



**Fundació**  
La Marató de TV3  
21º SIMPOSIUM  
Enfermedades del corazón



## **NUEVAS FUNCIONES DE LOS GENES APOPTÓTICOS EN EL DESARROLLO Y ESTRÉS DEL MIOCARDIO**

**Daniel Sanchís Morales**

Institut Recerca Biomèdica de Lleida

## 1. Resumen

El funcionamiento del corazón está influenciado por una red de genes que actúa durante el desarrollo determinando el número correcto de cardiomiocitos, su crecimiento y maduración. En el adulto, la interrupción del suministro de oxígeno y nutrientes induce a la muerte del miocardio, lo que puede derivar en insuficiencia cardíaca. Los genes apoptóticos fueron investigados como dianas para prevenir la muerte celular, pero actualmente se sabe que los genes que regulan la apoptosis podrían ser importantes para el correcto desarrollo cardíaco. Investigaciones previas sugerían que (1) algunos genes apoptóticos, como las caspasas ejecutoras y las nucleasas, regulan el crecimiento y diferenciación del miocardio y que (2) el mantenimiento de la integridad mitocondrial de los fibroblastos cardíacos, que generan la cicatriz fibrosa en un infarto, fundamenta su elevada supervivencia.

Basándonos en estos hechos, nuestras hipótesis de partida eran que (1) las caspasas 3 y 7 y las nucleasas Endog y Tatdn1 son necesarias para la correcta división de los miocitos durante el desarrollo, y (2) los fibroblastos cardíacos utilizan la autofagia en caso de carencia de nutrientes, como por ejemplo durante la isquemia, para mantenerse funcionales.

Para responder a estas hipótesis, nos planteamos como objetivos identificar los mecanismos moleculares por los cuales las caspasas influyen en la división y maduración de los miocitos, así como averiguar si existe una posible asociación entre los genes apoptóticos y la función cardíaca. También quisimos identificar los mecanismos por los cuales la nucleasa Endog controla la división y el crecimiento celular en el corazón, así como caracterizar el rol de la nucleasa Tatdn1 en el miocardio. Por otro lado, quisimos caracterizar la autofagia en los fibroblastos cardíacos en isquemia y su relevancia por la actividad metabólica de estas células. La caracterización bioquímica del corazón de ratones donde anulamos los genes de las caspasas ejecutoras 3 y 7 en el miocardio indica que hay más inflamación, menos miocitos y que estos son más grandes que en ratones normales. Además, realizamos un estudio genómico GWAS incluyendo a 11.500 personas a partir de bases de datos genéticas donde analizamos la posible asociación entre la función cardíaca y cambios en las secuencias de 20 genes apoptóticos, así como un estudio agnóstico global. Este estudio nos permitió confirmar la asociación de algunos reguladores apoptóticos, como

BCL2, CFLIP (cFLAR), FADD, caspasa 8, caspasa 10 y TATDN1, con cambios en marcadores de la función cardíaca; pero además nos permitió identificar otros genes potencialmente relevantes para la función cardíaca e inesperadamente también un vínculo entre genes asociados con la función cardíaca (incluyendo algunos genes apoptóticos) y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Este grupo de datos confirma la influencia de los genes apoptóticos en el desarrollo del corazón y en la función cardíaca y además sugieren que existe un vínculo entre la función cardíaca y la enfermedad de Alzheimer.

El análisis molecular, bioquímico y celular de los modelos de ratones deficientes en las nucleasas Endog y Tatdn1, así como estudios realizados en cardiomiocitos y otras células en cultivo, mostraron que la carencia de Endog, tanto *in vivo* como *in vitro*, genera estrés oxidativo que induce cambios en la señalización celular que tiene como resultado la hipertrofia de los miocitos y el enlentecimiento de la proliferación celular tanto del miocardio como de otros tipos celulares, incluyendo células tumorales. Asimismo, encontramos que la carencia del gen Tatdn1 en los ratones genera un incremento en el diámetro ventricular y cambios en la expresión de muchos genes, lo que sugiere que tiene una función importante en el transporte tanto intracelular como extracelular de proteínas. En conjunto, estos datos confirman un rol importante de Endog y Tatdn1 en la biología cardíaca, ya que influyen en el tamaño y el número de miocitos, pero también el rol de Endog en otras células, incluyendo algunos tumores, y que implica el control de radicales libres de oxígeno (ROS) y el transporte de proteínas. La caracterización bioquímica y funcional de los fibroblastos cardíacos en condiciones normales, de isquemia y de estrés de retículo endoplasmático, ha implicado el análisis de la respiración celular, el estudio del estado de oxidación celular, la cuantificación de la capacidad de supervivencia y proliferación, el estudio de la organización mitocondrial así como la caracterización de la expresión génica y proteica en estas células, comparándolas con fibroblastos de pulmón y piel en varias situaciones de estrés celular. Los resultados descartaron una función importante de la autofagia por la supervivencia de los fibroblastos cardíacos durante la isquemia, pero mostraron que los fibroblastos cardíacos presentan características biológicas que los hacen especialmente capaces de sobrevivir a presiones bajas de oxígeno y condiciones que alteran la distribución del calcio intracelular que implican mayor tasa de consumo de oxígeno, más cadenas respiratorias por mitocondria, niveles elevados de ROS pero mejor control de estos en situaciones de estrés, entre otros. La vía de señalización STAT3 se

encuentra particularmente activada y regula tanto la supervivencia como la expresión de proteínas protectoras en estos fibroblastos. Este bloque de datos aporta nueva información sobre la biología de los fibroblastos cardíacos y su elevada capacidad de supervivencia.

En resumen, los resultados obtenidos confirman la implicación de los genes apoptóticos en el desarrollo y función del miocardio y demuestran que algunos de estos genes están regulando procesos de crecimiento y proliferación de los miocitos mediante la implicación del control de los niveles de radicales libres de oxígeno, las vías de inflamación y el control en el transporte de proteínas. Asimismo, aportamos nuevos datos sobre los fibroblastos cardíacos que permiten comprender mejor cómo funcionan estas células importantes en procesos de respuesta a situaciones de estrés en el corazón. Finalmente, los datos obtenidos sugieren que algunos de los genes importantes para la función cardíaca, incluyendo algunos apoptóticos, son también relevantes y, por lo tanto, posibles dianas en la enfermedad de Alzheimer y algunos tipos de cáncer.

## **2. Resultados**

### **Tarea 1. Funciones de los ejecutores apoptóticos caspasas 3 y 7 y nucleasas Endog y Tatdn1 en el desarrollo del corazón**

- Hay un incremento de citocinas proinflamatorias en el miocardio debido a la carencia de las caspasas ejecutoras 3 y 7 específicamente en este tejido en el ratón.
- La carencia de Endog en los cardiomiocitos de roedor induce a un incremento de la abundancia de radicales libres de oxígeno (ROS), y la inhibición de estos con N-acetil-cisteína es capaz de frenar la hipertrofia derivada de la carencia de este gen.
- La carencia de Endog en células somáticas de roedor y humanas en división retarda su proliferación, que se puede recuperar por añadidura de detoxificantes de ROS.
- La carencia de Endog es capaz de frenar *in vitro* e *in vivo* el crecimiento de tumores deficientes en el supresor tumoral PTEN en modelos de ratón y en líneas celulares tumorales humanas.
- Endog regula la vía de señalización celular Akt/GSK3/beta-catenina a través del control de los niveles de ROS con impacto en el crecimiento y división celular.

- Nuestros datos sugieren que Tatdn1, a pesar de haber sido identificada como nucleasa a partir de experimentos utilizando modelos de sobreexpresión, no está implicada en el corte de ADN al menos en el miocardio y el cerebro puesto que (1) se encuentra en el citoplasma celular y no se transloca a núcleo ni a mitocondrias en ninguna situación de estrés estudiada, (2) extractos celulares enriquecidos en esta proteína no muestran actividad nucleasa *in vitro* y (3) el patrón de genes alterados en el miocardio (y en el cerebro) de ratones deficientes en Tatdn1 indica una función de este gen en el transporte de proteínas y no en la biología de los ácidos nucleicos.
- La carencia de Tatdn1 *in vivo* en ratón induce a un incremento del diámetro del ventrículo izquierdo tanto en sístole como en diástole, lo que sugiere un rol de este gen en la hipertrofia y función cardíaca.

## **Tarea 2. Fibroblastos cardíacos: autofagia, su papel en la función durante el estrés y el papel de Bcl2**

- La autofagia es importante para la supervivencia de los fibroblastos de cualquier origen en condiciones normales, puesto que su inhibición por métodos genéticos (silenciamiento de los genes Atg7 o Bnip3) o farmacológicos (3-metilo adenina o cloroquina) induce a muerte celular. A pesar de esto, la autofagia no parece afectar a la supervivencia de los fibroblastos cardíacos durante la isquemia. Y la carencia del gen Bcl2 tampoco parece afectar al flujo autofágico en estas células.
- Los fibroblastos cardíacos de rata muestran mayor consumo de oxígeno, más abundancia de cadenas respiratorias por mitocondria y una red mitocondrial algo más fragmentada en condiciones normales que otros tipos de fibroblastos.
- Los fibroblastos cardíacos presentan más abundancia de ROS y de enzimas detoxificantes de ROS como la superóxido dismutasa-2 (SOD2) y la catalasa que otros tipos de fibroblastos en condiciones normales, y los regulan mejor en isquemia.
- Los fibroblastos cardíacos tienen un estado de activación especialmente elevado de la vía de señalización STAT3 que afecta a su capacidad de supervivencia en condiciones de estrés celular y que controla la expresión de proteínas como las enzimas detoxificantes de ROS y Bcl2, que protege las mitocondrias en condiciones de isquemia.

## **Tarea 3. Estudios de asociación de todo el genoma para identificar nuevos *loci* que se utilizaron para estudiar la asociación potencial de genes de**

## **señalización celular y apoptosis con fenotipos relacionados con la función cardíaca del corazón humano**

- De los 20 genes con funciones reguladoras de la apoptosis que se analizaron en 11.500 genomas humanos, identificamos asociación estadísticamente significativa de algunos polimorfismos con algún rasgo relacionado con función cardíaca por los genes BCL2, CFLIP (cFLAR), FADD, caspasa 8, caspasa 10 y TATDN1.
- Además, el estudio genómico no dirigido (agnóstico) identificó nuevos polimorfismos en otros genes que se encuentran asociados con la función cardíaca que se pueden consultar en las bases de datos <https://data.mendeley.com/> y <https://doi.org/10.17632/22jdjghnsp.1>.
- De forma totalmente inesperada, la comparación de polimorfismos asociados con la función cardíaca y con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer permitió identificar un grupo de genes que se encuentran asociados con los dos rasgos, incluidos algunos genes apoptóticos, lo que sugiere un potencial vínculo entre función cardiovascular y la enfermedad de Alzheimer que pretendemos seguir estudiando.

### **3. Relevancia y posibles implicaciones futuras**

El proyecto titulado "Nuevas funciones de los genes apoptóticos en el desarrollo y estrés del miocardio" fue diseñado con el objetivo primario de confirmar o descartar la implicación de varios genes apoptóticos en la biología y el comportamiento del miocardio frente a estímulos nocivos, de identificar los mecanismos intracelulares implicados y de caracterizar los mecanismos que confieren a los fibroblastos cardíacos ventaja de supervivencia a situaciones de estrés como la isquemia. El proyecto, por lo tanto, se caracterizaba por un perfil de investigación básica preclínica que sirviera de base para mejorar la comprensión de los fundamentos bioquímicos y moleculares que gobiernan la función del corazón y su respuesta al estrés. La finalidad era encontrar posibles dianas útiles en el diagnóstico o tratamiento tanto de anomalías de la función cardíaca como para mejorar la condición cardíaca en situaciones patológicas.

Los datos generados por nuestro trabajo muestran que, efectivamente, hay genes que se habían descubierto y estudiado en el ámbito de la muerte celular por apoptosis que, de hecho, tienen un papel importante en el desarrollo y biología del miocardio, que estas funciones no se encuentran relacionadas con la muerte celular y que

principalmente influyen el número y la medida de los cardiomiocitos y están relacionados con la función cardíaca. Además, mostramos que los fibroblastos cardíacos están evolutivamente preparados para subsistir a presiones bajas de oxígeno y tienen una serie de mecanismos moleculares que los hacen resistentes a situaciones de estrés celular. Por eso, los resultados derivados del proyecto proponen nuevas dianas moleculares que tendrían que permitir una mejor comprensión de los fundamentos biológicos subyacentes a la hipertrofia cardíaca, los procesos de remodelado cardíaco después de un infarto, su posible tratamiento y los fundamentos genéticos determinantes de la función del corazón.

Además, y de forma inesperada, nuestros datos establecen un vínculo genético entre función cardíaca y enfermedad de Alzheimer e identifican Endog como un nuevo gen implicado en la progresión tumoral. Por lo tanto, se pueden utilizar estos datos para diseñar nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas en el ámbito de las enfermedades del corazón, las enfermedades neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer.

#### **4. Bibliografía científica generada**

##### **Comunicaciones en congresos**

Barés G, Blasco N, Beà A, Girón C, Llovera M, Sanchis D.

*Paralog mitochondrial nucleases ExoG and EndoG have similar roles in cell proliferation but divergent distribution and different impact on apoptosis.*

P19r-51. XL Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, octubre de 2017.

Beà A, Blasco N, Barés G, Martínez M, Vila M, Girón C, Comella J, Llovera M, Sanchis D.  
*Deciphering the molecular signaling that confers high resistance to ischemia in cardiac fibroblasts.*

P19r-47. XL Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, octubre de 2017.

Barés G, Blasco N, Beà A, Girón C, Llovera M, Sanchis D.

*EndoG regulates cell cycle progression through a ROS dependent mechanism.*

42.º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, julio de 2019.

Beà A, Barés G, Martínez M, Vila M, Cámara Y, Girón C, Comella JX, Martí R, Llovera M, Sanchis D.

*Cardiac fibroblasts have high basal ROS abundance and electron transport chain activity compared to fibroblasts of other tissues.*

42.º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, julio de 2019.

### **Publicaciones**

Blasco N, Cámara Y, Núñez E, Beà A, Barés G, Forné C, Ruíz-Meana M, Girón C, Barba I, García-Arumí E, García-Dorado D, Vázquez J, Martí R, Llovera M, Sanchis D.\*

*Cardiomyocyte hypertrophy induced by Endonuclease G deficiency requires reactive oxygen radicals accumulation and is inhibitable by the micropeptide humanin.*

Redox Biology. 2018 Jun;16:146-156. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.021.

\* Autor para correspondencia.

Sáez ME, González-Pérez A, Hernández-Olasagarre B, Beà A, Moreno-Grau S, de Rojas I, Monté-Rubio G, Orellana A, Valero S, Comella JX, Sanchis D,\* Ruiz A.\*

*Genome Wide Meta-Analysis identifies common genetic signatures shared by heart function and Alzheimer's disease.*

Scientific Reports. 2019 Nov 13;9(1):16665. doi: 10.1038/s41598-019-52724-2.

\* Autores para correspondencia.

### **En preparación**

Blasco N,<sup>1</sup> Beà A,<sup>1</sup> Barés G, Girón C, Navarides R, López-Lluch G, Dolcet X, Llovera M, Sanchis D.\*

*EndoG contributes to the regulation of cell proliferation through the control of reactive oxygen species.*

Artículo en preparación.

<sup>1</sup> La contribución de los autores ha sido la misma.

\* Autor para correspondencia.



Beà A, Girón C, Llovera M,\* Sanchis D.\*

STAT3 constitutive activation sustains a set of biological functions conferring survival advantage to heart fibroblasts.

Artículo en preparación.

\* Autores para correspondencia.

### **Bases de datos**

Las bases de datos <https://data.mendeley.com/> y <https://doi.org/10.17632/22jdjghnsp.1>.

### **Tesis doctorales**

Autora: Natividad Blasco Angulo (miembro del equipo del proyecto).

Director: Daniel Sanchis.

Título: *EndoG influeix en el creixement i proliferació cel·lular amb impacte en el desenvolupament dels teixits i la progressió tumoral.*

Fecha y calificación: 22/09/2017, excelente *cum laude*.

Autora: Gisel Barés Junqué (miembro del equipo del proyecto).

Directores: Daniel Sanchis y Marta Llovera.

Título: *Estudi de les funcions no apoptòtiques de les nucleases ExoG i TatD.*

Fecha y calificación: en fase de redacción (fecha prevista de defensa: junio-julio 2020).

Autora: Aida Beà Tàrrega (contratada mediante el proyecto de La Marató de TV3).

Directores: Daniel Sanchis y Marta Llovera.

Título: *Identificació dels fonaments moleculars que confereixen elevada capacitat de supervivència als fibroblasts cardíacs.*

Fecha y calificación: en fase de redacción (fecha prevista de defensa: junio-julio 2020).