, D., Kressler, D. & Kralli, A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9713–8 (2001).
334. Lehman, J. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.* **106**, 847–856 (2000).
335. van Bilsen, M., Smeets, P. J. H., Gilde, A. J. & van der Vusse, G. J. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc. Res.* **61**, 218–26 (2004).
336. Gong, G. *et al.* Oxidative capacity in failing hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H541-8 (2003).
337. Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M. & Baran, Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.* **37**, 8471–8486 (2016).
338. Saelens, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861–2874 (2004).
339. Festjens, N., van Gurp, M., van Loo, G., Saelens, X. & Vandenabeele, P. Bcl-2 Family Members as Sentinels of Cellular Integrity and Role of Mitochondrial Intermembrane Space Proteins in Apoptotic Cell Death. *Acta Haematol.* **111**, 7–27 (2003).
340. Bratton, S. B., Walker, G., Roberts, D. L., Cain, K. & Cohen, G. M. Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an ~30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive ~1.4MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ.* **8**, 425–433 (2001).
341. Vaux, D. L. & Silke, J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 499–504 (2003).
342. Gutteridge, J. M. & Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 136–47 (2000).
343. Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 561–564 (2010).
344. Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164–175 (2014).
345. Delles, C., Miller, W. H. & Dominiczak, A. F. Targeting Reactive Oxygen Species in Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1061–1078 (2008).
346. Chiste, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z. & Fernandes, E. Superoxide Anion Radical: Generation and Detection in Cellular and Non-Cellular Systems. *Curr. Med. Chem.* **22**, 4234–56 (2015).
347. Hayyan, M., Hashim, M. A. & AlNashef, I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* **116**, 3029–3085 (2016).
348. Bartosz, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1303–1315 (2009).
349. Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. & Van Remmen, H. Trends in oxidative aging

- theories. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 477–503 (2007).
350. Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **142**, 231–255 (2004).
  351. Matés, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**, 83–104 (2000).
  352. Dekkers, J. C., van Doornen, L. J. & Kemper, H. C. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* **21**, 213–38 (1996).
  353. Franco, R., Schoneveld, O. J., Pappa, A. & Panayiotidis, M. I. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* **113**, 234–258 (2007).
  354. Meister, A. & Anderson, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–760 (1983).
  355. Ruffmann, R. & Wendel, A. GSH rescue by N-acetylcysteine. *Klin. Wochenschr.* **69**, 857–62 (1991).
  356. Atkuri, K. R., Mantovani, J. J., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 355–359 (2007).
  357. Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M. & Berk, M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 4117–4129 (2013).
  358. Rushworth, G. F. & Megson, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol. Ther.* **141**, 150–159 (2014).
  359. Elbini Dhouib, I. *et al.* A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* **151**, 359–363 (2016).
  360. Wolin, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1430–42 (2000).
  361. Genestra, M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* **19**, 1807–1819 (2007).
  362. Kozlov, A. V. *et al.* Opposite effects of endotoxin on mitochondrial and endoplasmic reticulum functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 91–6 (2007).
  363. Greene, E. L. & Paller, M. S. Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub><sup>-</sup> in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **263**, F251–5 (1992).
  364. Baccanari, D. P. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 351–7 (1978).
  365. Suthanthiran, M. *et al.* Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. *Nature* **307**, 276–8
  366. Donkó, A., Péterfi, Z., Sum, A., Leto, T. & Geiszt, M. Dual oxidases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**, 2301–8 (2005).
  367. Miller, A. A., Drummond, G. R. & Sobey, C. G. Reactive Oxygen Species in the Cerebral Circulation: Are They All Bad? *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1113–1120 (2006).
  368. Terashvili, M., Pratt, P. F., Gebremedhin, D., Narayanan, J. & Harder, D. R. Reactive Oxygen Species Cerebral Autoregulation in Health and Disease. *Pediatr. Clin. North Am.* **53**, 1029–1037 (2006).
  369. Morré, D. J. Chemical hormesis in cell growth: a molecular target at the cell surface. *J. Appl. Toxicol.* **20**, 157–63
  370. Murrell, G. A., Francis, M. J. & Bromley, L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* **265**, 659–65 (1990).
  371. Dypbukt, J. M. *et al.* Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem.* **269**, 30553–60 (1994).
  372. Tatla, S., Woodhead, V., Foreman, J. C. & Chain, B. M. The role of reactive oxygen species in triggering

- proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 14–24 (1999).
373. Wartenberg, M., Diedershagen, H., Hescheler, J. & Sauer, H. Growth stimulation versus induction of cell quiescence by hydrogen peroxide in prostate tumor spheroids is encoded by the duration of the Ca(2+) response. *J. Biol. Chem.* **274**, 27759–67 (1999).
374. Kim, B. Y., Han, M. J. & Chung, A. S. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 686–98 (2001).
375. Han, M.-J., Kim, B.-Y., Yoon, S.-O. & Chung, A.-S. Cell proliferation induced by reactive oxygen species is mediated via mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Mol. Cells* **15**, 94–101 (2003).
376. Liu, Y.-W. *et al.* Effects of reactive oxygen species on cell proliferation and death in HeLa cells and its MDR1-overexpressing derivative cell line. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 278–81 (2003).
377. Caporossi, D., Ciafrè, S. A., Pittaluga, M., Savini, I. & Farace, M. G. Cellular responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 1355–64 (2003).
378. Laurent, A. *et al.* Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res.* **65**, 948–56 (2005).
379. Pryor, W. A. *et al.* Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R491-511 (2006).
380. Allen, R. G. & Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 463–99 (2000).
381. Davies, K. J. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* **48**, 41–7 (1999).
382. Conour, J. E., Graham, W. V & Gaskins, H. R. A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. *Physiol. Genomics* **18**, 196–205 (2004).
383. Schafer, F. Q. & Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–212 (2001).
384. Winterbourn, C. C. & Hampton, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 549–61 (2008).
385. Janssen-Heininger, Y. M. W. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1–17 (2008).
386. Finkel, T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **476**, 52–4 (2000).
387. Singh, D. K. *et al.* The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca<sup>2+</sup> and an oxidant signal. *Cell* **121**, 281–93 (2005).
388. Gopalakrishna, R. & Jaken, S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1349–61 (2000).
389. Kamata, H. & Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* **11**, 1–14 (1999).
390. Weiss, F. U., Daub, H. & Ullrich, A. Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 80–6 (1997).
391. Denu, J. M. & Dixon, J. E. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 633–41 (1998).
392. Ostman, A. & Böhmer, F. D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.* **11**, 258–66 (2001).
393. Sauer, H., Wartenberg, M. & Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* **11**, 173–86 (2001).
394. Chiarugi, P. & Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 509–514 (2003).

395. Parsons, S. J. & Parsons, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906–7909 (2004).
396. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
397. Gianni, D., Bohl, B., Courtneidge, S. A. & Bokoch, G. M. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2984–94 (2008).
398. Chan, E. C., Jiang, F., Peshavariya, H. M. & Dusting, G. J. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol. Ther.* **122**, 97–108 (2009).
399. Konishi, H. *et al.* Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett.* **410**, 493–8 (1997).
400. Shaw, M., Cohen, P. & Alessi, D. R. The activation of protein kinase B by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem. J.* 241–6 (1998).
401. Ushio-Fukai, M. *et al.* Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 22699–704 (1999).
402. Mackey, A. M. *et al.* Redox survival signalling in retina-derived 661W cells. *Cell Death Differ.* **15**, 1291–303 (2008).
403. Sadidi, M., Lentz, S. I. & Feldman, E. L. Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie* **91**, 577–85 (2009).
404. Leslie, N. R. & Downes, C. P. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell. Signal.* **14**, 285–95 (2002).
405. Sulis, M. L. & Parsons, R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* **13**, 478–83 (2003).
406. Lacalle, R. A. *et al.* PTEN regulates motility but not directionality during leukocyte chemotaxis. *J. Cell Sci.* **117**, 6207–6215 (2004).
407. Lee, S.-R. *et al.* Reversible Inactivation of the Tumor Suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **277**, 20336–20342 (2002).
408. Leslie, N. R. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1765–74 (2006).
409. Resjö, S. *et al.* Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes. *Cell. Signal.* **14**, 231–8 (2002).
410. Foley, T. D., Petro, L. A., Stredny, C. M. & Coppa, T. M. Oxidative inhibition of protein phosphatase 2A activity: role of catalytic subunit disulfides. *Neurochem. Res.* **32**, 1957–64 (2007).
411. Rao, R. K. & Clayton, L. W. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 610–6 (2002).
412. Durgadoss, L. *et al.* Redox modification of Akt mediated by the dopaminergic neurotoxin MPTP, in mouse midbrain, leads to down-regulation of pAkt. *FASEB J.* **26**, 1473–83 (2012).
413. Antico Arciuch, V. G. *et al.* Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. *PLoS One* **4**, e7523 (2009).
414. Gardner, C. D. *et al.* Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **228**, 836–42 (2003).
415. Murata, H. *et al.* Glutaredoxin Exerts an Antiapoptotic Effect by Regulating the Redox State of Akt. *J. Biol. Chem.* **278**, 50226–50233 (2003).
416. Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541–51

- (1996).
417. Huang, X. *et al.* Crystal structure of an inactive Akt2 kinase domain. *Structure* **11**, 21–30 (2003).
418. Tan, P. L., Shavlakadze, T., Grounds, M. D. & Arthur, P. G. Differential thiol oxidation of the signaling proteins Akt, PTEN or PP2A determines whether Akt phosphorylation is enhanced or inhibited by oxidative stress in C2C12 myotubes derived from skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **62**, 72–79 (2015).
419. Menon, S. G. & Goswami, P. C. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* **26**, 1101–1109 (2007).
420. Hoffman, A., Spetner, L. M. & Burke, M. Ramifications of a redox switch within a normal cell: Its absence in a cancer cell. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 265–268 (2008).
421. Hutter, D., Till, B. G. & Greene, J. J. Redox State Changes in Density-Dependent Regulation of Proliferation. *Exp. Cell Res.* **232**, 435–438 (1997).
422. Klevecz, R. R., Bolen, J., Forrest, G. & Murray, D. B. A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1200–5 (2004).
423. Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**, 3499–511 (1998).
424. Zou, Y., Ewton, D. Z., Deng, X., Mercer, S. E. & Friedman, E. Mirk/tyrk1B Kinase Destabilizes Cyclin D1 by Phosphorylation at Threonine 288. *J. Biol. Chem.* **279**, 27790–27798 (2004).
425. Menon, S. G. *et al.* Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* **67**, 6392–9 (2007).
426. Ammendola, R., Mesuraca, M., Russo, T. & Cimino, F. The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur. J. Biochem.* **225**, 483–9 (1994).
427. Chang, T.-S. *et al.* Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 25370–6 (2002).
428. Barnouin, K. *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21<sup>Cip1</sup> expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 13761–70 (2002).
429. Macip, S. *et al.* Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* **21**, 2180–8 (2002).
430. Dunphy, W. G. & Kumagai, A. The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67**, 189–96 (1991).
431. Sohn, J. & Rudolph, J. Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. *Biochemistry* **42**, 10060–70 (2003).
432. Savitsky, P. A. & Finkel, T. Redox regulation of Cdc25C. *J. Biol. Chem.* **277**, 20535–40 (2002).
433. Côté, J. & Ruiz-Carrillo, A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* **261**, 765–9 (1993).
434. Tiranti, V. *et al.* Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TFCF), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* **25**, 559–64 (1995).
435. Ohsato, T. *et al.* Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5765–70 (2002).
436. David, K. K., Sasaki, M., Yu, S.-W., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**, 1147–55 (2006).
437. Curtis, P. J., Burdon, M. G. & Smellie, R. M. The purification from rat liver of a nuclease hydrolysing ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **98**, 813–7 (1966).
438. Curtis, P. J. & Smellie, R. M. Properties of a purified rat-liver nuclease. *Biochem. J.* **98**, 818–25 (1966).

439. Morais, R., Blackstein, M. & de Lamirande, G. Partial purification and some properties of a 5'-RNase from rat liver mitochondrial fraction. *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 711–6 (1967).
440. Gerschenson, M., Houmiel, K. L. & Low, R. L. Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **23**, 88–97 (1995).
441. Ruiz-Carrillo, A. & Renaud, J. Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J.* **6**, 401–7 (1987).
442. Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W. T. & Widlak, P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis* **10**, 821–30 (2005).
443. Schäfer, P. *et al.* Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J. Mol. Biol.* **338**, 217–28 (2004).
444. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99 (2001).
445. van Loo, G. *et al.* Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* **8**, 1136–1142 (2001).
446. Parrish, J. *et al.* Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**, 90–4 (2001).
447. Arnoult, D. *et al.* Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* **22**, 4385–99 (2003).
448. Irvine, R. A. *et al.* Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 294–302 (2005).
449. Zhang, J. *et al.* Developmental silencing and independency from E2F of apoptotic gene expression in postmitotic tissues. *FEBS Lett.* **581**, 5781–5786 (2007).
450. Cardona, M. *et al.* Executioner Caspase-3 and 7 Deficiency Reduces Myocyte Number in the Developing Mouse Heart. *PLoS One* **10**, e0131411 (2015).
451. 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.* **281**, 22943–52 (2006).
452. Zhang, J. *et al.* EndoG Links Bnip3-Induced Mitochondrial Damage and Caspase-Independent DNA Fragmentation in Ischemic Cardiomyocytes. *PLoS One* **6**, e17998 (2011).
453. Zhang, J. *et al.* Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12480–5 (1998).
454. Büttner, S. *et al.* Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol. Cell* **25**, 233–46 (2007).
455. Huang, K.-J., Ku, C.-C. & Lehman, I. R. Endonuclease G: A role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8995–9000 (2006).
456. Diener, T., Neuhaus, M., Koziel, R., Micutkova, L. & Jansen-Dürr, P. Role of endonuclease G in senescence-associated cell death of human endothelial cells. *Exp. Gerontol.* **45**, 638–644 (2010).
457. Zassenhaus, H. P. & Denniger, G. Analysis of the role of the NUC1 endo/exonuclease in yeast mitochondrial DNA recombination. *Curr. Genet.* **25**, 142–9 (1994).
458. Fraser, M. J., Hatahet, Z. & Huang, X. T. The actions of *Neurospora* endo-exonuclease on double strand DNAs. *J. Biol. Chem.* **264**, 13093–101 (1989).
459. Huang, K.-J., Zemelman, B. V & Lehman, I. R. Endonuclease G, a candidate human enzyme for the initiation of genomic inversion in herpes simplex type 1 virus. *J. Biol. Chem.* **277**, 21071–9 (2002).
460. Zan, H. *et al.* Endonuclease G plays a role in immunoglobulin class switch DNA recombination by introducing double-strand breaks in switch regions. *Mol. Immunol.* **48**, 610–622 (2011).

461. Gole, B., Baumann, C., Mian, E., Ireno, C. I. & Wiesmüller, L. Endonuclease G initiates DNA rearrangements at the MLL breakpoint cluster upon replication stress. *Oncogene* **34**, 3391–3401 (2015).
462. Büttner, S. *et al.* Depletion of endonuclease G selectively kills polyploid cells. *Cell Cycle* **6**, 1072–6 (2007).
463. Ikeda, S. & Ozaki, K. Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 291–4 (1997).
464. Houmiel, K. L., Gerschenson, M. & Low, R. L. Mitochondrial endonuclease activity in the rat varies markedly among tissues in relation to the rate of tissue metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 197–202 (1991).
465. Boyd, J. B., Sakaguchi, K. & Harris, P. V. mus308 mutants of *Drosophila* exhibit hypersensitivity to DNA cross-linking agents and are defective in a deoxyribonuclease. *Genetics* **125**, 813–9 (1990).
466. Sakaguchi, K., Harris, P. V., van Kuyk, R., Singson, A. & Boyd, J. B. A mitochondrial nuclease is modified in *Drosophila* mutants (mus308) that are hypersensitive to DNA crosslinking agents. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 333–40 (1990).
467. Parrish, J. Z., Yang, C., Shen, B. & Xue, D. CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *EMBO J.* **22**, 3451–60 (2003).
468. Harrington, J. J. & Lieber, M. R. The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. *EMBO J.* **13**, 1235–46 (1994).
469. Dzierzbicki, P., Kaniak-Golik, A., Malc, E., Mieczkowski, P. & Ciesla, Z. The generation of oxidative stress-induced rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA is dependent on the Nuc1 (EndoG/ExoG) nuclease and is enhanced by inactivation of the MRX complex. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **740**, 21–33 (2012).
470. Low, R. L. Mitochondrial Endonuclease G function in apoptosis and mtDNA metabolism: a historical perspective. *Mitochondrion* **2**, 225–36 (2003).
471. McDermott-Roe, C. *et al.* Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature* **478**, 114–118 (2011).
472. Shin, C. H. *et al.* Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein. *Cell* **110**, 725–35 (2002).
473. Tamura, T., Onodera, T., Said, S. & Gerdes, A. M. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2175–81 (1998).
474. González-Vioque, E., Torres-Torronteras, J., Andreu, A. L. & Martí, R. Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* **7**, e1002035 (2011).
475. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–33 (1987).
476. Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–75 (2002).
477. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–82 (2005).
478. Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151**, 653–63 (2005).
479. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2579–86 (2012).

480. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–21 (2012).
481. Cong, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (80-. )*. **339**, 819–823 (2013).
482. Mali, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science (80-. )*. **339**, 823–826 (2013).
483. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
484. Cong, L. & Zhang, F. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1239**, 197–217 (2015).
485. Bansal, N., Yendluri, V. & Wenham, R. M. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control* **16**, 8–13 (2009).
486. Denschlag, D., Ulrich, U. & Emons, G. The diagnosis and treatment of endometrial cancer: progress and controversies. *Dtsch. Arztebl. Int.* **108**, 571–7 (2010).
487. Lu, J., Tan, M. & Cai, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* **356**, 156–164 (2015).
488. Lee, S. Y. *et al.* Wnt/Snail signaling regulates cytochrome C oxidase and glucose metabolism. *Cancer Res.* **72**, 3607–17 (2012).
489. Kang, Y. & Massagué, J. Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Cell* **118**, 277–279 (2004).
490. Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365–375 (2004).
491. Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 265–73 (2009).
492. Liang, J. & Slingerland, J. M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* **2**, 339–45
493. Welcker, M. *et al.* Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol. Cell* **12**, 381–92 (2003).
494. Kelman, Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629–640 (1997).
495. Oyama, M. *et al.* Human NTH1 physically interacts with p53 and proliferating cell nuclear antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 183–91 (2004).
496. Xia, L. *et al.* Human 3-methyladenine-DNA glycosylase: effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease. *J. Mol. Biol.* **346**, 1259–74 (2005).
497. Modrich, P. Mechanisms in Eukaryotic Mismatch Repair. *J. Biol. Chem.* **281**, 30305–30309 (2006).
498. Kadyrov, F. A., Dzantiev, L., Constantin, N. & Modrich, P. Endonucleolytic function of MutL $\alpha$  in human mismatch repair. *Cell* **126**, 297–308 (2006).
499. Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499–506 (2003).
500. Martinus, R. D., Linnane, A. W. & Nagley, P. Growth of rho 0 human Namalwa cells lacking oxidative phosphorylation can be sustained by redox compounds potassium ferricyanide or coenzyme Q10 putatively acting through the plasma membrane oxidase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**, 997–1005 (1993).
501. Inserte, J. *et al.* Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling. *Basic Res. Cardiol.* **111**, 18 (2016).
502. Asakura, M. & Kitakaze, M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ. J.* **73**, 1568–76 (2009).
503. Studencka, M. & Schaber, J. Senoptosis: non-lethal DNA cleavage as a route to deep senescence. *Oncotarget* **8**, 30656–30671 (2017).

504. Albitar, L., Pickett, G., Morgan, M., Davies, S. & Leslie, K. K. Models representing type I and type II human endometrial cancers: Ishikawa H and Hec50co cells. *Gynecol. Oncol.* **106**, 52–64 (2007).
505. Weigelt, B., Warne, P. H., Lambros, M. B., Reis-Filho, J. S. & Downward, J. PI3K pathway dependencies in endometrioid endometrial cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3533–44 (2013).
506. Vineis, P. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis* **24**, 1–6 (2003).
507. Hanahan, D. & Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
508. Koch, M., de Miguel, M., Höfler, H. & Diaz-Cano, S. J. Kinetic profiles of intraepithelial and invasive prostatic neoplasias: the key role of down-regulated apoptosis in tumor progression. *Virchows Arch.* **436**, 413–20 (2000).
509. Kim, M. S., Kang, H. J. & Moon, A. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 349–54 (2001).
510. Fernández, Y., Gu, B., Martínez, A., Torregrosa, A. & Sierra, A. Inhibition of apoptosis in human breast cancer cells: Role in tumor progression to the metastatic state. *Int. J. Cancer* **101**, 317–326 (2002).
511. Mommers, E. C., van Diest, P. J., Leonhart, A. M., Meijer, C. J. & Baak, J. P. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **58**, 163–9 (1999).
512. Sekharam, M. *et al.* Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer Res.* **63**, 7708–16 (2003).
513. Hashimoto, S., Koji, T., Kohara, N., Kanematsu, T. & Nakane, P. K. Frequency of apoptosis relates inversely to invasiveness and metastatic activity in human colorectal cancer. *Virchows Arch.* **431**, 241–8 (1997).
514. Zhang, X., Xu, Q. & Saiki, I. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. *Clin. Exp. Metastasis* **18**, 415–21 (2000).
515. Xiao, E.-H., Hu, G.-D. & Li, J.-Q. Relationship between apoptosis and invasive and metastatic potential of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **1**, 574–6 (2002).
516. Wang, X. *et al.* Sensitivity of human prostate cancer cells to chemotherapeutic drugs depends on EndoG expression regulated by promoter methylation. *Cancer Lett.* **270**, 132–43 (2008).
517. Basnakian, A. G. *et al.* Endonuclease G promotes cell death of non-invasive human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 4139–49 (2006).
518. Bozdoğan, O., Atasoy, P., Ereku, S., Bozdoğan, N. & Bayram, M. Apoptosis-related proteins and steroid hormone receptors in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **21**, 375–82 (2002).
519. Vaskivuo, T. E., Stenbäck, F. & Tapanainen, J. S. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer* **95**, 1463–1471 (2002).
520. Niemann, T. H., Trgovac, T. L., Mcgaughy, V. R. & Vaccarello, L. bcl-2 Expression in Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **63**, 318–322 (1996).
521. Peiró, G., Diebold, J., Baretton, G. B., Kimmig, R. & Löhrs, U. Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **20**, 359–67 (2001).
522. Laban, M., Ibrahim, E. A.-S., Agur, W. & Ahmed, A. M. B. E. Bcl-2 may play a role in the progression of endometrial hyperplasia and early carcinogenesis, but not linked to further tumorigenesis. *J. Microsc. Ultrastruct.* **3**, 19–24 (2015).
523. Yoo, N. J. *et al.* Increased expression of endonuclease G in gastric and colorectal carcinomas. *Tumori* **94**, 351–5

524. Chen, L. *et al.* CD95 promotes tumour growth. *Nature* **465**, 492–496 (2010).
525. Lovric, M. M. & Hawkins, C. J. TRAIL treatment provokes mutations in surviving cells. *Oncogene* **29**, 5048–60 (2010).
526. Tang, H. L. *et al.* Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2240–52 (2012).
527. Ichim, G. *et al.* Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol. Cell* **57**, 860–72 (2015).
528. Liu, X. *et al.* Caspase-3 Promotes Genetic Instability and Carcinogenesis. *Mol. Cell* **58**, 284–296 (2015).
529. Maejima, Y., Kuroda, J., Matsushima, S., Ago, T. & Sadoshima, J. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 408–416 (2011).
530. Wu, R. *et al.* Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via increased ROS production. *EMBO Mol. Med.* **4**, 633–46 (2012).
531. Chiu, J. & Dawes, I. W. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **22**, 592–601 (2012).
532. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709–721 (2014).
533. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**, e1600200–e1600200 (2016).
534. Schumacker, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **10**, 175–176 (2006).
535. Martin-Cordero, C., Leon-Gonzalez, A. J., Calderon-Montano, J. M., Burgos-Moron, E. & Lopez-Lazaro, M. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Curr. Drug Targets* **13**, 1006–28 (2012).
536. Wang, J. & Yi, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1875–84 (2008).
537. Tong, L., Chuang, C.-C., Wu, S. & Zuo, L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Lett.* **367**, 18–25 (2015).
538. Omenn, G. S. *et al.* Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1150–1155 (1996).
539. Klein, E. A. *et al.* Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer. *JAMA* **306**, 1549 (2011).
540. Verhagen, P. C. M. S. Re: Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer. The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Eur. Urol.* **62**, 565–566 (2012).
541. DeNicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–9 (2011).
542. Sayin, V. I. *et al.* Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, 221ra15–221ra15 (2014).
543. Le Gal, K. *et al.* Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci. Transl. Med.* **7**, 308re8–308re8 (2015).
544. Piskounova, E. *et al.* Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* **527**, 186–91 (2015).
545. Stelter, P. & Ulrich, H. D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188–191 (2003).
546. Watts, F. Z. Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* **5**, 399–403 (2006).
547. Quirós, P. M., Mottis, A. & Auwerx, J. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 213–226 (2016).

548. Kazak, L., Reyes, A. & Holt, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 659–71 (2012).
549. Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G. & LeDoux, S. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity--Critical Analysis and Update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012641–a012641 (2013).
550. Tann, A. W. *et al.* Apoptosis Induced by Persistent Single-strand Breaks in Mitochondrial Genome. *J. Biol. Chem.* **286**, 31975–31983 (2011).
551. Szymanski, M. R. *et al.* A domain in human EXOG converts apoptotic endonuclease to DNA-repair exonuclease. *Nat. Commun.* **8**, 14959 (2017).
552. Lee, D. Y. & Clayton, D. A. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J. Biol. Chem.* **273**, 30614–21 (1998).
553. Pohjoismäki, J. L. O. *et al.* Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. *J. Biol. Chem.* **284**, 21446–57 (2009).
554. Pohjoismäki, J. L. O. *et al.* Developmental and pathological changes in the human cardiac muscle mitochondrial DNA organization, replication and copy number. *PLoS One* **5**, e10426 (2010).
555. Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* **370**, 751–62 (2003).
556. Crider, D. G. *et al.* Rad53 is essential for a mitochondrial DNA inheritance checkpoint regulating G1 to S progression. *J. Cell Biol.* **198**, 793–8 (2012).
557. Ro, S. *et al.* The mitochondrial genome encodes abundant small noncoding RNAs. *Cell Res.* **23**, 759–774 (2013).
558. Burzio, V. A. *et al.* Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9430–4 (2009).
559. Vendramin, R., Marine, J.-C. & Leucci, E. Non-coding RNAs: the dark side of nuclear-mitochondrial communication. *EMBO J.* **36**, 1123–1133 (2017).
560. Hashimoto, Y. *et al.* A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6336–41 (2001).
561. Tajima, H. *et al.* Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci. Lett.* **324**, 227–31 (2002).
562. Xu, X., Chua, C. C., Gao, J., Hamdy, R. C. & Chua, B. H. L. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke* **37**, 2613–9 (2006).
563. Muzumdar, R. H. *et al.* Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1940–8 (2010).
564. Kariya, S., Hirano, M., Furiya, Y., Sugie, K. & Ueno, S. Humanin detected in skeletal muscles of MELAS patients: a possible new therapeutic agent. *Acta Neuropathol.* **109**, 367–72 (2005).
565. Thummasorn, S. *et al.* Humanin directly protects cardiac mitochondria against dysfunction initiated by oxidative stress by decreasing complex I activity. *Mitochondrion* (2017). doi:10.1016/j.mito.2017.08.001
566. Thummasorn, S. *et al.* Humanin exerts cardioprotection against cardiac ischemia/reperfusion injury through attenuation of mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc. Ther.* **34**, 404–414 (2016).
567. Charunontakorn, S. T., Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S. C. & Chattipakorn, N. Potential Roles of Humanin on Apoptosis in the Heart. *Cardiovasc. Ther.* **34**, 107–114 (2016).
568. Klein, L. E., Cui, L., Gong, Z., Su, K. & Muzumdar, R. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 197–203 (2013).
569. Oka, S., Ago, T., Kitazono, T., Zablocki, D. & Sadoshima, J. The role of redox modulation of class II histone deacetylases in mediating pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med. (Berl)*. **87**, 785–91 (2009).



