



Universitat de Lleida

Caracterització de la biologia dels fibroblasts cardíacs i la seva resposta a estrès cel·lular

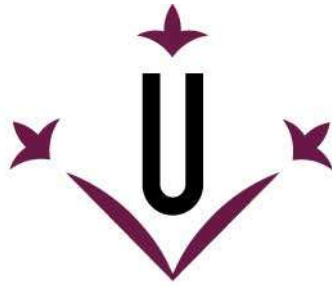
Aida Beà Tàrrega

<http://hdl.handle.net/10803/671500>

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

TESI DOCTORAL

**Caracterització de la biologia dels fibroblasts
cardíacs i la seva resposta a estrès cel·lular**

Aida Beà Tàrrega

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Director/a

Daniel Sanchis Morales

Tutor/a

Daniel Sanchis Morales

2021

Lo que sabemos es una gota de agua.

lo que ignoramos... un océano.

Isaac Newton

Al pare i la mare,

a la Gemma,

Per ser-hi sempre.

 Agreements

Qui em diria a mi 5 anys enrere que ara mateix estaria escrivint la part dels agraïments d'una tesi doctoral!! Uffff... 5 anys... sembla molt temps i sincerament se m'han passat volant! Han estat uns anys tant plens d'emocions i sentiments que costen de descriure en una pàgina. Podria dir que han estat plens d'alegria, però no seria sincera... està clar que una tesi sense la tristesa i la frustració de que les coses no surtin bé o que no vagin per on pensaves inicialment està a la ordre del dia. Si més no, a base de dedicar-li hores i hores, entusiasme, dedicació i moltíssima il·lusió, sembla que ha quedat una tesi bastant bonica.

Aquesta tesi no hagués sigut possible sense el suport incondicional del Daniel Sanchis, a qui agraeixo infinitament haver-me deixat formar part del grup de Senyalització Cel·lular i Apoptosi i confiar amb mi des del principi sense tenir quasi idea de res. Gràcies per haver-me fet de guia en aquest camí, donant-me sempre marge i la confiança per deixar-me fer i desfer i volar en la imaginació, per tots els consells i tot el coneixement que m'has transmès des del primer dia i sobretot per posar sempre la part positiva per seguir endavant, evolucionar i créixer com a investigadora. També agrair a la Marta Llovera, una bellíssima persona disposada a tot i a la que admiro molt. Moltes gràcies per estar sempre present quan hi ha hagut algun problema i per donar un altre punt de vista que ha ajudat a que tota aquesta història hagi quedat tant completa. No puc oblidar-me tampoc de tu Gisel (Guiset para los amigos), amiga i companya de laboratori durant pràcticament tots aquests anys. No hagués sigut el mateix al laboratori sense les teves baixades de sucre que donaven peu a hores i hores de tonteries, les mil discussions que hem tingut perquè has sigut la única capaç de treure'm de les meves caselles, però també per infinites hores de cotilleos i per ser la persona amb el riure més contagiós que conec, t'estimo molt Guiset! I com no...a la Cris Girón, peça fonamental durant molt temps al laboratori, sempre disposada a posar el teu granet de sorra en tot el que calgués, aportant sempre la teva dolçor i tendresa com a persona.

També agrair a tots aquells que, directa o indirectament, s'han vist implicats i han contribuït en el desenvolupament d'aquesta tesi. Al servei de Citometria de l'IRB Lleida, i particularment a l'Anaïs Panosa pel seu treball, ajuda i consells sobre les sondes utilitzades i amb el confocal. Al grup de Fisiopatologia Metabòlica de l'IRB Lleida liderat pel Dr. Manuel Portero-Otín per haver-me deixat utilitzar l'aparell Oxygraph per fer les mesures de respirometria. Al grup de Malalties Metabòliques Complexes i Mitocondri de l'IRB Barcelona liderat pel Dr. Antonio Zorzano per obrir-me les portes del seu laboratori durant la meva estada i en especial a l'Andrea Irazoki, per la seva predisposició a fer el que calgués i les ganes i il·lusió que transmet. Al grup de Fisiologia, Anatomia i Biologia Cel·lular de la Universidad de Pablo Olavide, liderat pel Dr. Guillermo López-Lluch per haver contribuït amb l'anàlisi de la quantitat i l'estat redox del coenzim Q, i finalment al grup de Patologia Neuromuscular i Mitocondrial de l'Institut de recerca de la Vall d'Hebron liderat pel Dr. Ramon Martí i en especial a la Yolanda Cámara per haver iniciat l'anàlisi de l'expressió dels diferents complexos de la cadena respiratòria.

A les veïnes de Senyalització Cel·lular per Calci, a l'Anna Visa i la Lía Alza, que més que veïnes, companyes de laboratori podria dir... tants anys compartint el material com si fóssim un únic grup. Agrair-vos les xerrades a l'hora del cafè, les estones de cotilleos (sobretot de Masterchef jajaja), per totes les estones de bromes i riures, per les hores de "desfogar-nos" de les coses que ens indignen i per tot el feedback que ens hem donat quan teníem algun problema tècnic.

A tots els veïns de PatOnc: al Pol, la Clara, la Inés, l'Anna Ruiz, la Maria, la Izaskun, la Núria i l'Anna Macià per acollir-me i fer-me sentir com una més de PatOnc tot i ser una 'sargento' a la hora de dinar, per tots els cotilleos que no se n'escapa mai un i per les mil hores de riure que m'heu deixat compartir amb vosaltres. Al Raúl, un exemplar únic en extinció, amb la teva manera de ser que ens fas oblidar de tot i disfrutar cada moment fins casi plorar del riure, per organitzar tots els carnivals com si t'hi anés la vida, per tota l'ajuda i consells que m'has donat i per estar sempre disposat a fer el que calgui... i que si no ho recordes, tenim un ball pendent! I en especial a la Cris (Meginoak, Capullito de alelí), vam començar sent companyes de cultius casi sense conèixer-nos, arribant a ser "las dueñas de la sala de cultivos", fins i tot amb banda sonora de cultius (*I, I, follow, I follow youuuu*)! Després vam anar passant més estones juntes gràcies a PetroPump (gràcies Peter), fins arribar al punt de ser part dels Petrofans (qui ens ho diria!!), fins ara... que ets un pilar fonamental de la meua vida. Gràcies i mil gràcies per tots els moments que hem compartit juntes, les mil hores de laboratori quan pràcticament érem les úniques que quedàvem al lrb, per seguir el meu ritme quan sortim en bici perquè estàs "más fuerte que el vinagre" i no hi ha qui et pari, per totes les "villanades" i malignitats que, tot i que de rebot també acabi rebent jo, m'encanten, però sobretot... gràcies per ser-hi SEMPRE quan ho he necessitat. T'estimo molt Cris! Com vas dir un dia... APS 4ever.

A les de FPM, en especial a la Lara (Larindonga, Princess, Lari), personeta molt important que tot i que ens hem conegut més tard, has sigut tot un descobriment. Moltes gràcies pels mil consells, per tenir preparada sempre una bona cara i estar disposada a aguantar les meves "xapes" i rallades, per les estones de riure infinites que ens regales, per tota l'ajuda i dubtes amb l'Oxygraph (dichosa respirometria), però sobretot gràcies per ser com ets i deixar-me formar part de la teva vida! T'estimo molt Larii! I a la Natàlia (Natalises, Natuli, Nataxa, Fidudais)... persona indispensable a la meua vida. Qui ens diria que gràcies a aquell Sticker quan tornaves d'Austràlia seria el detonant d'aquesta gran amistat (i que a partir d'aquell moment els Stickers estarien a la ordre del dia jajaja) Gràcies per deixar-me entrar a la teva ment i mostrar-me que ser dolent no és tant dolent... xD Gràcies per tenir sempre un bon consell preparat, per regalar-me tants moments de riures i d'arribar inclús a plorar amb mil àudios que ho demostren, per tenir tant males idees que si les féssim realitat podrien ser espectaculars (véase Festa Basca, Bocina-Cucaracha i Stickers prohibits amb històries que no s'oblidaran mai...). Gràcies per aparèixer a la meua vida, has vingut per quedar-te! T'estimo molt Nat! I també al Pascual i l'Anna Fernández, per aportar el seu toc d'humor a les converses de l'esmorzar que acaben desvariant en temes absurds però que ens fan oblidar del nostre dia a dia.

No puc oblidar-me tampoc d'aquella gent que al llarg de la tesi han anat deixant petjada en mi, com l'Elena i l'Arabela, companyes de cries de rata i de molts moments de riure, a la Gisela, per deixar-me via lliure per agafar tot el material de WB i les seves ganes de fer xupitos tota la nit, l'Ivan, alias el "sheriff de cultivos" que sempre m'ha defensat davant dels atacs de la Cris i el Raúl, a la Judit Ribas i el Javi Chicote per donar-me la oportunitat de seguir aprenent al seu laboratori en els últims mesos de tesi, i a la Loli per fer-nos més amenes les tardes amb el seu 'salero' i tots els cotilleos del lrb.

Al Marc... Vas aparèixer de nou a la meva vida en un moment molt difícil i em vas demostrar que l'amistat, per molts anys que passin, sempre perdura. Moltes gràcies per estar disposat sempre a treure'm un somriure, donar-me ànims i repetir-me dia rere dia que jo puc amb això, per tot el suport que m'has donat i que ha sigut essencial, per ser tu... moltes gràcies Marc! Ets molt important per mi!

A la Eli, la millor amiga que es pot tenir. Gràcies i mil gràcies per tot. Gràcies per ser com ets, per entendre'm i donar-me sempre tot el suport i els ànims que he necessitat. Gràcies per haver-me deixat compartir gran part de la teva vida amb mi, per mostrar-te tal com ets i estar sempre disposada a tot per mi. Gràcies pels àudios infinits (que odio) però que han sigut tant necessaris per no tirar la tovallola, per les trucades, pels consells, pels moments de riure i desconexió, pels moments de crisi i desesperació, però sobretot, gràcies per ser-hi sempre. T'estimo molt Lily!

Al Willy, perquè després de tants anys segueixes aguantant-me i estimant-me com el primer dia. Han estat uns mesos molt durs i tot i haver passat per una muntanya russa de sentiments i emocions tu has estat sempre allà per animar-me, recolzar-me, entendre'm i fer-me veure que podia amb tot això i més. Gràcies per donar-me espai quan ho necessitava i donar-me una abraçada quan ja no podia més, per distreure'm quan estava apunt de saturar i per cuidar-me fins al punt que només hagués de pensar amb la tesi, gràcies per fer-ho tot més fàcil.... sense tu això no hagués sigut possible. Ho ets tot! T'estimo moltíssim!

I... no podria acabar aquests agraïments sense donar les gràcies a les persones més importants de la meva vida... el pare, la mare i la Gemma. Vull agrair-vos cada una de les coses que heu fet per mi. Gràcies a vosaltres sóc qui sóc, per estar sempre disposats a donar-ho tot per mi, per ser un suport incondicional en tot aquest procés, per ser l'exemple a seguir d'esforç i constància, per entendre'm i confiar en mi, per recolzar-me en totes les decisions i per tot i cada un dels vostres consells. Sou i sereu sempre la força que em fa tirar endavant. Us estimo moltíssim i ho he aconseguit gràcies a vosaltres!!!



Resumes

RESUM

Els fibroblasts cardíacs són els principals productors de la matriu extracel·lular que cohesiona la musculatura del cor, conferint-li les propietats ideals per transformar la contracció dels cardiomiòcits en el moviment de la paret cardíaca que permet el bombeig de la sang. A més, aquestes cèl·lules intervenen en el procés de sincronització del batec i la secreció de factors tròfics potenciant el creixement del cor durant el desenvolupament. En condicions patològiques, com ara el tall del flux sanguini al miocardi (isquèmia), els fibroblasts cardíacs secreten la matriu que generarà la cicatriu durant la mort del miocardi. No obstant, tot i que aquest esdeveniment és essencial per sobreviure a l'infart, la deposició de matriu extracel·lular pot representar una complicació si s'allarga en el temps o s'activa excessivament. Per això, s'està destinant molt esforç a la identificació de l'origen embrional i els tipus cel·lulars precisos que constitueixen la població de fibroblasts cardíacs, a re-avaluar la seva abundància al cor, així com a comprendre la regulació de la síntesi i secreció de matriu extracel·lular. El nostre grup havia demostrat que els fibroblasts cardíacs expressen elevats nivells de Bcl-2, una proteïna anti-apoptòtica que els protegeix la integritat mitocondrial durant la isquèmia, reduint l'activació de les caspases. Tot i que s'ha caracteritzat bé la quantitat, l'origen genètic i l'activitat dels fibroblasts cardíacs, hi ha poca informació sobre els mecanismes implicats en la resistència d'aquestes cèl·lules a la isquèmia i per això, vam decidir seguir investigant aquest aspecte. La hipòtesi inicial era que l'autofàgia, un procés implicat en el reciclatge de components cel·lulars regulat per Bcl-2 i que pot ser utilitzat per obtenir energia, podia estar implicada en la major supervivència dels fibroblasts cardíacs a la isquèmia. L'anàlisi de l'autofàgia a fibroblasts primaris neonatals de rata, utilitzant tant inhibidors químics com el silenciament de gens clau, va mostrar que és un procés important en condicions normals però no durant la isquèmia en aquestes cèl·lules. Malgrat això, vam trobar que l'elevada expressió de Bcl-2 és necessària per la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions normals, a més de durant la isquèmia i l'estrès de reticle. També vam trobar que aquestes cèl·lules presenten diverses característiques associades a la major capacitat de supervivència en relació a d'altres fibroblasts, incloent major respiració basal i de reserva, nivells de radicals lliures d'oxigen elevats però millor controlats durant la isquèmia, nivells elevats d'expressió d'enzims antioxidants i de complexos de la cadena respiratòria, però menys expressió de Pgc-1 α i Mitofusina-2, associat a una xarxa mitocondrial amb més mitocondris aïllats. Aquestes característiques es troben relacionades amb la major activació de senyalització inflammatòria i vam mostrar que moltes depenen d'una activació basal elevada de la via de transducció de senyal Jak/Stat. En conjunt, els nostres resultats ajuden a la millor comprensió de les característiques biològiques subjacents a la major capacitat de supervivència dels fibroblasts cardíacs.

RESUMEN

Los fibroblastos cardíacos son los principales productores de la matriz extracelular que cohesiona la musculatura del corazón, confiriéndole las propiedades ideales para transformar la contracción de los cardiomiocitos en el movimiento de la pared cardíaca que permite el bombeo de la sangre. Además, estas células intervienen en el proceso de sincronización del latido y la secreción de factores tróficos potenciando el crecimiento del corazón durante el desarrollo. En condiciones patológicas, tales como el corte del flujo sanguíneo al miocardio (isquemia), los fibroblastos cardíacos secretan la matriz que generará la cicatriz durante la muerte del miocardio. Sin embargo, aunque este evento es esencial para sobrevivir al infarto, la deposición de matriz extracelular puede representar una complicación si se alarga en el tiempo o se activa excesivamente. Debido a eso, se está destinando mucho esfuerzo a la identificación del origen embrionario y los tipos celulares precisos que constituyen la población de fibroblastos cardíacos, a re-evaluar su abundancia en el corazón, así como a comprender la regulación de la síntesis y secreción de matriz extracelular. Nuestro grupo había demostrado que los fibroblastos cardíacos expresan niveles elevados de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica que protege la integridad mitocondrial durante la isquemia, reduciendo la activación de las caspasas. Aunque se han caracterizado bien la cantidad, el origen genético y la actividad de los fibroblastos cardíacos, hay poca información sobre los mecanismos implicados en la resistencia a la isquemia de estas células y por eso decidimos seguir investigando este aspecto. La hipótesis inicial era que la autofagia, un proceso implicado en el reciclaje de componentes celulares regulado por Bcl-2 y que puede ser utilizado para obtener energía, podía estar implicada en la mayor supervivencia de los fibroblastos cardíacos a la isquemia. El análisis de la autofagia en fibroblastos primarios neonatales de rata, utilizando tanto inhibidores químicos como el silenciamiento de genes clave, mostró que es un proceso importante en condiciones normales, pero no durante la isquemia en estas células. Sin embargo, encontramos que la elevada expresión de Bcl-2 es necesaria para la supervivencia de los fibroblastos cardíacos en condiciones normales, además de durante la isquemia y el estrés de retículo. Encontramos también que estas células presentan varias características asociadas a la mayor capacidad de supervivencia en relación a otros fibroblastos, incluyendo mayor respiración basal y de reserva, niveles de radicales libres de oxígeno elevados pero mejor controlados durante la isquemia, niveles elevados de expresión de enzimas antioxidantes y de complejos de la cadena respiratoria, pero menos expresión de Pgc-1 α y Mitofusina-2, asociado a una red mitocondrial con más mitocondrias aisladas. Estas características están relacionadas con la mayor activación de señalización inflamatoria y mostramos que muchas dependen de una activación basal elevada de la vía de transducción de señal Jak/Stat. En conjunto, nuestros resultados ayudan a una mejor comprensión de las características biológicas subyacentes a la mayor capacidad de supervivencia de los fibroblastos cardíacos.

ABSTRACT

Cardiac fibroblasts are the main producers of the extracellular matrix that binds together the cardiac muscle, giving it the ideal properties to transform the contraction of cardiomyocytes into the movement of the heart wall that allows blood pumping. In addition, these cells intervene in the process of beat synchronization and the secretion of trophic factors, enhancing the growth of the heart during development. In pathological conditions such as cut off of blood flow to the myocardium (ischemia), cardiac fibroblasts secrete the matrix that will generate the scar during myocardial death. Although this event is essential to survive the infarction, the deposition of extracellular matrix can represent a complication if it is prolonged in time or is excessively activated. That is why a lot of effort is being devoted to identifying the embryonic origin and the precise cell types that make up the population of cardiac fibroblasts, to re-evaluating their abundance in the heart, as well as to understanding the regulation of extracellular matrix synthesis and secretion. Our group had shown that cardiac fibroblasts express a high level of Bcl-2, an anti-apoptotic protein that protects mitochondrial integrity during ischemia, reducing the activation of caspases. Although the number, genetic origin, and activity of cardiac fibroblasts have been well characterized, there is little information on the mechanisms involved in the resistance of these cells to ischemia and that is why we decided to continue investigating this aspect. The initial hypothesis was that autophagy, a process involved in the recycling of cellular components regulated by Bcl-2 and that can be used to obtain energy, could be involved in the greater survival of cardiac fibroblasts to ischemia. Analysis of autophagy in neonatal rat primary fibroblasts, using both chemical inhibitors and key gene silencing, showed that it is an important process under normal conditions, but not during ischemia in these cells. However, we found that the high expression of Bcl-2 is necessary for the survival of cardiac fibroblasts under normal conditions, as well as during ischemia and reticulum stress. We also found that these cells present several characteristics associated with a higher survival capacity in relation to other fibroblasts, including greater basal and reserve respiration, elevated levels of reactive oxygen species, which are better controlled during ischemia, high levels of expression of antioxidant enzymes and of complexes of the respiratory chain, but less expression of Pgc-1 α and Mitofusin-2, associated with a mitochondrial network with more isolated mitochondria. These characteristics are related to the greater activation of inflammatory signaling and we show that many of them depend on a high basal activation of the Jak/Stat signal transduction pathway. Taken together, our results help to better understand the biological characteristics underlying the greater survival capacity of cardiac fibroblasts.



Index

ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES	XXVI
ÍNDEX DE FIGURES - Resultats.....	XXVII
ÍNDEX DE TAULES.....	XXIX
ABREVIATURES	XXXIII
INTRODUCCIÓ	3
1. Anatomia i fisiologia del cor	3
1.1 Estructura i funció del cor	3
1.1.1 Fibroblasts cardíacs.....	4
1.1.1.1 Resposta dels fibroblasts a una lesió cardíaca	5
1.2 Mort cel·lular al miocardi	8
2. El mitocondri.....	8
2.1 Generalitats	8
2.2 Biogènesi i dinàmica mitocondrial	10
2.3 Genoma mitocondrial (ADNmit)	13
2.3.1 Estructura de l'ADNmit.....	14
2.4 Bioenergètica mitocondrial.....	15
2.4.1 El cicle de Krebs.....	15
2.4.2 La cadena de transport electrònic (ETC)	16
2.4.2.1 Organització dels complexos de l'ETC	22
2.4.2.2 Producció de ROS per l'ETC.....	22
2.5 Espècies reactives de l'oxigen en la regulació de les funcions cel·lulars.....	23
2.5.1 Enzims antioxidants.....	25
3. Vies de senyalització de resposta cel·lular a l'estrès.....	27
3.1 Resposta de proteïnes mal plegades (UPR)	27
3.2 Autofàgia	30
3.2.1 Mecanisme autofàgic	31
3.2.2 Autofàgia selectiva	33
3.3 Apoptosi	35
3.3.1 Família Bcl-2	38
3.3.1.1 Funcions no apoptòtiques dels membres de la família de Bcl-2.....	39
3.4 Relació entre UPR, autofàgia i apoptosi	40
3.5 Vies de senyalització cel·lular que promouen supervivència	41
3.5.1 Vies RISK i SAFE	41
3.5.2 Via Nrf2	44
3.5.3 HIF1	45
3.6 Vies implicades en la inflamació	45

3.6.1	Via NF- κ B.....	45
3.6.2	Via cGAS-STING	47
	HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	53
	MATERIALS I MÈTODES	57
1.	Animals d'experimentació	57
1.1	Consideracions prèvies	57
2.	Tècniques de Biologia Cel·lular	57
2.1	Cultius cel·lulars	57
2.1.1	Cultiu primari i manteniment de fibroblasts neonatals de rata.....	57
2.1.2	Manteniment de la línia cel·lular HEK 293T	59
2.2	Tractaments i drogues utilitzades	59
2.3	Recomptes cel·lulars.....	60
2.3.1	Recompte de viabilitat amb Blau Tripà	60
2.4	Subfraccionament cel·lular	60
2.4.1	Extracció de nucli.....	60
2.5	Producció de lentivirus en la línia cel·lular HEK293T	61
2.5.1	Transfecció amb polietilenamina (PEI) i producció de lentivirus	61
2.5.2	Transducció dels cultius amb lentivirus	61
2.6	Immunofluorescència (IF)	62
2.7	Anàlisi de la producció de ROS	62
2.8	Anàlisi de la massa mitocondrial i el potencial de membrana mitocondrial	63
2.9	Mesura de la respiració mitocondrial.....	63
2.10	Quantificació dels nivells de succinat	64
3.	Tècniques de Bioquímica i Biologia Molecular	65
3.1	Construccions plasmídiques per al silenciament gènic.....	65
3.1.1	Interferència d'ARN	65
3.1.2	Construccions de shRNA	66
3.2	Amplificació en cadena de la polimerasa	67
3.2.1	Extracció d'ARN.....	67
3.2.2	Síntesi de cDNA.....	67
3.2.3	PCR en temps real (RT-PCR)	67
3.3	Immunodetecció de proteïnes.....	68
3.3.1	Western blot.....	68
3.3.1.1	Extracció de proteïna total	68
3.3.1.2	Quantificació de proteïnes pel mètode de Lowry	68
3.3.1.3	Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	69
3.3.1.4	Transferència de proteïnes.....	69
3.3.1.5	Immunodetecció de proteïnes.....	70

4. Eines bioinformàtiques	72
5. Anàlisi estadístic	72
RESULTATS	75
1. Expressió de Bcl-2 i la seva implicació en la supervivència	75
2. Implicació de l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts.....	76
2.1 Caracterització de l'expressió de marcadors autofàgics	76
2.2 Efecte del silenciament de proteïnes implicades en l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts durant la isquèmia.....	78
2.3 Efecte de la inhibició farmacològica de l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts ..	79
3. Anàlisi de l'estrès oxidatiu	81
3.1 Quantificació d'espècies reactives de l'oxigen.....	81
3.2 Anàlisi de l'expressió d'enzims antioxidants.....	83
4. Anàlisi de la respiració mitocondrial	84
4.1 Anàlisi del consum d'oxigen en condicions basals.....	84
4.2 Anàlisi del possible rol de Bcl-2 en el control de la respiració	88
4.3 Anàlisi de l'expressió dels components de la cadena respiratòria	89
4.4 Estudi de l'origen dels ROS als fibroblasts.....	90
5. Anàlisi de la biogènesi i dinàmica mitocondrial.....	92
6. Anàlisi de la resposta dels fibroblasts a l'estrès de reticle.....	95
7. Anàlisi de vies de senyalització que participen en la supervivència.....	100
7.1 Anàlisi de la via RISK	100
7.2 Anàlisi de la via Nrf2	101
7.2 Anàlisi de la via HIF1.....	101
7.2 Anàlisi de la via cGAS-STING.....	102
7.3 Anàlisi de la via NF- κ B	103
7.4 Anàlisi de la via SAFE	104
7.4.1 Caracterització de l'expressió basal	105
7.4.2 Efecte de la inhibició de pStat3.....	105
DISCUSSIÓ	115
CONCLUSIONS	131
BIBLIOGRAFIA.....	135

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Estructura del cor	4
Figura 2. Transicions fenotípiques dels fibroblasts cardíacs durant la resposta a una lesió cardíaca	5
Figura 3. Els macròfags i els miofibroblasts participen en la fase proliferativa de la curació d'una lesió cardíaca.....	7
Figura 4. Visió general del mitocondri i les seves funcions	9
Figura 5. Dinàmica mitocondrial: Maquinària i context	11
Figura 6. Dinàmica mitocondrial. Mecanismes de fusió i fissió mitocondrial.....	12
Figura 7. Vies del control de qualitat mitocondrial	13
Figura 8. Organització de l'ADNmit en mamífers.....	14
Figura 9. El cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons estan estretament coordinats	16
Figura 10. Dissociació del complex II per a la inducció de l'apoptosi	19
Figura 11. Representació esquemàtica de la cadena de transport electrònic.....	21
Figura 12. Esquema de la cadena de transport electrònic i llocs de producció d'anió superòxid.....	23
Figura 13. Reaccions i transformacions del superòxid	25
Figura 14. Rol de la SOD en les vies de senyalització redox.....	26
Figura 15. Vies de senyalització de la UPR	29
Figura 16. El procés de la macroautofàgia	31
Figura 17. La mitofàgia	35
Figura 18. Via extrínseca i intrínseca de l'apoptosi	37
Figura 19. Classificació de la família Bcl-2	38
Figura 20. Model esquemàtic de la relació entre la UPR, l'autofàgia i l'apoptosi.....	41
Figura 21. Diferents vies de senyalització intracel·lular regulades per la família de tirosina quinases JAK.	43
Figura 22. Via canònica i no canònica de NF- κ B	46
Figura 23. Via d'activació d'Isg15	48
Figura 24. Via cGAS-STING.....	49
Figura 25. Imatges representatives en contrast de fase dels diferents tipus de fibroblasts primaris derivats de rates neonatals.	59
Figura 26. Esquema del protocol experimental per l'anàlisi de la respiració mitocondrial	64
Figura 27. Mecanisme d'interferència d'ARN pel silenciament de l'expressió gènica.....	66

ÍNDIX DE FIGURES - Resultats

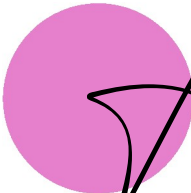
Figura 1. El silenciament de <i>Bcl2</i> als fibroblasts cardíacs indueix la pèrdua de supervivència, i possiblement, proliferació, tant en normòxia com en isquèmia	75
Figura 2. Els fibroblasts cardíacs indueixen l'expressió de Bcl-2 i LC3 en presència de rapamicina	76
Figura 3. Els fibroblasts cardíacs expressen més Bcl-2 i Atg7, i en condicions d'isquèmia expressen més Bnip3 que els altres tipus de fibroblasts.....	77
Figura 4. El silenciament gènic de <i>Bnip3</i> als fibroblasts cardíacs afecta la supervivència en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia	78
Figura 5. El silenciament gènic d' <i>Atg7</i> als fibroblasts cardíacs afecta la supervivència en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia	79
Figura 6. El bloqueig de l'autofàgia amb la 3-MA afecta la supervivència dels fibroblasts en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia	80
Figura 7. El bloqueig de l'autofàgia amb la CQ afecta la supervivència dels fibroblasts en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia	80
Figura 8. El tractament amb Cloroquina indueix l'acumulació de Bnip3 i de LC3.....	81
Figura 9. Els fibroblasts cardíacs produeixen nivells més elevats de ROS mitocondrials en condicions basals i controlen l'increment en condicions d'isquèmia experimental	82
Figura 10. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de MnSOD, Catalasa i Glutatió Peroxidasa que els fibroblasts pulmonars i dèrmics.....	83
Figura 11. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells més elevats de glutatió reduït (GSH) que els fibroblasts pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i aquests disminueixen durant la isquèmia.....	84
Figura 12. Els fibroblasts cardíacs consumeixen més oxigen en comparació als altres fibroblasts en condicions basals	86
Figura 13. Els fibroblasts cardíacs consumeixen més oxigen en comparació als altres fibroblasts en concentracions d'oxigen fisiològiques (3% O ₂).....	87
Figura 14. El silenciament del gen <i>Bcl2</i> no afecta a la capacitat de reserva respiratòria ni al consum d'oxigen associat a la producció d'ATP en els fibroblasts cardíacs.....	88
Figura 15. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de les subunitats dels complexos II, III, IV i V però no del complex I ni de citocrom C.....	89
Figura 16. Els fibroblasts cardíacs mostren una tendència a una ràtio més baixa de CoQ9H ₂ /CoQ9, però no hi ha diferències en la ràtio CoQ10H ₂ /CoQ10, ni en la quantitat total de CoQ9 i CoQ10	90
Figura 17. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells més alts de succinat, un potencial de membrana mitocondrial més elevat i l'addició de rotenona incrementa més els ROS en els fibroblasts cardíacs	91
Figura 18. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells similars de proteïnes mitocondrials i tenen la mateixa massa mitocondrial tot i tenir una àrea cel·lular més gran.....	92
Figura 19. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més baixos de Pgc1- α i Mfn2, i nivells similars de Tfam, Opa-1 i Drp1 que els fibroblasts pulmonars i dèrmics.....	93

Figura 20. Els fibroblasts cardíacs tenen més mitocondris aïllats (individuals) amb un patró de distribució mitocondrial més fragmentat	94
Figura 21. Els fibroblasts cardíacs són més resistent a la inducció de mort per estrès de reticle amb Tunicamicina i Thapsigargina respecte als altres fibroblasts	95
Figura 22. El tractament amb els inductors d'estrès de reticle Tunicamicina i Thapsigargina indueixen canvis similars a la via PERK als diferents fibroblasts en quant a α BIP, p-eIF2 α i ATF4, però no en l'activació de Caspasa-3 i LC3	96
Figura 23. El tractament amb els inductors d'estrès de reticle Tunicamicina i Thapsigargina indueixen canvis similars a la via PERK als diferents fibroblasts en quant a α BIP, p-eIF2 α i ATF4, però no en l'activació de Caspasa-3 i LC3	97
Figura 24. El silenciament de <i>Bcl2</i> als fibroblasts cardíacs redueix la seva supervivència tant en condicions control com en presència de l'inductor d'estrès de reticle Thapsigargina	98
Figura 25. La Thapsigargina a temps curts indueix de manera similar la via PERK als fibroblasts cardíacs i als dèrmics, però no en la inducció de Caspasa-3, Bcl-2 i LC3	99
Figura 26. El nivell d'expressió i activació de la via de senyalització regulada per Akt és similar als tres tipus de fibroblasts	100
Figura 27. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells similars de transcrit (ARNm) de <i>Nrf2</i> als altres tipus de fibroblasts i <i>Nrf2</i> no regula l'expressió de Bcl-2	101
Figura 28. El factor de transcripció induïble per hipòxia HIF1 α mostra tendència a acumular-se durant la isquèmia, sense diferències entre els tres tipus de fibroblasts	102
Figura 29. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells més elevats de transcrit (ARNm) d' <i>'sg15</i> que els altres tipus de fibroblasts	103
Figura 30. Els fibroblasts cardíacs tenen tendència a presentar nivells més elevats de p65 al nucli tant en condicions de normòxia com d'isquèmia	104
Figura 31. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de pStat3 (Tyr ⁷⁰⁵) que els altres fibroblasts	105
Figura 32. La Silibinina (SBN) indueix una disminució de l'expressió de pStat3 (Tyr ⁷⁰⁵) i Stat3 total de forma dependent de la dosi i el temps d'incubació	106
Figura 33. El bloqueig específic de la fosforilació de Stat3 amb la SBN afecta la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i d'isquèmia experimental	106
Figura 34. El tractament dels fibroblasts cardíacs amb l'inhibidor específic de Stat3, Silibinina (SBN), indueix una disminució en l'abundància del propi Stat3 i de proteïnes relacionades amb la respiració cel·lular i alguns enzims implicats en la neutralització de ROS	107
Figura 35. Els fibroblasts cardíacs tractats durant 24 hores amb l'inhibidor específic de Stat3, SBN, no mostren canvis significatius en el consum d'oxigen	108
Figura 36. La SBN no indueix increment dels nivells de ROS mitocondrials als fibroblasts cardíacs	109
Figura 37. El tractament dels fibroblasts cardíacs amb l'inhibidor específic de Jak2, AG490, indueix una disminució de l'abundància de pStat3 i de proteïnes relacionades amb la respiració cel·lular i alguns enzims implicats en la neutralització de ROS	110

Figura 38. La inhibició de Jak2 amb AG490 afecta la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i d'isquèmia experimental.....	111
Figura 39. Els fibroblasts cardíacs tractats durant 24 hores amb l'inhibidor específic de Jak2, AG490, mostra canvis significatius dels paràmetres analitzats del consum d'oxigen	111
Figura 40. L'inhibidor AG490 indueix un increment dels nivells de ROS mitocondrials als fibroblasts cardíacs	112
Figura 41. L'inhibidor de Jak2 AG490 produeix una disminució dels nivells de transcrit (ARNm) d' <i>'sg15</i> en els fibroblasts cardíacs.....	112

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Tractaments i drogues utilitzats en aquest treball.....	59
Taula 2. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per la immunofluorescència.....	62
Taula 3. shRNAs utilitzats en el nostre estudi	66
Taula 4. Sondes utilitzades per l'anàlisi en la RT-PCR	68
Taula 5. Anticossos primaris utilitzats per al Western Blot	70
Taula 6. Anticossos secundaris utilitzats per al Western Blot	71

 *Abbreviatures*

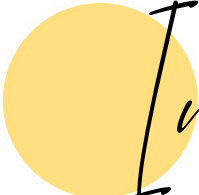
ABREVIATURES

ACE	Enzim convertidor d'angiotensina
ADNmit	ADN mitocondrial
AIF	Factor inductor d'apoptosi
ALFY	Proteïna que conté domini FYVE associat amb autofàgia
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
Ang-II	Angiotensina II
Apaf-1	Factor 1 activador d'apoptosi per proteases
ARNr	ARN ribosòmic
ARNt	ARN de transferència
ASK1	Quinasa 1 reguladora de la senyal d'apoptosi
ATF4	Factor 4 activador de la transcripció
ATF6	Factor 6 activador de la transcripció
ATG	Gens relacionats amb l'autofàgia
AVN	Node auriculoventricular
Bcl-2	Cèl·lules B2 de limfoma
BiP	Proteïna d'unió a les immunoglobulines
BNIP3	Proteïna 3 interaccionant amb Bcl-2
BSA	Albúmina de sèrum boví
CARD	Domini d'activació i reclutament de Caspases
CAT	Catalasa
cGAMP	GMP-AMP cíclic
cGAS	Sintasa de GMP-AMP cíclic
CHOP	Proteïna homòloga a C/EBP
Cit C	Citocrom C
CoQ	Coenzim Q
CuZnSOD	Superòxid dismutasa de coure-zinc
Cytb	Citocrom b
DAMPs	Patrons moleculars associats a danys
DFCP1	Proteïna 1 que conté doble FYVE
DHODH	Dihidroorotat deshidrogenasa
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DRP1	Proteïna GTPasa 1 relacionada amb la dinamina
ECM	Matriu extracel·lular
eIF2 α	Factor d'iniciació 2 α de la traducció eucariota
EndoG	Endonucleasa G
eNOS	Sintasa d'òxid nítric endotelial
ER	Reticle endoplasmàtic

ERAD	Degradació de proteïnes associada al reticle endoplasmàtic
ERK1/2	Quinasa reguladora de senyals extracel·lulars
ETC	Cadena de transport electrònic
ETFQOR	Flavoproteïna de transport d'electrons ubiquinona oxidoreductasa
FAD	Flavina adenina dinucleòtid
FADD	Proteïna de domini de mort associat a Fas
FBS	Sèrum fetal boví
FIP200	Proteïna d'interacció amb la família FAK de 200kDa
Fis1	Proteïna de fissió 1
FMN	Flavina mononucleòtid
FUNDC1	Proteïna 1 amb domini FUN14
G3PDH	Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa
G6PD	Deshidrogenasa de glucosa-6-fosfat
GADD34	Proteïna 34 d'arrest del creixement i induïble per danys a l'ADN
GLUT	Transportador de glucosa
GM-CSF	Factor estimulant de la colònia de granulòcits/macròfags
GPx	Glutatió peroxidasa
GSH	Glutatió reduït
GSK-3 β	Quinasa 3 β glicogen sintasa
GSSG	Glutatió oxidat
GST	Glutatió-S-Transferasa
HIF1	Factor induïble per hipòxia 1
HO-1	Proteïna hemo-oxigenasa 1 de resposta a estrès
HRE	Elements de resposta a la hipòxia
HSC70	Proteïna relacionada de xoc tèrmic de 70kDa
I/R	Isquèmia/Reperfusió
ICAM1	Molècula d'adhesió intercel·lular 1
IFN1	Interferó de tipus 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IM	Membrana interna
IMS	Espai intermembrana
IRE1 α	Enzim que requereix d'inositol 1 α
IRF	Factor regulador d'interferó
ISG	Gens estimuladors d'interferó
JAK	Quinasa Janus
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal

Keap1	Proteïna 1 associada a Kelch-like ECH
LAMP2A	Proteïna 2A associada a la membrana lisosomal
LC3	Proteïna associada a microtúbuls 1 de cadena lleugera 3
LIR	Regió d'interacció amb LC3
LOX	Lisil-oxidases
Mff	Factor de fissió mitocondrial
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MiD49/51	Proteïna 49/51 de dinàmica mitocondrial
MMPs	Metal-loproteïnases de matriu
MnSOD	Superòxid dismutasa de manganés
mPTP	Porus de transició de permeabilitat mitocondrial
mTOR	Diana de mamífer de la rapamicina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NDP52	Proteïna de punt nuclear 52
NIK	Quinasa inductora de NF- κ B
NIX	Proteïna X semblant a Nip3
NO	Òxid nítric
NRF1/2	Factors respiratoris nuclears 1 i 2
O ₂ ⁻	Radical superòxid
OCR	Taxa de consum d'oxigen
OH	Radical hidroxil
OM	Membrana externa
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OPA1	Atròfia òptica 1
OPTN	Optineurina
OxPhos	Fosforilació oxidativa
PDK1	Quinasa 1 dependent de fosfatidilinositol
PERK	Quinasa semblant a PKR
PGC-1 α	Coactivador 1 α dels receptors- γ activadors de la proliferació dels peroxisomes
PHB2	Prohibitina 2
PHD	Proteïnes amb domini prolil-hidroxilasa
PI3K	Quinasa fosfatidilinositol-3
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfat
PINK1	Quinasa 1 induïda per PTEN
PKA	Proteïna quinasa A dependent de cAMP
PKC	Proteïna quinasa C
Prx	Peroxiredoxina

Q ⁻	Radical semiquinona
RET	Transport revers d'electrons
RIDD	Degradació/Disminució regulada dependent d'IRE1 α
RISK	Quinasa de recuperació de lesions per reperfusió
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
RRC	Capacitat respiratòria de reserva
SAFE	Factor activador de promoure la supervivència
SAN	Node sinoauricular
SDH	Succinat deshidrogenasa
SQSTM1/p62	Sequestosoma-1
STAT	Transductor del senyal i activador de la transcripció
STING	Proteïna estimuladora de gens d'interferó resident a l'ER
TBK1	Quinasa 1 d'unió a TANK
TF	Factor de transcripció
TFAM	Factor A de transcripció mitocondrial
TGF- β	Factor de creixement transformant- β
TLRs	Receptor Toll-like
TNFR	Receptor del factor de necrosi tumoral
TNF- α	Factor de necrosi tumoral- α
TRAF	Factor 2 del receptor associat al factor de necrosi tumoral
TRAIL	Lligand inductor d'apoptosi relacionat amb TNF
Trx	Tioredoxina
Ub	Ubiqüitina
UBD	Domini d'unió a la ubiqüitina
ULK	Quinasa 1 de tipus Unc-51
UPR	Resposta de proteïnes mal plegades
VCAM1	Molècula d'adhesió cel·lular vascular 1
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular
VPS15	Proteïna Vacuolar classificada 15
VPS34	Proteïna Vacuolar classificada 34
WIPI	Proteïna d'interacció amb fosfoinositol amb domini repetit WD
XIAP	Proteïna inhibidora de l'apoptosi associada a X
α -KG	α -cetoglutarat
α -SMA	Actina muscular llisa- α
Δp	Força protó-motriu
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana mitocondrial

 *Introducció*

INTRODUCCIÓ

1. Anatomia i fisiologia del cor

1.1 Estructura i funció del cor

El cor és l'òrgan principal del sistema circulatori i és l'encarregat de subministrar la sang i l'oxigen a tot l'organisme a través dels vasos sanguinis. Està envoltat pel pericardi, que és una membrana fibroserosa que manté el cor en la posició correcta permetent el moviment de la contracció. La paret del cor està formada per tres capes: l'epicardi, que és la capa més externa del cor, el miocardi, que consta de feixos de fibres musculars cardíques conferint la capacitat de contracció del cor, i l'endocardi, que és la capa interna que revesteix les cavitats del cor i cobreix les vàlvules cardíques.

El cor està format per quatre cambres, dos aurícules i dos ventricles. Les aurícules són les encarregades de rebre la sang i estan connectades amb les venes. En canvi, els ventricles són els encarregats d'enviar la sang cap a la resta d'òrgans i teixits i estan connectats amb les artèries. El septo és una paret muscular interna que separa els costats dret i esquerre del cor per tal d'evitar que la sang oxigenada i desoxigenada es barregi i també ajuda a mantenir la forma i rigidesa del cor (Anderson et al., 2004). La sang desoxigenada arriba al cor per l'aurícula dreta a través de les venes cava superior i inferior, i circula a través de la vàlvula tricúspide cap al ventricle dret on és bombejada a l'artèria pulmonar cap als pulmons. Aquí s'alliberarà el diòxid de carboni procedent del metabolisme cel·lular i es captarà l'oxigen, i a través de les venes pulmonars retornarà al cor, a l'aurícula esquerra. D'aquí, a través de la vàlvula mitral passa al ventricle esquerre, el qual s'encarrega d'impulsar la sang per la vàlvula aòrtica cap a l'aorta, amb suficient força per a que circuli per tot el cos.

La circulació de la sang a través de les cambres cardíques es dona mitjançant moviments rítmics i automàtics de contracció i relaxació, anomenats sístole i diàstole. La sístole és un moviment de contracció dels ventricles, fent que la sang surti d'aquests cap a les artèries, mentre que la diàstole és un moviment de relaxació que provoca un augment del volum acompanyat d'una caiguda de la pressió. Això fa que la sang de les aurícules passi als ventricles per igualar la pressió entre ambdues cambres i omplint de nou els ventricles reiniciant el cicle (Dini et al., 2013).

A nivell cel·lular, el cor està format per diferents tipus cel·lulars que contribueixen a les propietats estructurals, mecàniques, bioquímiques i elèctriques. D'entre els tipus cel·lulars, els cardiomiòcits, auriculars i ventriculars, formen les parets musculars del cor (miocardi) i són els responsables de la contracció muscular. Les fibres de Purkinje i les cèl·lules Pacemaker són cardiomiòcits especialitzats que generen i condueixen els impulsos elèctrics, i les cèl·lules endotelials formen l'endocardi, el revestiment interior dels vasos sanguinis i les vàlvules cardíques. Els fibroblasts cardíacs inicialment es pensava que constituïen més del 50% de les cèl·lules del cor, no obstant, dades recents mostren

que representen menys del 20% (Pinto et al., 2016). Finalment, les cèl·lules musculars llises contribueixen a les artèries coronàries i al sistema vascular.

El node sinoauricular (SAN) està format per cèl·lules Pacemaker i es troba a l'aurícula dreta generant impulsos per iniciar la contracció cardíaca. El node auriculoventricular (AVN) està situat entre les aurícules i els ventricles i condueix l'impuls elèctric de les aurícules fins als ventricles (Figura 1) (Anderson et al., 2004).

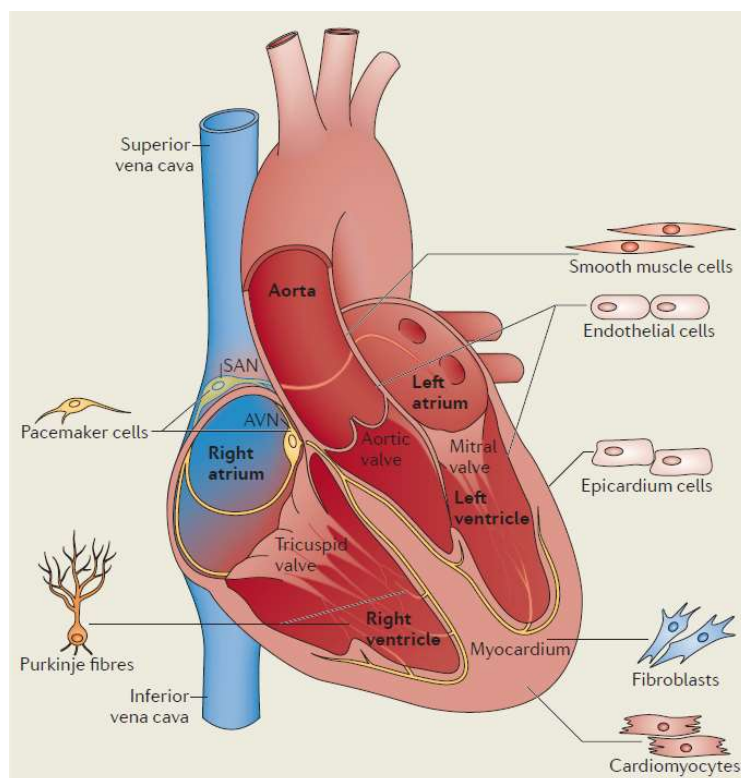


Figura 1. Estructura del cor. Tall transversal d'un cor on es mostren les diferents parts i els tipus cel·lulars que el formen (Xin et al., 2013).

1.1.1 Fibroblasts cardíacs

Els fibroblasts són cèl·lules d'origen mesenquimàtic que produeixen matriu extracel·lular. Aquesta és densa, irregular i està composta per col·lagen, proteoglicans i glicoproteïnes. El principal component de la matriu és el col·lagen fibril·lar, el 85% del qual és de tipus I, el 10-15% de tipus III, i <5% de tipus V. Altres components que produeixen els fibroblasts cardíacs són la periostina i la fibronectina (Weber et al., 2013; Ivey and Tallquist, 2016; Humeres and Frangogiannis, 2019).

Els fibroblasts cardíacs contribueixen al desenvolupament cardíac, a l'estructura del miocardi, a la senyalització cel·lular i a la funció electromecànica. En el miocardi normal, són cèl·lules quiescents (fibroblasts madurs o residents) involucrades en el manteniment de la integritat i l'estructura del teixit del miocardi, incloent l'homeòstasi de la matriu extracel·lular (ECM) i la producció de factors que participen en el manteniment d'un equilibri entre la síntesi i la degradació dels components de l'ECM,

com citocines, factors de creixement o metal·loproteïnases de la matriu (MMPs, *Matrix metalloproteinases*) (Camelliti et al., 2005; Tallquist and Molkentin, 2017).

Els fibroblasts cardíacs formen una xarxa complexa de cèl·lules interconnectades per diferents tipus d'unions contribuint a la comunicació cel·lular i modulant les propietats electrofisiològiques cardíques. D'aquesta manera, poden actuar com acobladors elèctrics de cardiomiòcits llunyans contribuint a la sincronització de la contracció (Humeres and Frangogiannis, 2019).

La matriu extracel·lular cardíaca és una xarxa sensible als estiraments i participa activament en la transducció de senyals mecànics a les cèl·lules cardíques. Els fibroblasts detecten una tensió mecànica, i mitjançant canvis en el seu potencial de membrana i a través de diverses vies, promouen la proliferació cel·lular, l'increment de la deposició de proteïnes de la matriu extracel·lular i l'alliberament de factors de creixement i MMPs (Camelliti et al., 2005). A més, els fibroblasts cardíacs tenen un paper central en el procés de remodelació (formació de la cicatriu fibrosa) després d'una lesió al miocardi, que inclou la hipertrofia dels cardiomiòcits, la migració i la proliferació dels fibroblasts i canvis en la composició de l'ECM (Deb and Ubil, 2014).

1.1.1.1 Resposta dels fibroblasts a una lesió cardíaca

Després d'una lesió cardíaca, els cardiomiòcits moren per necrosi provocant una resposta inflamatòria i fibrogènica massiva per desenvolupar la cicatriu fibròtica com a resposta reparadora (Ranjan et al., 2019). La integritat estructural del miocardi sembla ser mantinguda pels fibroblasts activats, que són fibroblasts transformats fenotípicament i es coneixen com a miofibroblasts (Weber et al., 2013). La curació de l'infart consta de tres fases; la fase inflamatòria, la fase proliferativa i la fase de maduració. Durant les tres fases, els fibroblasts cardíacs se sotmeten a transicions fenotípiques des de la quiescència a un fenotip inflamatori i de degradació de la matriu (fibroblast actiu) fins a un fenotip de miofibroblast generador de matriu, que tornarà a la quiescència a mesura que la cicatriu madura (Figura 2) (Tallquist and Molkentin, 2017; Humeres and Frangogiannis, 2019).

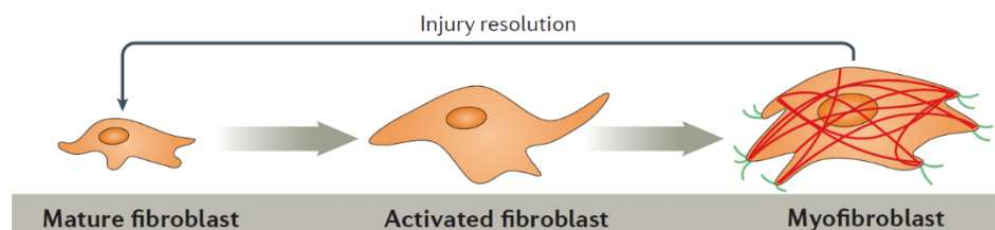


Figura 2. Transicions fenotípiques dels fibroblasts cardíacs durant la resposta a una lesió cardíaca. Els fibroblasts madurs (residents) mantenen la matriu extracel·lular i tenen un baix nivell de proliferació. Després d'una lesió, una població de fibroblasts proliferen ràpidament i s'activen. Seguidament, aquests fibroblasts activats es diferencien a miofibroblasts, els quals expressen actina muscular llisa- α (α -SMA; α -*Smooth Muscle Actin*). Una vegada resolta la lesió, els miofibroblasts poden retornar a l'estat de fibroblast resident (Tallquist and Molkentin, 2017)

Durant la fase inflamatòria, els patrons moleculars associats a danys (DAMPs, *Damage-associated Molecular Patterns*) alliberats pels cardiomiòcits necròtics, activen un fenotip estimulador de la inflamació en fibroblasts cardíacs que secreten citocines com la interleucina-1 β i la 6 (IL-1 β , IL-6), el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*) i el factor estimulador de la colònia de granulòcits/macròfags (GM-CSF; *Granulocyte Macrophage Colony - Stimulating Factor*) que contribueixen al reclutament de macròfags per l'eliminació de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques mitjançant fagocitosi. A més, els fibroblasts també segreguen metal·loproteïnases de matriu (MMPs) promovent la degradació de l'ECM. La fagocitosi de cèl·lules mortes estimula senyals antiinflamatòries, com la IL-10 i el factor de creixement transformant (TGF- β_1 , *Transforming Growth Factor- β_1*) posant fi a la fase inflamatòria i donant pas a la fase proliferativa (Humeres and Frangogiannis, 2019).

L'expansió dels fibroblasts cardíacs i l'adquisició d'un fenotip de miofibroblasts són trets de la fase proliferativa. La principal font cel·lular de la població dels miofibroblasts activats són els fibroblasts cardíacs residents (Tallquist and Molkentin, 2017). No obstant, hi ha altres fonts cel·lulars com les cèl·lules endotelials que experimenten una transició endoteli-mesènquima, o perícits i cèl·lules musculars llises vasculares que poden patir la conversió a miofibroblasts, tot i que representen una part molt minoritària de la població dels miofibroblasts (Ranjan et al., 2019).

Durant la fase proliferativa, els macròfags expressen renina i l'enzim convertidor d'angiotensina (ACE; *Angiotensin-Converting Enzyme*), generant angiotensina-II (Ang-II) al lloc de la lesió. Aquesta s'uneix al receptor d'angiotensina II tipus 1 (AT₁) activant el TGF- β_1 i desencadenant l'aparició de miofibroblasts a la zona de la lesió. La migració dels miofibroblasts és regulada per factors de creixement, com el TGF- β_1 i per citocines inflamatòries com la IL-1 β i el TNF- α , i depèn de la formació i la interrupció contínua de les interaccions adhesives entre les proteïnes superficials dels fibroblasts i de la matriu circumdant, implicant l'activació d'integrines i la producció de proteases que degraden la matriu (Weber et al., 2013; Humeres and Frangogiannis, 2019).

Els miofibroblasts expressen proteïnes contràctils com l'actina muscular llisa- α (α -SMA; *α -Smooth Muscle Actin*), sintetitzen periostina i regulen la deposició de proteïnes de l'ECM (com la fibronectina ED-A, col·lagen de tipus I i III i proteoglicans) i inhibidors de la degradació de la matriu. A més, també produeixen Ang-II que condueix a més fibrosi mitjançant la seva unió autocrina al receptor AT₁ mantenint la síntesi de col·lagen. El TGF- β_1 suprimeix l'expressió de les MMPs per evitar la degradació de la matriu (Figura 3) (Weber et al., 2013).

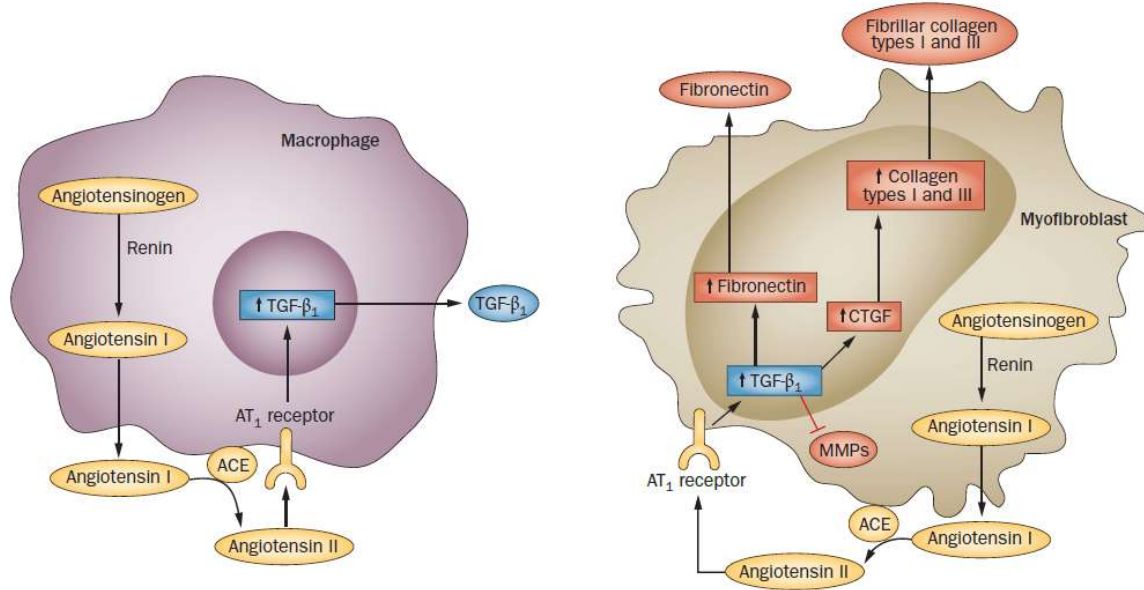


Figura 3. Els macròfags i els miofibroblasts participen en la fase proliferativa de la curació d'una lesió cardíaca. Els macròfags i els miofibroblasts generen angiotensina-II i expressen el seu receptor AT_1 . Les accions autocrines de l'angiotensina-II en els macròfags, mitjançant la unió del receptor AT_1 , donen com a resultat l'expressió de $TGF-\beta_1$. Aquest $TGF-\beta_1$ desencadena l'aparició de miofibroblasts, que produeixen més $TGF-\beta_1$ mitjançant la senyalització d'angiotensina-II. El $TGF-\beta_1$ també estimula els miofibroblasts a produir fibronectina i col·lagen de tipus I i tipus III per formar una cicatriu i preservar la integritat estructural del miocardi del cor (Weber et al., 2013).

Finalment, durant la fase de maduració de la cicatriu, els miofibroblasts perden l' α -SMA i produeixen enzims reticulants de matriu com les lisil-oxidases (LOX) amb la formació d'una cicatriu de col·lagen reticulat. No obstant, si les vies de transducció de senyals es mantenen actives es produeix una fibrosi progressiva i una remodelació cardíaca adversa. Així doncs, la deposició excessiva de col·lagen és una característica de les cardiomiopaties i és la responsable de la transició a una insuficiència cardíaca (Weber et al., 2013).

L'eliminació dels detonants fibròtics constituiria una eina potencial per aturar la progressió de la remodelació cardíaca i per tant afavorir la funció cardíaca. Els potencials objectius per interrompre l'eix fibrosi – mort cel·lular són proteïnes de l'ECM (com les MMPs), senyals paracrines i inflamatòries (com $TGF-\beta$) i els fibroblasts. Per exemple, alguns estudis han demostrat que la inhibició de MMPs o de $TGF-\beta$ resulta en una reducció de la fibrosi i preserva la funció cardíaca. En canvi, assajos amb IL-1 no van mostrar efectes beneficiosos sobre la funció cardíaca. El descobriment de microRNAs específics de fibroblasts que controlen la resposta fibròtica obre noves vies per dirigir-se directament als fibroblasts, ja que alguns estudis de sobreexpressió de microRNAs impedeixen la fibrosi cardíaca. Una altra estratègia innovadora és la reprogramació dels miofibroblasts en cardiomiòcits revertint els efectes de l'eix fibrosi – mort cel·lular i preservant la funció cardíaca (Piek et al., 2016).

1.2 Mort cel·lular al miocardi

La malaltia cardíaca isquèmica és la causa principal de mortalitat a tot el món i és responsable del ~20% de les morts a la Unió Europea tant en homes com en dones. Els cardiomiòcits comencen a morir durant l'exposició a la isquèmia perllongada i, mentre que la reperfusió és necessària per limitar aquest procés, provoca un pic de mort cel·lular que contribueix a la mida final de l'infart.

En la isquèmia i reperfusió (I/R) al miocardi, els nivells d'oxigen disminueixen dràsticament, la respiració mitocondrial disminueix i el metabolisme anaeròbic s'activa ràpidament però no és capaç d'aportar suficient ATP per mantenir el gradient d'ions i el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). A més, el substrat mitocondrial succinat, s'acumula durant la isquèmia, promovent la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) mitjançant un transport revers dels electrons a través del complex I. En la reperfusió, es torna a introduir el subministrament d'oxigen a les cèl·lules i es reinicia la respiració mitocondrial. L'ATP és necessari per restablir l'homeòstasi iònica, però també reactiva el bombeig de calci (Ca^{2+}) al reticle provocant alliberament espontani de Ca^{2+} al citosol, danyant components cel·lulars i esgotant l'ATP a l'intentar restablir els nivells de Ca^{2+} . Aquesta sobrecàrrega citosòlica de Ca^{2+} condueix a una captació d'aquest pel mitocondri, provocant una sobrecàrrega mitocondrial de Ca^{2+} que causa danys mitocondrials i provoca l'obertura del porus mitocondrial. Aquesta obertura fa que els mitocondris siguin incapaços de mantenir el potencial de membrana, l'ATP s'esgota i el bombeig d'ions s'atura, i en conseqüència la cèl·lula s'infla per un procés anomenat 'oncosi', que es defineix com un estadi pre-letal després d'una lesió cel·lular. Poc després, l'oncosi condueix a la necrosi, definida per la interrupció física i caòtica de la membrana cel·lular. No obstant, es poden activar altres vies de mort cel·lular programada, com la necroptosi o la piroptosi (Del Re et al., 2019; Davidson et al., 2020). De fet, els processos de mort que afecten al miocardi durant la isquèmia i la isquèmia/reperfusió han estat debatuts durant dècades, com s'explicarà més endavant.

2. El mitocondri

2.1 Generalitats

Els mitocondris són orgànuls localitzats al citoplasma de les cèl·lules eucariotes. La seva funció principal és la producció d'ATP a través de la fosforilació oxidativa (OxPhos) però també estan implicats en nombrosos processos fisiològics, com la mort cel·lular programada, l'autofàgia, el metabolisme d'aminoàcids, lípids i nucleòtids, la senyalització redox i l'homeòstasi del calci entre d'altres (Tait and Green, 2012; Pfanner et al., 2019).

La ultraestructura del mitocondri es caracteritza per una doble membrana, la membrana mitocondrial externa que està en contacte amb el citosol, i la interna que forma invaginacions conegudes com

crestes mitocondrials cap a la matriu mitocondrial. L'espai que delimiten la membrana mitocondrial interna i l'externa s'anomena espai intermembrana (Tilokani et al., 2018).

A la membrana mitocondrial interna es localitzen quatre complexos de la cadena de transport electrònic i l'ATP sintasa. A més, la seva composició de lípids és diferent a les altres membranes, amb una proporció important de cardiolipina que li confereix una elevada impermeabilitat, inclús enfront als protons, de manera que tots els intercanvis de metabòlits entre la matriu i l'exterior es realitzen mitjançant transportadors específics. En canvi, a la membrana mitocondrial externa s'hi troben les porines, que formen grans canals que permeten el pas de molècules i ions amb una massa molecular inferior a 5 kDa. A més, aquesta membrana compta amb un transportador, la translocasa de la membrana externa (complex TOM), que és la principal via d'entrada al mitocondri de molècules de major mida.

La matriu mitocondrial conté l'ADN mitocondrial (ADNmit), els enzims del cicle de Krebs i de la β -oxidació dels àcids grassos ja que és on tenen lloc aquests processos essencials (Osellame et al., 2012). Només un petit conjunt de proteïnes són codificades pel genoma mitocondrial, ja que aproximadament el 99% de les proteïnes mitocondrials estan codificades per gens nuclears i depenen de senyals específiques que les dirigeixen del citosol, on es sintetitzen, cap als receptors de la superfície mitocondrial i després cap als compartiments mitocondrials específics (Pfanner et al., 2019).

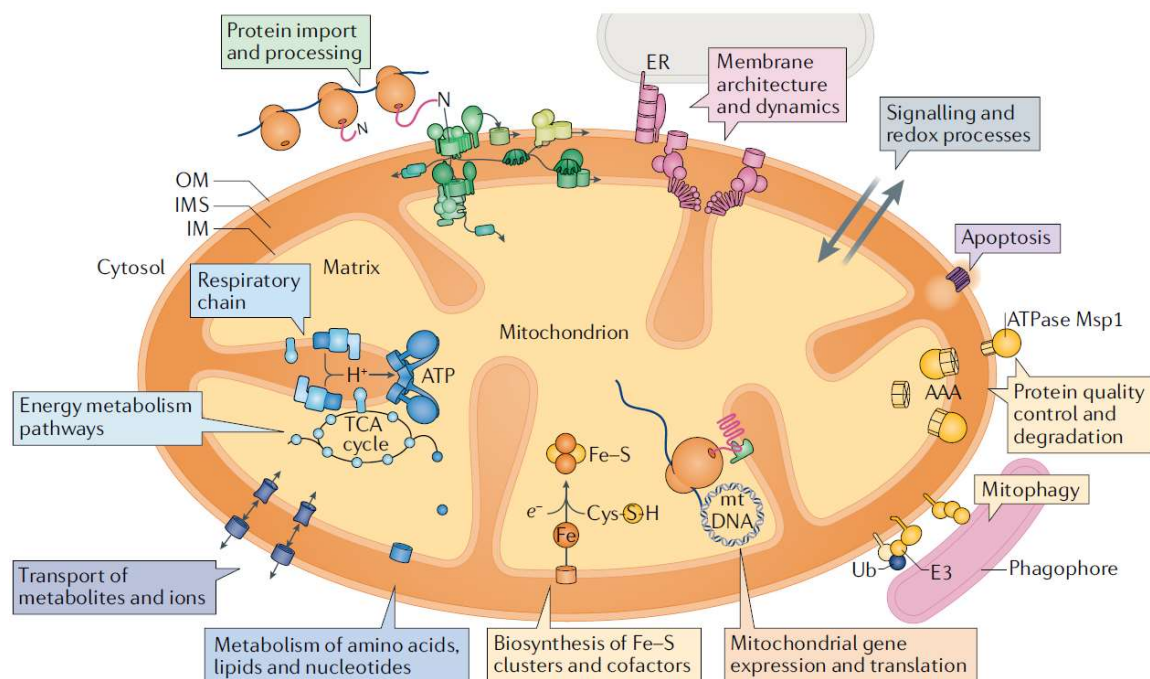


Figura 4. Visió general del mitocondri i les seves funcions. Els mitocondris presenten quatre compartiments: membrana externa (OM), espai intermembrana (IMS), membrana interna (IM) i matriu. Els mitocondris estan implicats en el metabolisme energètic amb la respiració i la síntesi d'ATP, el metabolisme d'aminoàcids, lípids i nucleòtids, biosíntesi de centres ferro-sofre (Fe-S), expressió del genoma mitocondrial, el control de qualitat de les proteïnes (mitofàgia i apoptosi), la senyalització redox, la dinàmica de la membrana i la importació i processament de proteïnes (Pfanner et al., 2019).

Diverses vies metabòliques, com el cicle de Krebs, el metabolisme dels aminoàcids, lípids i nucleòtids tenen lloc principalment a la membrana interna i la matriu mitocondrial. Els electrons derivats de l'oxidació de metabòlits s'incorporen a la cadena de transport d'electrons generant un gradient electroquímic mitjançant el bombeig de protons de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana. Aquest gradient de protons s'utilitza per la síntesi d'ATP per la F_1F_0 -ATP sintasa i per permetre la importació de proteïnes precursors i el transport de metabòlits a través de la membrana interna.

Les funcions dels mitocondris que són essencials per la viabilitat cel·lular inclouen la síntesi de centres ferro-sofre (Fe-S) i cofactors, la importació i maduració de proteïnes mitocondrials i l'expressió i traducció de gens mitocondrials. A més, participen en el control de qualitat (incloent mitofàgia i apoptosi) i en el recanvi de proteïnes mitocondrials. També són importants en la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i contenen nombroses vies de senyalització redox (Figura 4) (Pfanner et al., 2019).

2.2 Biogènesi i dinàmica mitocondrial

L'homeòstasi mitocondrial s'assegura mitjançant la coordinació de processos de biogènesi, dinàmica mitocondrial i mitofàgia. La biogènesi mitocondrial és el procés pel qual es formen nous mitocondris per divisió de mitocondris preexistents. Aquest procés implica la síntesi de membranes mitocondrials internes i externes i de proteïnes codificades pel mitocondri, la síntesi i importació de proteïnes mitocondrials codificades pel nucli i la replicació de l'ADNmit. La biogènesi mitocondrial requereix la coordinació de l'expressió de gens codificats pel nucli i pel mitocondri per tal d'assegurar el correcte funcionament d'un gran nombre de proteïnes que comprenen la cadena respiratòria mitocondrial (Osellame et al., 2012).

Diversos estímuls, tant endògens com exògens, regulen la biogènesi a través del coactivador dels receptors- γ activadors de la proliferació dels peroxisomes 1 α (PGC-1 α ; *peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α*). PGC-1 α és el regulador principal i interactua amb els factors nuclears de transcripció 1 i 2 (NRF1 i NRF2; *Nuclear Respiratory Factor 1/2*) augmentant la seva expressió, els quals activen la transcripció de gens nuclears que codifiquen per proteïnes mitocondrials, com el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM; *Mitochondrial Transcription Factor A*). TFAM s'importa al mitocondri mitjançant la maquinària d'importació de proteïnes on és essencial per la replicació, la transcripció i el manteniment del genoma mitocondrial. A més, NRF1/2 s'uneixen a les regions del promotor de gens que codifiquen per les subunitats de la cadena de transport electrònic produint un augment del consum d'oxigen i de síntesi d'ATP i regulant gens implicats en la importació de proteïnes mitocondrials codificades pel nucli (Uittenbogaard and Chiamello, 2014; Li et al., 2017).

Actualment se sap que els mitocondris poden modular la seva morfologia mitjançant dos esdeveniments oposats; la fissió i la fusió, que són essencials per assegurar la funció mitocondrial i

respondre a la demanda energètica adaptant la xarxa segons la disponibilitat de nutrients i l'estat metabòlic de la cèl·lula. Aquests processos es coneixen com la dinàmica mitocondrial (Liesa et al., 2009; Schrepfer and Scorrano, 2016). La fissió mitocondrial es caracteritza per la divisió d'un mitocondri en dos mitocondris i és essencial per la biogènesi i herència dels orgànuls, mentre que la fusió mitocondrial és la unió de dos mitocondris i és essencial per mantenir l'ADNmit i la respiració cel·lular.

La desregulació d'aquests esdeveniments resulta en una xarxa fragmentada caracteritzada per mitocondris petits o en una xarxa fusionada amb mitocondris elongats connectats. La fragmentació mitocondrial normalment va lligada a una disfunció mitocondrial, ja que predomina en situacions d'estrès sever i permet l'eliminació dels mitocondris mitjançant l'autofàgia (mitofàgia) o en estressos prolongats es produeix apoptosi. En canvi, sota un estrès lleu, els mitocondris s'elonguen i formen una xarxa interconnectada que els confereix protecció enfront l'autofàgia promoguda per una privació de nutrients i s'associa majoritàriament a mecanismes de supervivència cel·lular amb un increment de la producció d'ATP (Figura 5) (Zemirli et al., 2018).

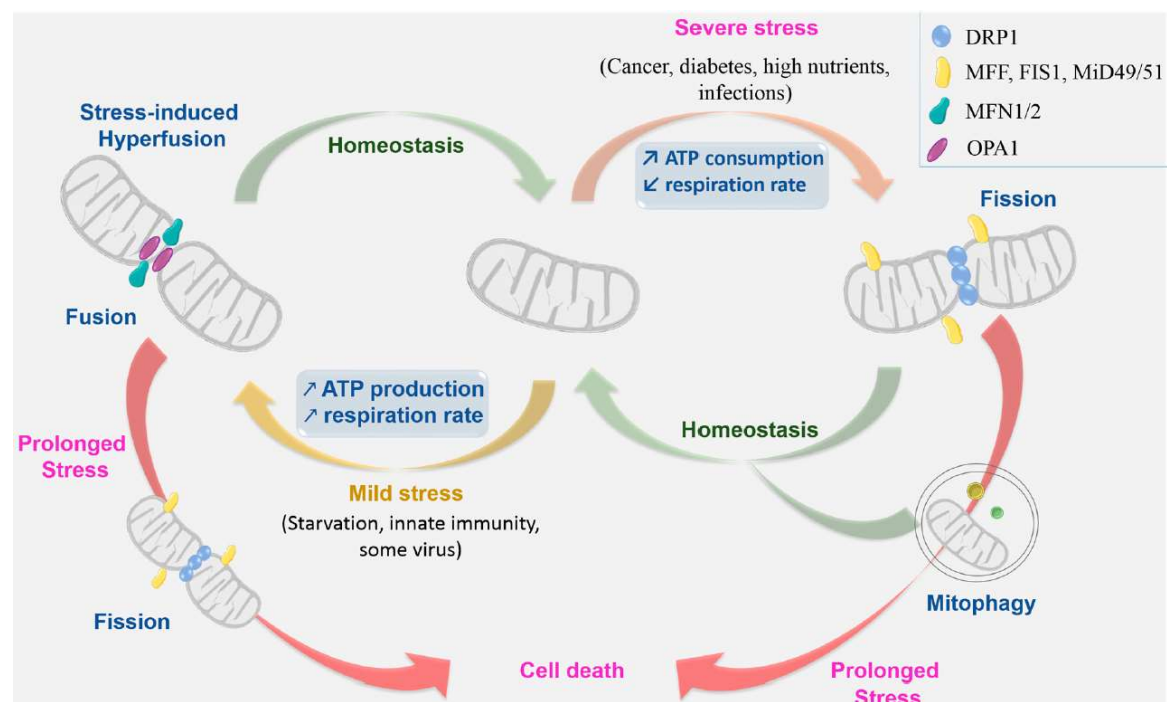


Figura 5. Dinàmica mitocondrial: Maquinària i context. L'equilibri entre la fissió i la fusió mitocondrial depèn del context cel·lular i les circumstàncies que fan que s'inclinin cap a un d'aquests dos processos. En situacions d'estrès lleu, els mitocondris formen una xarxa fusionada interconnectada, mentre que en estressos greus, els mitocondris presenten una forma fragmentada. Si no es pot mantenir l'homeòstasi, es produeix l'eliminació dels mitocondris per mitofàgia, o si es prolonga l'estrès, per apoptosi (Zemirli et al., 2018).

En la fissió mitocondrial el major efector és la DRP1 (o DNM1L; *GTPase Dynamin-Related Protein 1*). Es localitza al citosol fins que és translocada a la superfície mitocondrial, on s'uneix a diferents proteïnes efectores adaptadores, com la proteïna de fissió 1 (Fis1; *Fission 1 protein*), el factor de fissió mitocondrial (Mff; *Mitochondrial Fission Factor*), i les proteïnes 49/51 de dinàmica mitocondrial

(MiD49 i MiD51; *Mitochondrial Dynamics protein 49/51*) (Figura 6). Durant la fissió, la DRP1 és reclutada a la membrana mitocondrial externa, hidrolitza GTP promovent un canvi conformacional, i s'oligomeritza en estructures d'anell o espiral per dur a terme la constricció i escissió de la membrana. L'activitat de DRP1 és regulada per modificacions post-traduccionals, com ubiquitinització, SUMOilació o fosforilacions. Pel que fa a les fosforilacions post-traduccionals, la fosforilació per PKA (*cAMP-dependent Protein Kinase A*) a la Ser⁶³⁷ bloqueja l'activitat GTPasa i inactiva la fissió; en canvi, la fosforilació per CDK1/ciclina B a la Ser⁶¹⁶ promou la fissió (Sprenger and Langer, 2019).

La fusió mitocondrial és un procés que requereix la coordinació de la membrana externa i la interna en dos esdeveniments seqüencials. En mamífers aquest procés depèn de 3 proteïnes fusogèniques de la família de les *dynamamin-like* GTPases: la Mitofusina 1 (MFN1) i la Mitofusina 2 (MFN2) localitzades a la membrana mitocondrial externa, i OPA1 (*Optic Atrophy 1*) localitzada a la membrana mitocondrial interna (Schrepfer and Scorrano, 2016). Les MFN1 i MFN2 formen homo o heterodímers i inicien el procés mitjançant la unió de les membranes mitocondrials externes de dos mitocondris adjacents i la subseqüent fusió mitjançant la hidròlisi de GTP.

Seguidament, OPA1 completa el procés fusionant les membranes mitocondrials internes (Figura 6). A més, OPA1 és important en la morfologia de les crestes mitocondrials, i per tant pel correcte funcionament del sistema de transport d'electrons que es troba a la membrana mitocondrial interna, i en el manteniment de l'ADNmit (Zemirli et al., 2018; Dorn, 2019). L'activitat de les mitofusines està regulada a nivell transcripcional i post-traduccional. La MFN2 també està implicada en la unió mitocondri-reticle endoplasmàtic (RE).

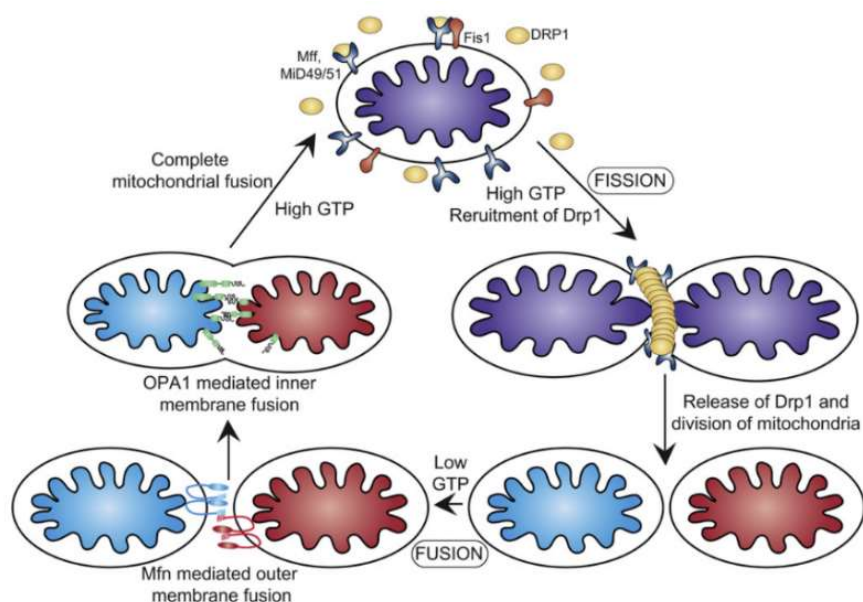


Figura 6. Dinàmica mitocondrial. Mecanismes de fusió i fissió mitocondrial. La fissió mitocondrial està regulada per Drp1, que forma oligòmers d'alt pes molecular a la superfície mitocondrial. Un cop alliberat Drp1 es produeix la divisió dels mitocondris. La fusió mitocondrial és un procés de dos passos que requereix la fusió de la membrana externa i la interna. La fusió de la membrana externa es dona per la unió de les mitofusines de les membranes adjacents, mentre que la membrana interna es fusiona mitjançant OPA1 (Osellame et al., 2012).

En resum, l'homeòstasi mitocondrial s'assegura mitjançant processos de biogènesi, dinàmica i autofàgia mitocondrial. A més, la dinàmica mitocondrial va lligada a diverses funcions mitocondrials. La fusió mitocondrial permet l'intercanvi de contingut, com l'ADNmit, proteïnes, lípids i metabòlits necessaris pel manteniment genètic i la homogeneïtat bioquímica entre mitocondris. A més, és molt important per la fosforilació oxidativa a través de la regulació dels nivells d'ADNmit. En canvi, la fissió mitocondrial assegura el control de qualitat dels mitocondris facilitant l'eliminació d'òrgànuls danyats a través de la mitofàgia i és essencial per separar els mitocondris entre dues cèl·lules filles durant la divisió cel·lular (Figura 7) (Otera and Mihara, 2011; Picca et al., 2018).

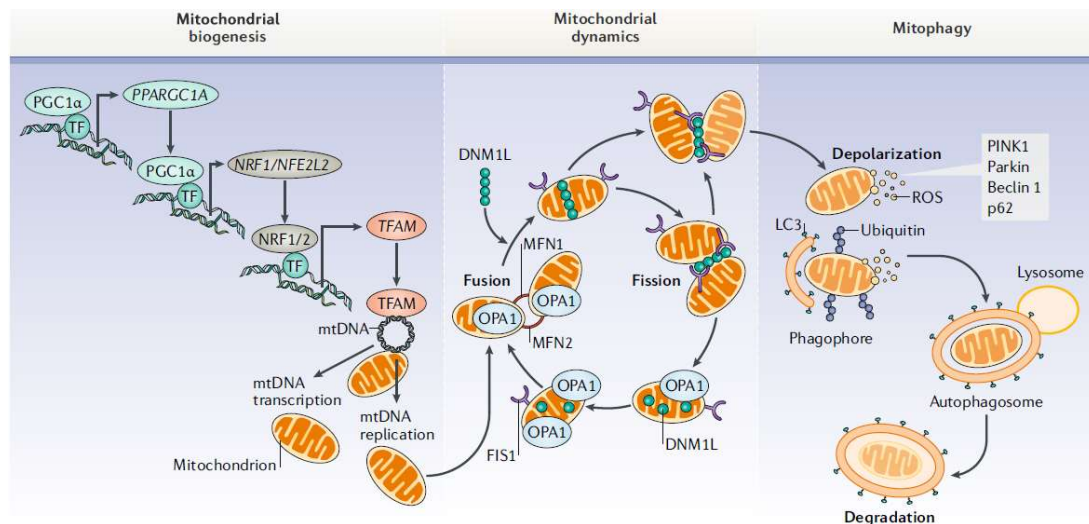


Figura 7. Vies del control de qualitat mitocondrial. L'homeòstasi mitocondrial s'assegura mitjançant la coordinació de la biogènesi, la dinàmica i l'autofàgia mitocondrial. En resposta a un estímul, PGC-1α i altres factors de transcripció (TFs) activen la transcripció de gens nuclears que codifiquen proteïnes mitocondrials com TFAM. TFAM s'importa als mitocondris fins a l'ADN mitocondrial, on regula l'expressió de gens que codifiquen subunitats de la cadena de transport d'electrons, donant lloc a un augment del consum d'oxigen, síntesi d'ATP i contingut mitocondrial. Els canvis en la morfologia mitocondrial estan sota el control de la fusió (MFN1, MFN2 i OPA1) i la fissió (DNM1L i FIS1) mitocondrial. Aquests factors regulen el recanvi mitocondrial facilitant l'eliminació de mitocondris danyats, mitjançant una via autofàgica especialitzada, la mitofàgia (Picca et al., 2018).

2.3 Genoma mitocondrial (ADNmit)

El mitocondri conté ADNmit que codifica per proteïnes essencials per la respiració mitocondrial. Cada mitocondri conté una o més còpies d'ADNmit que es localitzen a la matriu mitocondrial i està empaquetat per diverses proteïnes com les prohibitines, TFAM i la POLG (ADN polimerasa γ), formant complexos ADNmit-proteïna que s'anomenen nucleoides. TFAM és la principal proteïna dels nucleoides, i actua com un factor de transcripció d'ADNmit als mitocondris i té un paper important en la distribució i organització dels nucleoides. L'ADNmit es distribueix a través de la xarxa mitocondrial, és essencial pel manteniment de les funcions mitocondrials, i defectes en la seva distribució estan associats a moltes malalties.

L'ADNmit és susceptible a danys induïts per estrès degut a la falta d'histones i mecanismes de reparació efectius. Mutacions en l'ADNmit causen mitocondris danyats o disfuncionals que poden ser eliminats mitjançant la mitofàgia (Yan et al., 2019).

2.3.1 Estructura de l'ADNmit

El genoma mitocondrial és una molècula circular d'ADN de doble cadena amb una mida d'entre 16 i 20 Kb. Les dues cadenes de l'ADNmit tenen una composició diferent i és per això que es distingeix entre cadena pesada (H) que és rica en guanina i timina, i la cadena lleugera (L) que és pobre en aquests nucleòtids. El genoma mitocondrial és extraordinàriament compacte, de manera que els gens no presenten introns, ni regions 5' o 3' no traduïdes (UTR), i pràcticament no hi ha espais intergènics. Hi ha una regió no codificant, denominada bucle-D, que conté els promotors de les cadenes H i L i l'origen de replicació de la cadena principal (O_H). L'ADNmit codifica exclusivament per 37 gens: 2 ARN ribosòmics (ARNr) 12S i 16S, 22 ARN de transferència (ARNt) i 13 subunitats estructurals que formen part dels complexos respiratoris, entre els que s'inclouen 7 subunitats (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 i ND6) de les 45 que formen el complex I, 1 subunitat (citocrom *b*, *Cyt b*) de les 11 presents al complex III, 3 subunitats (COI, COII i COIII) de les 13 que constitueixen el complex IV, i 2 subunitats (ATP6 i ATP8) de les 16 proteïnes que formen el complex V (Figura 8) (Lagouge and Larsson, 2013).

Els mitocondris tenen la seva pròpia maquinària per traduir les 13 proteïnes codificades per l'ADNmit. Tots els ARNs necessaris per la traducció mitocondrial són subministrats pel mitocondri, mentre que els components proteics, entre els que s'inclouen proteïnes ribosomals, factors traduccional, aminoacil-ARNt-sintetases i alguns factors més requerits per la biogènesi dels ARNr i ARNt, tals com nucleases i enzims modificadors d'ARNs, són codificats pel genoma nuclear i transportats al mitocondri després de la seva síntesi al citoplasma cel·lular.

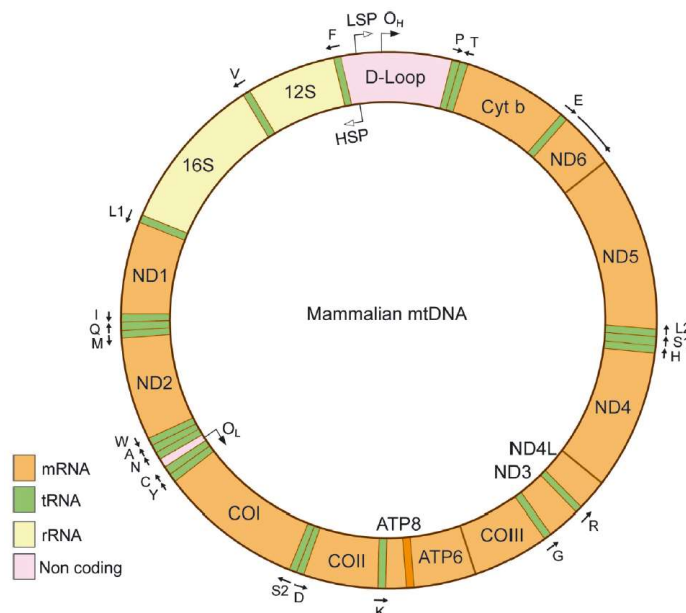


Figura 8. Organització de l'ADNmit en mamífers. L'ADNmit és una molècula circular de doble cadena. Les dues cadenes tenen composicions diferents, i es distingeix entre la cadena pesada (H) i la cadena lleugera (L). La regió no codificant bucle-D conté els promotors de les cadenes H i L (HSP i LSP), així com l'origen de la replicació de la cadena principal (O_H). En la figura es representen les 13 subunitats dels complexos respiratoris codificades per l'ADNmit (Lagouge and Larsson, 2013).

Recentment s'ha descrit la via cGAS-STING que és induïda per la presència d'ADN al citoplasma cel·lular que activa l'expressió de gens que indueixen inflamació. Aquesta via s'ha vist implicada en processos cel·lulars activats per estrès mitocondrial que impliquen la sortida d'ADNmit (s'incidirà en detall en aquesta via en l'apartat 3.6.2).

2.4 Bioenergètica mitocondrial

Els mitocondris contenen els principals sistemes enzimàtics per l'oxidació de sucres, àcids grassos i proteïnes per produir energia en forma d'ATP. Aquests substrats es poden catabolitzar en acetil-CoA, que entra al cicle dels àcids tricarboxílics o cicle de Krebs que té lloc a la matriu mitocondrial. Durant el catabolisme dels carbohidrats, el piruvat, producte de la glicòlisi citosòlica, entra als mitocondris i la piruvat deshidrogenasa el metabolitza a acetil-CoA. La β -oxidació converteix els àcids grassos en acetil-CoA, tot i que hi ha diversos enzims que a partir d'aminoàcids produeixen piruvat, acetil-CoA o intermediaris del cicle de Krebs.

2.4.1 El cicle de Krebs

En el **cicle de Krebs**, el grup acetil de dos carbonis de l'acetil-CoA (generat a partir d'àcids grassos, aminoàcids o per l'oxidació de piruvat) es transfereix a l'oxalacetat de quatre carbonis, formant el citrat, una molècula de sis carbonis. Després el citrat es converteix en el seu isòmer, l'isocitrat. El cicle continua amb dues descarboxilacions oxidatives en les quals l'isocitrat es converteix en α -cetoglutarat de cinc carbonis (α -KG) i posteriorment en succinil-CoA de quatre carbonis amb l'alliberament de dues molècules de diòxid de carboni (CO_2) i la generació de dues molècules de nicotinamida adenina dinucleòtid (NADH). A continuació, el succinil-CoA es converteix en succinat, juntament amb la generació de GTP. El succinat s'oxida generant fumarat, una molècula de quatre carbonis, i en aquesta reacció dos àtoms d'hidrogen es transfereixen al cofactor flavina adenina dinucleòtid (FAD), produint FADH_2 . L'enzim d'aquesta reacció, la succinat deshidrogenasa (SDH), també forma part de la cadena de transport d'electrons. A continuació el fumarat es converteix en malat i més endavant en oxalacetat, amb la generació d'una molècula de NADH. L'oxalacetat es combina amb una altra molècula d'acetil-CoA per continuar el cicle, mentre que l'energia alliberada és transportada per NADH i FADH_2 a la cadena de transport d'electrons (ETC) (Osellame et al., 2012; Martínez-Reyes and Chandel, 2020).

La finalització del cicle de Krebs genera ATP, 3 NADH i 1 FADH_2 , que seran utilitzats pel complex I (NADH deshidrogenasa) i el complex II (SDH) de l'ETC, respectivament. Els complexos I i II passen els seus electrons a través de l'ETC per produir en última instància ATP mitjançant una fosforilació oxidativa (OxPhos). El cicle de Krebs i la OxPhos estan estretament acoblats ja que l'oxidació de NADH i FADH_2 als complexos és necessària perquè el cicle de Krebs continuï funcionant (Martínez-Reyes and Chandel, 2020) (Figura 9).

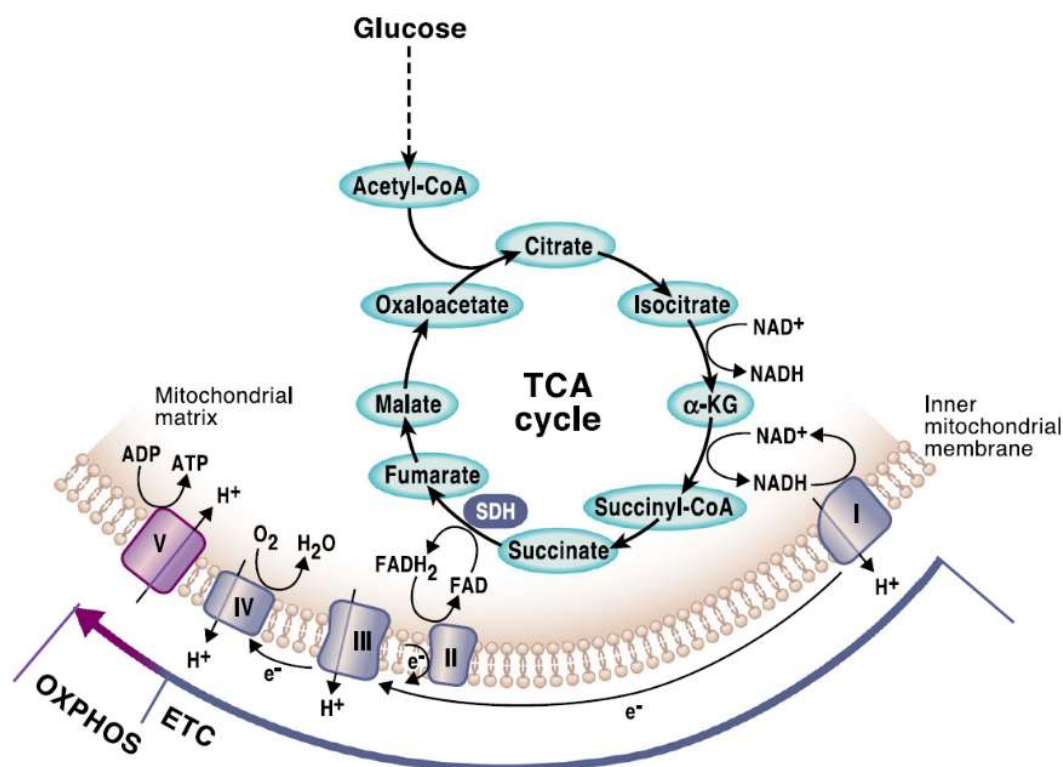


Figura 9. El cicle de Krebs i la cadena de transport d'electrons estan estretament coordinats. En una sèrie de reaccions enzimàtiques, el cicle de Krebs genera poder reductor (NADH i FADH₂), necessari per transferir electrons a la cadena de transport electrònic. A mesura que els electrons es van transferint pels complexos, es genera un potencial de membrana que s'utilitza per produir ATP. Aquest procés requereix la presència d'oxigen i es coneix com a fosforilació oxidativa (OxPhos) (Martínez-Reyes and Chandel, 2020).

La regulació del cicle de Krebs i la seva retroalimentació constant amb la fosforilació oxidativa és fonamental per l'adaptació del metabolisme al requeriment energètic de les cèl·lules. Hi ha múltiples reguladors al·lostèrics positius i negatius que controlen el flux metabòlic del cicle de Krebs. Per exemple, el NADH inhibeix tots els enzims reguladors del cicle, de manera que en situacions de mal funcionament de l'ETC, el NADH s'acumula i el cicle de Krebs s'atura. L'ATP també és un inhibidor al·lostèric de la piruvat deshidrogenasa, de manera que quan les cèl·lules disposen de NADH i ATP, el cicle s'alenteix. En canvi, elevada demanda d'ATP augmenta la relació ADP/ATP i els nivells d'AMP, donant lloc a l'estimulació dels enzims reguladors del cicle de Krebs (Martínez-Reyes and Chandel, 2020). El succinat és un metabòlit important del cicle de Krebs que té un paper regulador de múltiples respostes cel·lulars (se'n parlarà en aquesta memòria més endavant).

2.4.2 La cadena de transport electrònic (ETC)

La cadena de transport electrònic està constituïda per cinc complexos multienzimàtics proteics ancorats a la membrana mitocondrial interna i dues molècules mòbils, la ubiquinona (o coenzim Q, Q) i el citocrom C (Cit C) (Figura 11). Els complexos I, III i IV participen en l'oxidació del NADH produint 3 ATPs per cada NADH, mentre que l'oxidació del FADH₂ produeix 2 ATPs per cada FADH₂ i hi participen els complexos II, III i IV. Els electrons generats per l'oxidació del NADH i del FADH₂ passen

a través dels complexos fins reduir l'oxigen i formar aigua. Aquests electrons s'utilitzen pel bombeig de protons de la matriu a l'espai intermembrana, generant una força protó-motriu (Δp), que consisteix en una diferència de càrrega elèctrica o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) i una diferència de pH (ΔpH), que servirà per la síntesi d'ATP per l'ATP sintasa (complex V).

- » El **coenzim Q** és un lípid redox-actiu present en totes les membranes cel·lulars dels organismes eucariotes. Està format per una cua isoprenoide, que en mamífers consta de 9-10 subunitats, i un cap polar format per un anell benzènic amb dos grups hidroxils en la forma reduïda o cetònics en la forma oxidada. La cua isoprenoide estabilitza la molècula a la meitat de la bicapa de la membrana, mentre que el cap de quinona es mou des de dins cap a la superfície de la membrana en funció del seu estat redox. La biosíntesi del coenzim Q es produeix dins del mitocondri, en un complex multienzimàtic codificat per una sèrie de gens nuclears, i mutacions en aquests gens causen deficiència de coenzim Q que afecta a la fisiologia mitocondrial i l'homeòstasi cel·lular.

És un component essencial de la cadena de transport electrònic, essent l'únic lípid present en aquesta, i transfereix electrons des del NADH o el $FADH_2$ fins l'oxigen per formar aigua. Es presenta en tres estats redox diferents: oxidat (Q), parcialment reduït (semiquinona, Q^-) i reduït (QH_2); i és la base de la seva funció de portador d'electrons a la cadena respiratòria mitocondrial. No obstant, també té funcions essencials als mitocondris, com a cofactor en la síntesi d'uridina i en les proteïnes desacobladores mitocondrials. També es creu que evita la despolarització mitocondrial i el subseqüent alliberament de citocrom C i inducció de l'apoptosi mitjançant la inhibició de l'obertura del porus de transició de permeabilitat mitocondrial (mPTP), ja que aquest té un lloc d'unió a Q que l'estabilitza. A més, a la resta de membranes cel·lulars també actua com a sistema antioxidant prevenint la peroxidació de lípids i com a estabilitzador de membrana (Stefely and Pagliarini, 2017).

El coenzim Q també és reduït per la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (G3PDH), que està implicada en el metabolisme dels lípids als mitocondris. La dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH), un enzim clau en la biosíntesi de pirimidina, també redueix el coenzim Q. A més, el coenzim Q també pot rebre electrons de la flavoproteïna de transport d'electrons ubiquinona oxidoreductasa (ETFQOR), un enzim clau en la β -oxidació dels àcids grassos i l'oxidació d'aminoàcids (Wang and Hekimi, 2016; Campos-Silva et al., 2017).

- » El **complex I o NADH deshidrogenasa** consta de 45 subunitats i és el complex més gran de la cadena de transport electrònic. Té forma de L, amb un braç hidròfil que s'estén cap a la matriu, on es produeix la transferència d'electrons del NADH al coenzim Q, i un braç hidròfob ancorat a la membrana interna on es produeix la translocació de protons. El lloc d'unió del Q es troba a la interfície d'ambdós braços. L'activitat catalítica és proporcionada per 14 subunitats que representen el nucli del complex; 7 subunitats es troben al braç hidròfil i contenen els centres

actius redox, un grup flavina mononucleòtid (FMN) i set centres Fe-S. Les altres 7 subunitats es troben al braç hidròfob i són codificades per l'ADNmit formant els canals de protons. La resta de subunitats estableixen i protegeixen el complex. El NADH s'oxida a NAD^+ i transfereix dos electrons al FMN, que passa a la forma reduïda FMNH_2 utilitzant un protó de la matriu. Els electrons passen del FMNH_2 d'un en un a través dels centres Fe-S fins a la ubiquinona. La reducció de la ubiquinona a ubiquinol (QH_2) és responsable d'un canvi conformacional que causa la transmissió d'energia al braç hidròfob donant lloc al bombeig de 4 protons a l'espai intermembrana i generant un gradient electroquímic (Osellame et al., 2012; Signes and Fernandez-Vizarra, 2018).

- » El **complex II o succinat deshidrogenasa** catalitza l'oxidació del succinat a fumarat, de manera que està implicat en el cicle de Krebs i en la cadena de transport electrònic. Consta de 4 subunitats codificades per l'ADN nuclear; dos són hidròfiles, la SDHA i la SDHB, i dos són hidròfobes, la SDHC i la SDHD. La SDHA conté un grup FAD unit covalentment i és on s'oxida el succinat a fumarat, i la SDHB té tres centres Fe-S. Les subunitats SDHC i SDHD estan ancorades a la membrana i contenen dos llocs d'unió del Q. L'oxidació del succinat allibera dos protons que redueixen el FAD a FADH_2 i dos electrons que són transferits del FAD cap als centres Fe-S fins arribar a la ubiquinona, on és reduïda a ubiquinol. Només s'utilitza un dels llocs d'unió de la Q, i no bombeja protons de manera que no contribueix a la formació del gradient de protons (Larosa and Remacle, 2018; Signes and Fernandez-Vizarra, 2018).

Varis estudis han demostrat un rol de la SDH en la inducció de l'apoptosi, ja que després de l'obertura del porus mitocondrial, el complex II s'inhibeix contribuint a la mort cel·lular mitjançant la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS). La inducció de l'apoptosi està vinculada a la desintegració específica del complex II mitjançant l'alliberament de les subunitats SDHA i SDHB de les subunitats SDHC i SDHD. Aquestes subunitats encara són enzimàticament actives, de manera que poden eliminar els electrons del succinat, però a causa de la separació dels acceptors, el flux d'electrons es bloqueja i són transferits a l'oxigen molecular formant excessives ROS i induint apoptosi. La desintegració específica es produeix per l'entrada de calci massiva i l'acidificació intracel·lular (disminució del pH) que afecten a les interaccions dins del complex II provocant la dissociació de les subunitats (Figura 10) (Hwang et al., 2014).

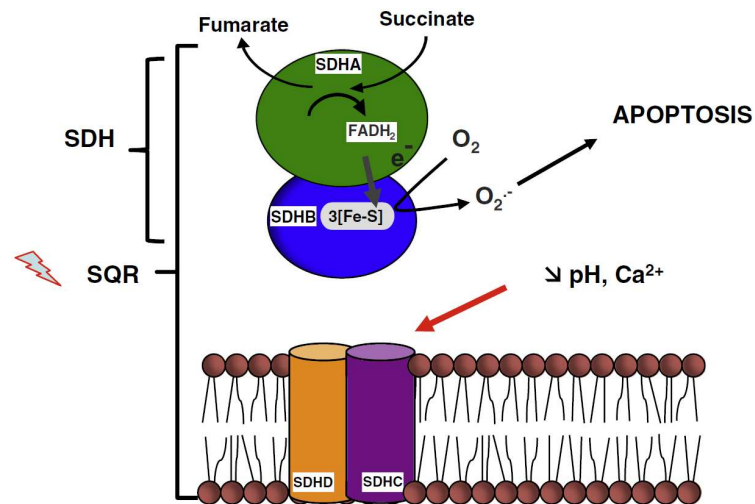


Figura 10. Dissociació del complex II per a la inducció de l'apoptosi. La desintegració específica del complex II amb l'alliberament de les subunitats SDHA i SDHB a la matriu es produeix en resposta a la disminució del pH i l'acidificació. Aquesta dissociació separa les dues activitats enzimàtiques; la succinat deshidrogenasa (SDH) i el coenzim Q oxidoreductasa (SQR) per a la producció de $O_2^{\cdot-}$ i inducció de l'apoptosi (Hwang et al., 2014).

La capacitat respiratòria de reserva (RRC) és la diferència entre la màxima capacitat respiratòria i la capacitat respiratòria basal. En condicions normals, la cèl·lula no utilitza la RRC, mentre que en condicions en que la demanda d'energia és màxima, la RRC és capaç de respondre a aquesta demanda i evitar una crisi d'ATP. Així doncs, la RRC s'ha associat amb la supervivència cel·lular, i està influenciada per la disponibilitat de substrats. Pflieger et al suggereix que la RRC és el producte d'un augment regulat en les activitats del cicle de Krebs i l'ETC i que està regulat per la SDH, ja que quan s'inhibeix es bloqueja completament la RRC i s'acaba induint apoptosi per la dissociació del complex II. Així doncs, la RRC és important per augmentar la producció d'energia durant un increment de la demanda energètica i millorar la supervivència cel·lular (Pflieger et al., 2015).

Existeix un transport revers d'electrons (RET) en la cadena respiratòria que fa referència al flux d'electrons ascendent des del succinat a través del complex II fins al coenzim Q i després al complex I i al seu grup FMN, que finalment redueix el NAD^+ . Altres enzims que cedeixen electrons al coenzim Q, com la G3PDH, la ETFQOR o la DHODH també poden contribuir al RET. A més d'una elevada proporció d'ubiquinol, es necessita una força protó-motriu elevada (elevat potencial de membrana (ψ_m)) per produir RET. A més, s'ha suggerit que quan es produeix RET, el complex V deixa de produir ATP, ja que altera el seu funcionament, transferint protons de la matriu a l'espai intermembrana, mantenint la força protó-motriu i evitant la mort cel·lular, però consumint ATP (Wang and Hekimi, 2016; Scialò et al., 2017). L'oxidació del succinat promou l'acumulació de coenzim Q reduït augmentant el potencial de membrana, augmentant la producció de ROS mitocondrial mitjançant el RET (Martínez-Reyes and Chandel, 2020). Així doncs, el RET és un procés implicat en la senyalització redox mitocondrial en situacions fisiològiques i patològiques (Robb et al., 2018).

- **El succinat**

El succinat és un metabòlit del cicle de Krebs i un enllaç directe entre aquest i la cadena respiratòria mitocondrial. El succinat es genera a la matriu mitocondrial, de manera que la seva exportació al citosol actuarà com a senyal de l'estat dels mitocondris. Recentment s'ha demostrat que el succinat és un metabòlit que actua com a regulador de múltiples processos cel·lulars, com la inflamació i la producció d'espècies reactives de l'oxigen. Quan la cadena de transport electrònic està oxidant nivells elevats de succinat, s'acumula CoQ reduït i augmenta el potencial de membrana, promovent la generació de ROS mitjançant RET. L'activació dels macròfags provoca un augment dels nivells de succinat intracel·lular promovent la producció de ROS que actua com a senyal endògena per establir HIF-1 α , que al seu torn regula l'expressió gènica de factors proinflamatoris com la IL-1 β (Mills et al., 2016). A més, s'ha demostrat que els efectes inflamatoris del succinat són contrarestats pel metabòlit itaconat, que regula la defensa antioxidant cel·lular mitjançant la inducció de Nrf2 (Tannahill et al., 2013; Mills et al., 2016). També s'ha demostrat que en isquèmia, els nivells de succinat augmenten i durant la reperfusió promouen la producció de ROS iniciant el dany per lesió en la isquèmia-reperfusió (I/R) (Chouchani et al., 2014; Murphy and O'Neill, 2018).

- » El **complex III o citocrom C reductasa** és el complex més petit i catalitza la reducció del citocrom C. Funciona en forma de dímer, i cada monòmer consta de tres subunitats catalítiques; el citocrom *b*, el citocrom *c*₁, la proteïna Rieske Fe-S, i vuit subunitats supernumeràries. El citocrom *b* conté el centre d'oxidació de l'ubiquinol (Q₀) i el centre de reducció de la ubiquinona (Q_i), separats per dos grups hemo (L i H). El citocrom *c*₁ també conté un grup hemo. Les subunitats supernumeràries estan implicades en l'estabilitat i l'acoblament de l'enzim. El procés de reducció del citocrom C es dona mitjançant el cicle Q.

El cicle Q comença amb l'oxidació de l'ubiquinol (QH₂) al lloc Q₀ i l'alliberament de dos protons a l'espai intermembrana. Un electró es transfereix al centre Fe-S de la proteïna Rieske, cap al citocrom *c*₁ (al grup hemo) i després al citocrom C (fora del complex III). L'altre electró es transfereix successivament dels grups hemo del citocrom *b* (*b*_L i *b*_H) fins a una ubiquinona unida al lloc Q₁, que es reduïda a radical semiquinona (Q[•]). A la segona volta del cicle, s'oxida un segon QH₂, i l'electró que entra al centre Fe-S de Rieske, redueix un segon citocrom *c*₁ i seguidament al citocrom C, que s'acompanya d'altres dos protons alliberats a l'espai intermembrana. L'altre electró redueix la semiquinona del lloc Q₁ a ubiquinol. Això va acompanyat de la captació de dos protons de l'espai intermembrana. El resultat net d'un cicle complet és l'oxidació de dues molècules de QH₂, reducció de dues molècules de citocrom C i translocació de 4 protons a l'espai intermembrana generant un gradient electroquímico (Wang and Hekimi, 2016; Signes and Fernandez-Vizarra, 2018).

- » El **complex IV o citocrom C oxidasa** catalitza l'oxidació del citocrom C i la reducció de l'oxigen a aigua. Consisteix en múltiples grups hemo (Cu-Fe) i 13 subunitats. Les subunitats centrals, Cox1, Cox2 i Cox3 són codificades pel mitocondri, mentre que la resta de subunitats estan codificades pel nucli i importades al mitocondri. Conté dos grups hemo, a i a_3 , i dos ions de coure, Cu_A i Cu_B . Les altres subunitats són importants per l'estabilització i regulació de l'enzim. Els electrons del citocrom C són cedits a l'àtom Cu_A , d'aquí són transferits als grup hemo fins a l'àtom Cu_B . Finalment són cedits a l'oxigen (últim acceptor dels electrons) per formar aigua. Quatre molècules de citocrom C produeixen dues molècules d'aigua a partir d'una molècula d'oxigen, i es bombegen 4 protons a l'espai intermembrana generant gradient electroquímic (Mick et al., 2011).
- » El **complex V o ATP sintasa** és l'enzim responsable de la fosforilació oxidativa. Està format per 15-18 subunitats i consta d'un domini F_0 hidrofòbic que està ancorat a la membrana interna amb un canal perquè passin els protons cap al domini F_1 hidrofílic catalític que es troba a la matriu mitocondrial. El domini F_1 consisteix en un anell de subunitats α i β giratòries que envolten una subunitat γ . Aquest complex actua com a motor rotatiu, de manera que converteix el gradient electroquímic en energia mecànica, fent que els protons de l'espai intermembrana passin a través del domini F_0 , aquest gira i s'indueixen canvis conformacionals que fan que s'uneixi un fosfat inorgànic (P) amb un ADP generant ATP. A cada volta, es produeixen tres ATPs (Osellame et al., 2012; Chaban et al., 2014).

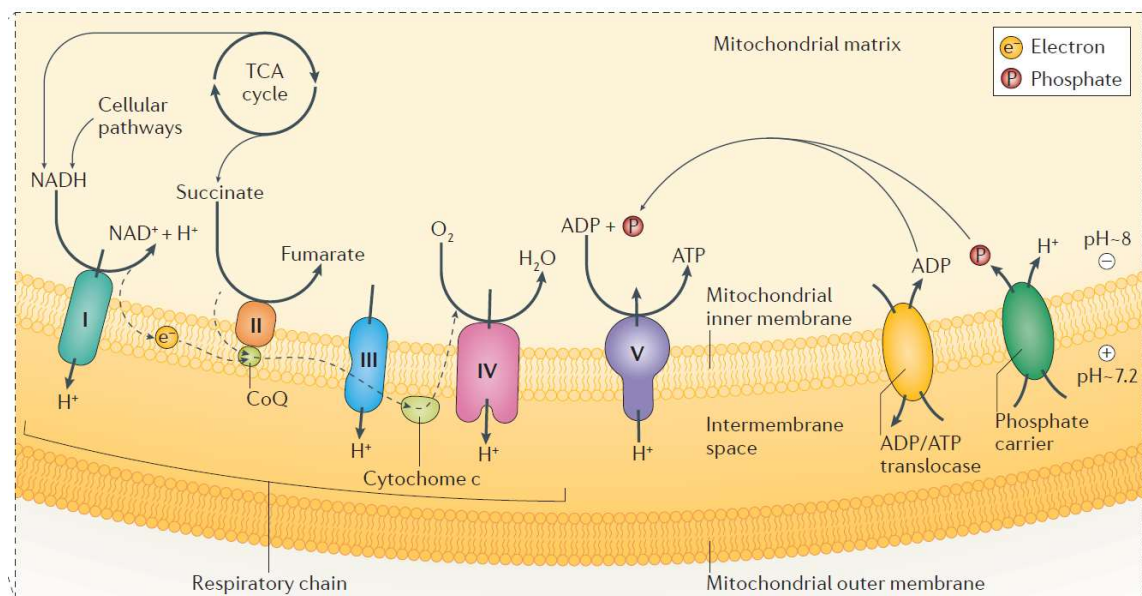


Figura 11. Representació esquemàtica de la cadena de transport electrònic. La cadena de transport electrònic consta dels complexos I-IV i del complex V, una ATP sintasa. El complex I oxida el NADH amb la reducció del CoQ. El complex II relaciona el cicle de Krebs (o cicle dels àcids tricarboxílics (TCA)) a la cadena respiratòria i oxida el succinat amb la reducció del CoQ. El complex III catalitza la reducció del citocrom C oxidant el CoQ. El complex IV és responsable de l'última reacció enzimàtica de transferència d'electrons a l'oxigen molecular. Excepte el complex II, tots aquests complexos generen un gradient electroquímic, que és convertit a energia mecànica pel complex V, amb la formació d'ATP a partir d'ADP i fosfats inorgànics (Gorman et al., 2016).

2.4.2.1 Organització dels complexos de l'ETC

El model de plasticitat de l'organització dels complexos de l'ETC proposa que existeix un equilibri dinàmic entre formes de difusió lliure i associades dels components de la cadena, permetent un transport d'electrons molt eficient. La formació reversible d'agregats específics dels complexos (supercomplexos), ofereix un mecanisme per al flux de protons localitzat i la possibilitat de regular la direcció i l'eficiència de la transferència d'electrons segons canvis en el metabolisme cel·lular (Acin-Perez and Enriquez, 2014; Lobo-Jarne and Ugalde, 2018).

El complex I interacciona principalment amb el complex III i el complex IV per formar un respirasoma (I+III+IV), que és un supercomplex que conté tots els components necessaris per transferir electrons del NADH a l'oxigen molecular (juntament amb el coenzim Q i el citocrom C). En els mamífers, la majoria del complex I, entre el 40-50% del complex III i el 20-30% del complex IV, estan formant el respirasoma. No obstant, el complex III i el complex IV poden formar el supercomplex III+IV, però només representa un 5-10% del total de les estructures de l'ETC. La cardiolipina és un fosfolípid present en les interaccions estabilitzant els supercomplexos. Pel que fa al complex V, forma estructures dimèriques que no interaccionen amb els supercomplexos (Lobo-Jarne and Ugalde, 2018). A més, fins fa poc es creia que el complex II no formava supercomplexos, no obstant, recentment, mitjançant microscòpia crio-electrònica, s'ha suggerit que el complex II forma un megacomplex que consta dels 4 complexos (I-II-III-IV), facilitant la transferència dels electrons dels complexos I i II cap al IV amb un possible rol regulador de la formació del respirasoma (Guo et al., 2017; Jang and Javadov, 2018).

2.4.2.2 Producció de ROS per l'ETC

La principal producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) té lloc a la cadena respiratòria degut a fuites d'electrons que s'uneixen directament a l'O₂ donant lloc a superòxid (O₂⁻), una molècula altament reactiva i tòxica, produint estrès oxidatiu (Osellame et al., 2012). No obstant, les espècies reactives són neutralitzades per enzims antioxidants com un mecanisme de protecció cel·lular, produint-se un balanç entre la formació i la destrucció dels ROS. També es poden produir fuites de protons a través de les membranes mitocondrials, dissipant la seva energia en calor i produint un desacoblament del gradient de protons de la producció d'ATP.

Hi ha almenys deu punts diferents de producció de ROS a la cadena respiratòria, però el complex I i el complex III són els més importants. El complex I pot produir ROS en dos punts, al lloc FMN i al lloc d'unió al CoQ durant la transferència d'electrons del NADH al CoQ. La producció de ROS del complex II es dona al lloc d'unió del FAD, i està estretament relacionada amb la quantitat de FADH₂. En el complex III, durant el cicle Q es genera un radical semiquinona (Q⁻) al lloc Q₀, el qual pot transferir l'electró directament a l'oxigen. A més, la producció de O₂⁻ al lloc Q₀ també es pot donar per RET.

Diverses deshidrogenases que no pertanyen a la cadena respiratòria, com la G3PDH, la DHODH i la ETFQOR que redueixen el CoQ també poden produir ROS al cedir els electrons (Figura 12) (Wang and Hekimi, 2016; Zhao et al., 2019).

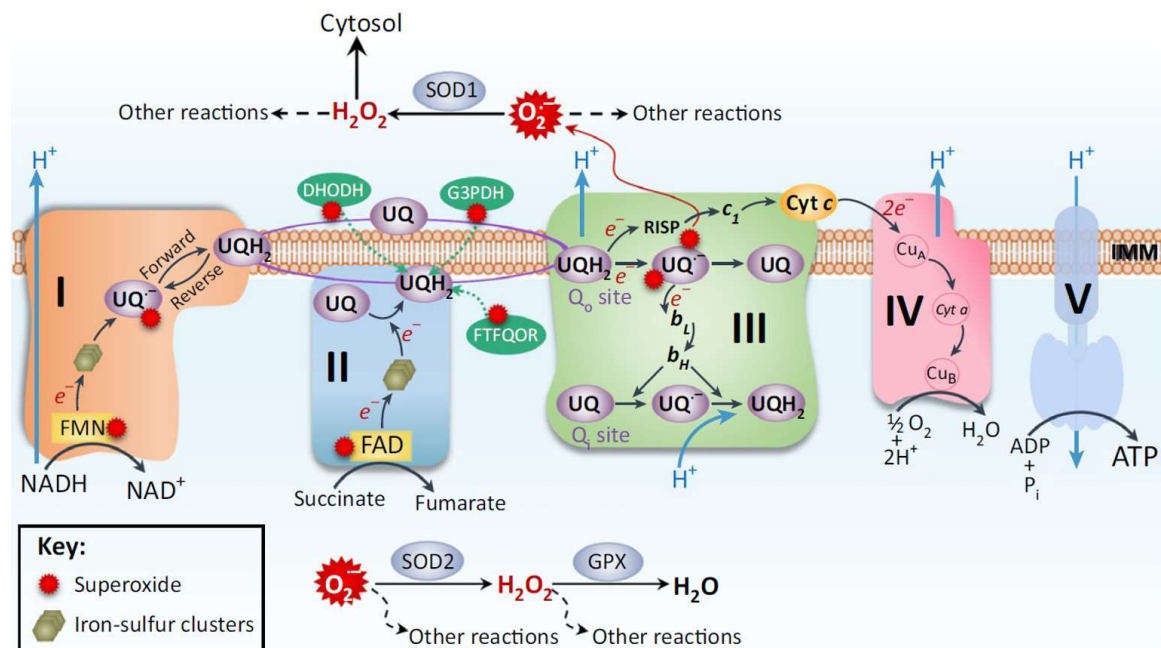


Figura 12. Esquema de la cadena de transport electrònic i llocs de producció d'anió superòxid. El coenzim Q accepta els electrons dels complexos I i II i els cedeix de manera individual al complex III. En aquest complex hi ha dos llocs d'unió del CoQ i té lloc el cicle Q, des d'on es transfereixen els electrons al citocrom C cap al complex IV, formant aigua i finalment cap al complex V per la producció d'ATP. També existeix un transport d'electrons revers del QH₂ al complex I. Es poden produir fuites d'electrons que s'uneixen directament a l'O₂ formant superòxid (O₂⁻) (els asteriscs vermells indiquen fonts potencials de producció d'O₂⁻). La superòxid dismutasa (SOD) converteix l'O₂⁻ en peròxid d'hidrogen (H₂O₂) que és reduït a aigua per la glutatió peroxidasa (GPX) (Wang and Hekimi, 2016).

2.5 Espècies reactives de l'oxigen en la regulació de les funcions cel·lulars

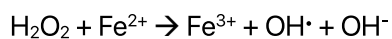
Les espècies reactives de l'oxigen són molècules que regulen diversos processos fisiològics com la proliferació, migració, hipertròfia, diferenciació, dinàmica del citoesquelet i metabolisme, però quan es produeixen en excés, reaccionen amb lípids, proteïnes i àcids nucleics, alterant les propietats estructurals i funcionals de les molècules (Di Meo et al., 2016).

L'estat redox cel·lular és el resultat del balanç de les condicions oxidants i reductores dins d'una cèl·lula, ja que aquesta conté de forma natural components amb propietats redox. En les reaccions d'oxidació-reducció canvia el grau d'oxidació de les espècies que reaccionen perquè es produeix un intercanvi d'electrons entre els reactius. Per això, és necessari la presència d'un oxidant, espècie que capta electrons i redueix el seu estat d'oxidació, i d'un reductor o espècie que allibera electrons i augmenta el seu estat d'oxidació (Gutteridge and Halliwell, 2000, 2010). Així doncs, una situació d'oxidació o reducció depèn dels nivells dels factors prooxidants i de la capacitat antioxidant (reductora) de la cèl·lula.

Els desajustos del nivell redox basal actuen com a senyals que inicien i regulen diversos processos cel·lulars, ja que condicionen l'expressió gènica mitjançant diferents rutes de transducció de senyals i per la modulació dels factors de transcripció, així com per la modificació directa d'algunes molècules implicades en la regulació de diversos processos cel·lulars com proteïnes quinases o fosfatases (Wulf, 2002). Una situació de desequilibri de l'estat redox cel·lular per un excés d'oxidants o radicals lliures es coneix com estrès oxidatiu (Lushchak, 2014).

Un radical lliure és tota espècie química, àtom o molècula, que en la seva estructura presenta un o varis electrons desaparellats o imparells al seu orbital més extern, donant una configuració electrònica de gran inestabilitat. Els electrons tendeixen a la configuració energètica més estable possible aparellant-se al seu últim orbital. Per això, el radical lliure té tendència a recuperar la situació d'estabilitat, cedint l'electró desaparellat, agent reductor, o bé captant un electró, agent oxidant (Delles et al., 2008).

Si l'oxigen molecular capta un electró procedent de la cadena respiratòria es redueix originant el radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$). L'anió superòxid genera espècies molt reactives; per una banda reacciona ràpidament amb l'òxid nítric (NO^{\cdot}) per formar peroxinitrit ($ONOO^-$), que produeix nombroses espècies nocives en condicions fisiològiques. D'altra banda, pot dismutar-se i generar peròxid d'hidrogen (H_2O_2), el qual en presència d'ions metàl·lics, principalment ferro, genera el radical hidroxil (OH^{\cdot}) mitjançant la denominada reacció de Fenton:



El superòxid ($O_2^{\cdot-}$) presenta càrrega negativa a pH fisiològic, que fa que la seva difusió a través de les membranes sigui lenta. És detoxificat a peròxid d'hidrogen per l'enzim superòxid dismutasa de manganès (MnSOD) a la matriu mitocondrial, o alliberat al citosol i detoxificat per l'enzim superòxid dismutasa de coure-zinc (CuZnSOD). El peròxid d'hidrogen és una molècula sense càrrega i presenta cert caràcter apolar, de manera que és una molècula amb una vida mitja moderadament llarga i és capaç de difondre's a través de les membranes biològiques i induir la formació del radical hidroxil en punts allunyats del seu lloc d'origen. El peròxid d'hidrogen és convertit en aigua per l'enzim glutatió peroxidasa (GPX), utilitzant com a agent reductor el glutatió (GSH), un tripèptid de Glutamat-Cisteïna-Glicina que serà oxidat (GSSG) i reciclat per la glutatió reductasa; la catalasa (CAT) i/o la peroxiredoxina (PRX). El radical hidroxil (OH^{\cdot}) és altament oxidant i contra ell no existeix cap detoxificador enzimàtic. Per això, és important eliminar ràpidament les espècies reactives de l'oxigen abans no es produeixi aquest radical; d'aquí la importància dels corresponents mecanismes de defensa antioxidant (Figura 13) (Antunes and Cadenas, 2000; Wang et al., 2018).

Així doncs, quan la producció de radicals lliures és excessiva i els mecanismes de protecció (sistemes antioxidants de defensa enfront la toxicitat dels radicals lliures) són insuficients, es produeix dany oxidatiu mitocondrial induint peroxidació de lípids, carbonilació de proteïnes i modificacions del

genoma mitocondrial. Tot i això, les ROS també són importants molècules de senyalització que es produeixen en resposta a diverses situacions d'estrès cel·lular (Lushchak, 2014; Wang et al., 2018).

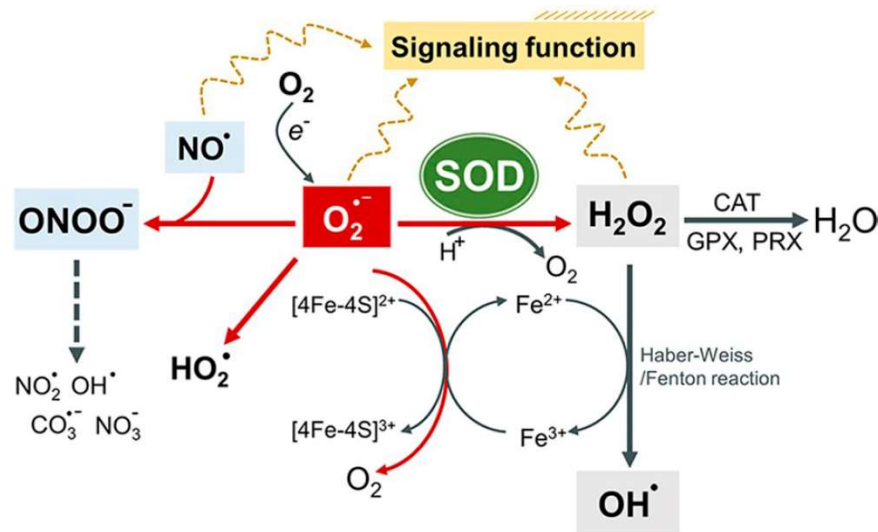


Figura 13. Reaccions i transformacions del superòxid. Els enzims SOD catalitzen la dismutació del superòxid ($O_2^{\cdot -}$), generant peròxid d'hidrogen (H_2O_2). La catalasa (CAT), la glutatió peroxidasa (GPX) i la peroxiredoxina (PRX) converteixen el H_2O_2 en aigua. El peròxid d'hidrogen pot reaccionar amb metalls, com el ferro, per generar el radical hidroxil (OH^{\cdot}) mitjançant la reacció de Fenton. L' $O_2^{\cdot -}$ reacciona amb l'òxid nítric (NO^{\cdot}) produint $ONOO^-$, la descomposició del qual dona lloc a intermediaris altament oxidants inclosos NO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} i $CO_3^{\cdot -}$ i NO_3^- (Wang et al., 2018).

2.5.1 Enzims antioxidants

Els antioxidants interaccionen amb un radical lliure cedint-li un electró, al mateix moment que s'oxiden i es transformen en un radical lliure dèbil no tòxic, sacrificant així la seva pròpia estabilitat electrònica. Aquests interactuen més ràpid amb els radicals lliures que amb la resta de molècules presents, de manera que impedeixen que altres molècules s'uneixin a l'oxigen molecular. Les molècules antioxidants que constitueixen la defensa antioxidant actuen a diferents nivells. Aquests nivells poden ser de prevenció de radicals, de neutralització de radicals i de reparació de danys induïts per radicals. Així doncs, els antioxidants es poden classificar com: antioxidants de defensa de primera línia, de segona línia i de tercera línia (Ighodaro and Akinloye, 2018).

- Els antioxidants de primera línia de defensa actuen per suprimir o prevenir la formació de radicals lliures o espècies reactives. Són ràpids en neutralitzar qualsevol molècula amb el potencial de convertir-se en un radical lliure o qualsevol radical lliure amb capacitat d'induir la producció d'altres radicals. En aquesta classificació destaquen tres enzims: la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i la glutatió peroxidasa (GPx). Aquests enzims dismuten respectivament els radicals superòxid, descomponen els peròxids d'hidrogen i els hidroperòxids.

En concret, la superòxid dismutasa té diversos efectes biològics parcialment a través de l' H_2O_2 , ja que és una molècula de senyalització. Aquests ROS poden estimular respostes cel·lulars com la hipertròfia, la proliferació, la supervivència i la diferenciació mitjançant l'oxidació de molècules senyalitzadores com Akt i MAPK o mitjançant la inactivació de fosfatases, contribuint a la senyalització redox. Tant el superòxid com el peròxid d'hidrogen també poden activar factors de transcripció sensibles a redox, com NF- κ B i HIF-1 α , o MMPs, contribuint a la inflamació, angiogènesi i remodelació de la matriu extracel·lular. A més, els ROS també modulen els canals iònics modulant les concentracions intracel·lulars de Ca^{2+} i K^+ (Figura 14) (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

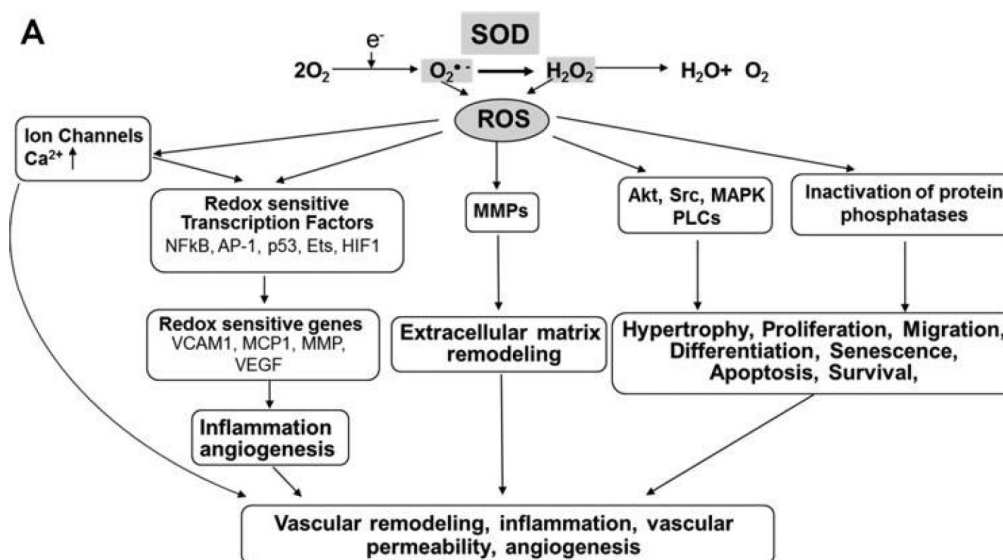


Figura 14. Rol de la SOD en les vies de senyalització redox. El superòxid i el peròxid d'hidrogen activen molècules senyalitzadores com Akt i MAPK, factors de transcripció sensibles a redox com NF- κ B i HIF-1 α , MMPs, inactiven fosfatases i modulen canals iònics. D'aquesta manera estimulen respostes cel·lulars com la hipertròfia, la diferenciació, la proliferació, la inflamació i la supervivència (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

- Els antioxidants de segona línia de defensa es coneixen com enzims neutralitzadors, i neutralitzen radicals actius cedint electrons, i en el procés es converteixen en radicals lliures però amb efectes menys perjudicials. Aquests "nous radicals" es neutralitzen fàcilment per altres antioxidants d'aquest grup. Destaquen antioxidants hidròfils com l'àcid ascòrbic o el glutatió, o lipòfils com la vitamina E o l'ubiquinol.
- Els antioxidants de tercera línia de defensa es sintetitzen de nou per reparar els danys causats pels radicals lliures. Són un grup d'enzims per la reparació d'ADN, proteïnes i lípids, evitant la seva acumulació que podria ser tòxica per la cèl·lula. Inclouen sistemes d'enzims reparadors d'ADN com polimerases, glicosilases, nucleases i enzims proteolítics (proteïnases, proteases i peptidases), que es troben tant al citosol com als mitocondris.

En la fisiopatologia del cor, les espècies reactives de l'oxigen indueixen la sortida del cicle cel·lular dels cardiomiòcits mitjançant l'activació de la resposta de dany a l'ADN (Puente et al., 2014). També

tenen un paper clau en la inducció de la hipertròfia cardíaca a través de l'activació de vies de transducció de senyals hipertròfics (Rizzi et al., 2014; Blasco et al., 2018). A més, com ja s'ha comentat en l'apartat 1.2, en la isquèmia i reperfusió es produeixen nivells elevats de ROS que promouen el dany cel·lular després d'un infart de miocardi. Tanmateix, el desenvolupament de malalties cardiovasculars està lligat a la producció de ROS i a la desregulació de vies antioxidants (Davidson et al., 2020).

3. Vies de senyalització de resposta cel·lular a l'estrès

3.1 Resposta de proteïnes mal plegades (UPR)

El reticle endoplasmàtic (ER) és una xarxa de túbuls ramificats i sacs aplanats i és l'òrganul responsable de la síntesi, maduració, estabilització i plegament de proteïnes ancorades a la membrana plasmàtica o destinades a la secreció. Tanmateix, és responsable del control de qualitat del plegament de les proteïnes i és essencial per altres funcions cel·lulars, com l'emmagatzematge del calci (Ca^{2+}) i la síntesi de fosfolípids i colesterol (Galluzzi et al., 2018; Hetz and Papa, 2018).

La majoria de les proteïnes es tradueixen en ribosomes units a la membrana del reticle mentre s'introdueixen al lumen. Les proteïnes dirigides a l'ER tenen un seqüència de pèptid senyal que dirigeix aquestes proteïnes cap a la membrana del reticle mentre encara està unida al ribosoma, i seguidament el pèptid senyal és eliminat per una proteasa abans de completar la traducció. Un cop al lumen, les proteïnes es pleguen en la seva forma tridimensional, procés que és catalitzat per una maquinària de modificació i plegament resident a l'ER que inclou una xarxa de xaperones, enzims glicosilants i oxido-reductases. Pertorbacions en l'homeòstasi cel·lular i en l'eficiència de plegament de proteïnes poden conduir a una acumulació elevada de proteïnes mal plegades al reticle, produint una situació d'estrès de reticle. Les condicions que provoquen aquest estrès inclouen una major síntesi de proteïnes, alteracions en el sistema de degradació de proteïnes pel proteasoma, anomalies en l'autofàgia (un sistema de reciclatge de molècules i òrgànuls que es tractarà en detall més endavant), disminució de la concentració de Ca^{2+} , privació de nutrients, augment dels nivells de ROS, inflamació i hipòxia.

No obstant, les cèl·lules tenen sistemes per detectar i respondre a l'estrès de reticle abans que esdevingui una amenaça per la supervivència, controlant constantment la quantitat de proteïnes mal plegades al lumen del reticle. Aquests sistemes de senyalització integrada inclouen, la resposta de proteïnes mal plegades (UPR; *Unfolded Protein Response*), la degradació associada a l'ER (ERAD; *ER-Associated Protein Degradation*) i l'autofàgia. L'ERAD és la primera línia de defensa, en la qual les proteïnes mal plegades són retornades al citosol per la seva posterior ubiquïtinització i degradació pel proteasoma (Hetz and Papa, 2018). Tanmateix, quan hi ha un increment de les proteïnes mal plegades, s'inicia la UPR.

La UPR és una resposta adaptativa destinada a resoldre l'acumulació de polipèptids mal plegats al lumen del reticle endoplasmàtic, o bé a eliminar les cèl·lules que no poden recuperar la proteòstasi del reticle, induint la mort cel·lular. La UPR està orquestrada per tres sensors principals ancorats a la membrana del reticle endoplasmàtic; l'enzim que requereix d'inositol 1 α (IRE1 α , *inositol-requiring enzyme 1a*), la quinasa semblant a PERK (*PKR-like ER kinase*), i el factor activador 6 de la transcripció (ATF6, *Activating transcription factor 6*). En condicions basals, la xaperona BiP (*Binding immunoglobulin Protein*), també coneguda com GRP78 (*78kDa Glucose-regulated protein*) que es troba al lumen de l'ER, s'associa al domini luminal d'aquests sensors mantenint-los en un estat monomèric inactiu. En condicions d'estrès de reticle, BiP s'uneix amb major afinitat a proteïnes mal plegades, perdent la unió amb els sensors i permetent la seva activació (Galluzzi et al., 2018; Martelli et al., 2020).

- » **IRE1 α** és una proteïna transmembrana que conté un domini endoribonucleasa (ARNasa) i un domini quinasa. La inducció d'estrès d'ER fa que oligomeritzi i s'autofosforili, induint així un canvi conformacional que activa el domini ARNasa, provocant un *splicing* de l'ARNm de la proteïna d'unió a X-box 1 (XBP1u, *X-box binding protein 1 unspliced*). L'*splicing* d'un intró genera un factor de transcripció estable i actiu, XBP1s (*XBP1 spliced*), que regula l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes implicades en el plegament de proteïnes, la secreció i translocació a l'ER, l'ERAD i la síntesi de lípids, per tal de restaurar l'homeòstasi cel·lular. El domini ARNasa també regula l'estabilitat de múltiples ARNs mitjançant l'escissió de seqüències específiques per la via de degradació d'ARN, coneguda com RIDD (*Regulated IRE1 α -Dependent Decay*), que és important en el control de la inflamació i l'apoptosi.
- » **ATF6** és una proteïna transmembranal que conté un factor de transcripció al seu domini citosòlic. Sota estrès de reticle, ATF6 migra al Golgi on és tallat per dos peptidases, S1P i S2P, alliberant el seu domini citosòlic. Aquest es transloca al nucli on activa respostes que promouen l'adaptació a l'estrès d'ER, incloent el plegament de proteïnes i el control de qualitat, així com la regulació de diversos components de l'ERAD.
- » **PERK** és una quinasa transmembranal que, activada per oligomerització i autofosforilació, fosforila el factor d'iniciació de la traducció eucariota 2 α (eIF2 α ; *Eukaryotic Initiation Factor 2 α*) a la Ser⁵¹ (p-eIF2 α). Aquesta fosforilació atenua la traducció global de proteïnes, disminuint la sobrecàrrega de proteïnes que entren al reticle i reduint la demanda de plegament. A més, p-eIF2 α permet la traducció selectiva de l'ARNm que codifica pel factor 4 activador de la transcripció (ATF4, *Activating Transcription Factor 4*). L'ATF4 es trasllada al nucli, on activa els gens de resposta a l'estrès d'ER implicats en el plegament de proteïnes, la resposta antioxidant i l'autofàgia. PERK també fosforila el factor nuclear 2 (NRF2, *Nuclear Factor (erythroid-derived*

2)-like 2), un factor de transcripció involucrat en el control de gens antioxidants i proteïnes de resposta a l'estrès.

Si les respostes adaptatives no aconsegueixen restaurar l'homeòstasi del plegament de les proteïnes, la senyalització UPR persisteix promovent finalment l'apoptosi. Mentre que una pausa temporal en la traducció de proteïnes deguda a la fosforilació d'eIF2 α pot ser beneficiosa reduint la càrrega secretora, un bloqueig sostingut en la traducció és incompatible amb la supervivència. A més, l'expressió mantinguda d'ATF4 contribueix a la mort apoptòtica, ja que augmenta els nivells del factor de transcripció de la proteïna homòloga a C/EBP (CHOP; *C/EBP homologous protein*, també coneguda com GADD153), la qual augmenta l'expressió de proteïnes apoptòtiques com JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), i inhibeix l'expressió del gen que codifica per la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2. A més, CHOP també promou la transcripció de la proteïna 34 d'arrest del creixement i induïble per danys a l'ADN GADD34 (*Growth Arrest and DNA damage-inducible protein 34*) que desfosforila eIF2 α i reverteix la inhibició de la traducció, contribuint a l'acumulació de proteïnes mal plegades a l'ER alhora que permet la traducció d'ARNm que codifiquen per proteïnes pro-apoptòtiques. De la mateixa manera, una activació mantinguda d'IRE1 α indueix una massiva escissió d'ARNm per RIDD promovent l'activació de diverses proteïnes pro-inflamatòries i pro-apoptòtiques, com JNK. Així doncs, la fase aguda de l'UPR funciona com a resposta adaptativa a l'estrès, ja que inicialment intenta restaurar l'homeòstasi cel·lular, però genera mort cel·lular si les funcions cel·lulars no es restableixen (Figura 15) (Wang and Kaufman, 2014; Galluzzi et al., 2018; Hetz and Papa, 2018).

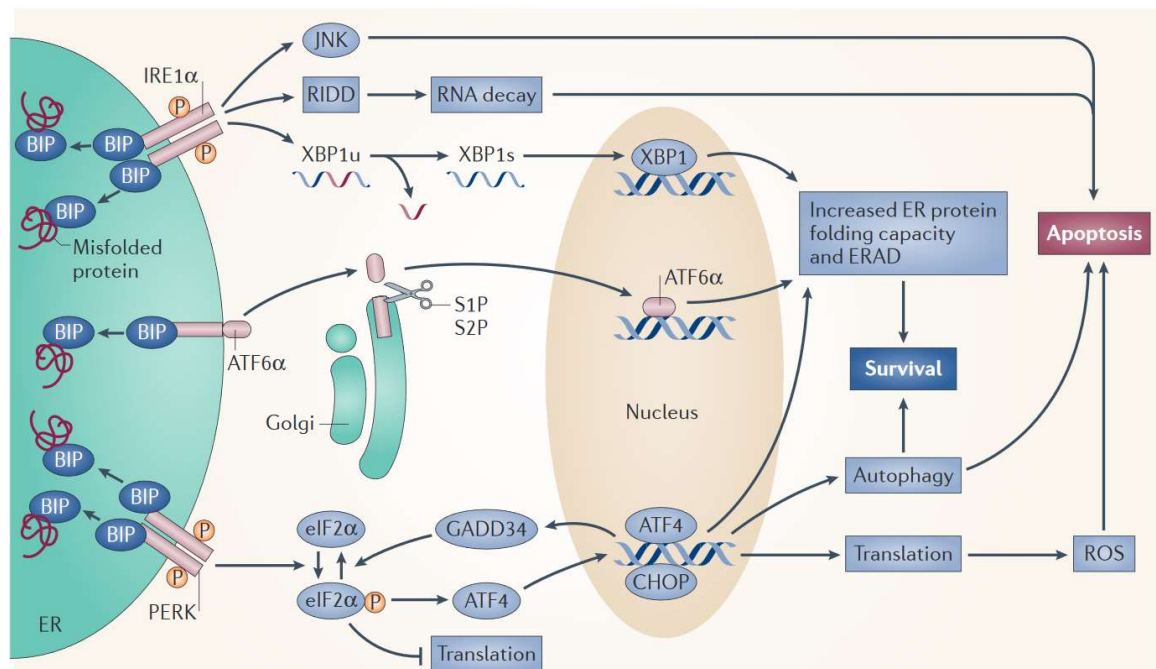


Figura 15. Vies de senyalització de la UPR. Sota condicions d'estrès de reticle, s'inicia la resposta de proteïnes mal plegades (UPR) amb l'activació de tres efectors, PERK, IRE1 α i ATF6. L'activació d'aquests sensors es dona per la relocalització de BiP de la membrana de l'ER al lumen, on s'associa amb les proteïnes mal plegades. El paper de la UPR és restablir l'homeòstasi de l'ER augmentant la capacitat de plegament de proteïnes, el transport i la degradació de proteïnes associada a l'ER (ERAD), alhora que atenua la síntesi de proteïnes i s'activa l'autòfàgia. Una activació prolongada de la UPR activa finalment l'apoptosi (Wang and Kaufman, 2014).

L'estrès de reticle és freqüent en les malalties del cor i pot induir la UPR, reduint l'expressió de proteïnes essencials, afectar negativament la funció cel·lular i fins i tot conduir a la mort dels cardiomiòcits en condicions d'estrès no controlades. En l'infart de miocardi es pertorba l'homeòstasi de l'ER acumulant proteïnes mal plegades seguit de l'activació de l'UPR. A més, l'aterosclerosi és una conseqüència de l'acumulació de proteïnes mal plegades per oxidació excessiva de lípids i acumulació de grans quantitats d'èsters de colesterol en macròfags. Fàrmacs que modulen directament la UPR s'estan considerant eines prometedores pel tractament de malalties cardiovasculars. Una de les estratègies que s'ha utilitzat és l'estabilització i rescat de proteïnes mal plegades mitjançant xaperones químiques, que exerceixen un paper protector contra la hipertròfia i la insuficiència cardíaca. No obstant, degut a que la UPR és un procés essencial per mantenir la funció cel·lular normal, cal una intervenció específica i temporal dels sensors de la UPR (Zhang et al., 2019).

3.2 Autofàgia

L'autofàgia és un procés catabòlic evolutivament conservat i altament regulat que té un paper essencial en l'homeòstasi cel·lular facilitant la degradació lisosomal i el reciclatge de macromolècules i orgànuls intracel·lulars (denominats càrrega autofàgica) en condicions fisiològiques. Així mateix, l'autofàgia és un procés adaptatiu que pot ser induït com a resposta a diferents senyals d'estrès, incloent la privació de nutrients, la hipòxia, l'estrès oxidatiu, l'estrès de reticle i infeccions, i té com a funció principal el control de qualitat de proteïnes i dels orgànuls, proporcionant aminoàcids i àcids grassos per la síntesi d'ATP. A més, també regula la secreció i el tràfic intracel·lular (Hansen et al., 2018). Així doncs, actua com a mecanisme primari de supervivència, reciclant material citoplasmàtic per la producció d'energia o per a l'eliminació de proteïnes o molècules que puguin causar algun tipus de dany a la cèl·lula. Al sistema cardiovascular, l'autofàgia està implicada en el correcte funcionament de virtualment totes les cèl·lules que el componen i s'ha demostrat que multiplicitat de situacions patològiques cursen amb alteracions del flux autofàgic (Lavandero et al., 2015).

Es distingeixen tres tipus d'autofàgia; la microautofàgia, en la que els components citoplasmàtics són segrestats directament pel lisosoma mitjançant la invaginació de la membrana lisosomal i degradats per hidrolases àcides; l'autofàgia regulada per xaperones, que es caracteritza per la unió de proteïnes que contenen una seqüència KFERQ amb la xaperona citoplasmàtica HSC70 (*Heat Shock Cognate 70kDa protein*), que és l'encarregada de promoure la translocació dels substrats a través de les membranes fins al lumen del lisosoma mitjançant la interacció amb la proteïna LAMP2A (*Lysosomal Associated Membrane Protein 2A*) (Kaur and Debnath, 2015), i la macroautofàgia (comunament anomenada autofàgia), que implica la formació de vesícules de doble membrana anomenades autofagosomes, que rodegen i inclouen el material a degradar, i que es fusionen amb els lisosomes per formar autofagolisosomes, on la càrrega és degradada per hidrolases àcides i proteases lisomals (Chen and Klionsky, 2011). Els productes degradats, que inclouen sucres,

nucleòtids, aminoàcids i àcids grassos poden ser transportats de nou al citoplasma i ser utilitzats en el metabolisme cel·lular, proporcionant fonts d'energia a la cèl·lula (Galluzzi et al., 2015).

El procés autofàgic està regulat per una sèrie de gens específics relacionats amb l'autofàgia (ATG) que codifiquen per proteïnes que regulen l'inici i la maduració dels autofagosomes i la fusió d'aquests amb els lisosomes per formar els autolisosomes. Les ATGs es troben formant varis complexos; el complex d'iniciació de la quinasa 1 de tipus Unc-51 (ULK1), el complex de nucleació PI3K de classe III, el complex d'unió del fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P), i els sistemes de conjugació d'ATG12 i LC3. Els efectors principals de l'autofàgia són la serina/treonina quinasa mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), que la regula negativament, i la quinasa activada per AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), que la regula positivament (Hansen et al., 2018; Sciarretta et al., 2018).

3.2.1 Mecanisme autofàgic

En el procés autofàgic es poden diferenciar quatre fases: I) la iniciació, II) la nucleació i formació del fagòfor, III) l'expansió del fagòfor i el segrest de la càrrega citoplasmàtica, i IV) la fusió de l'autofagosoma amb un lisosoma i degradació de la càrrega (Figura 16).

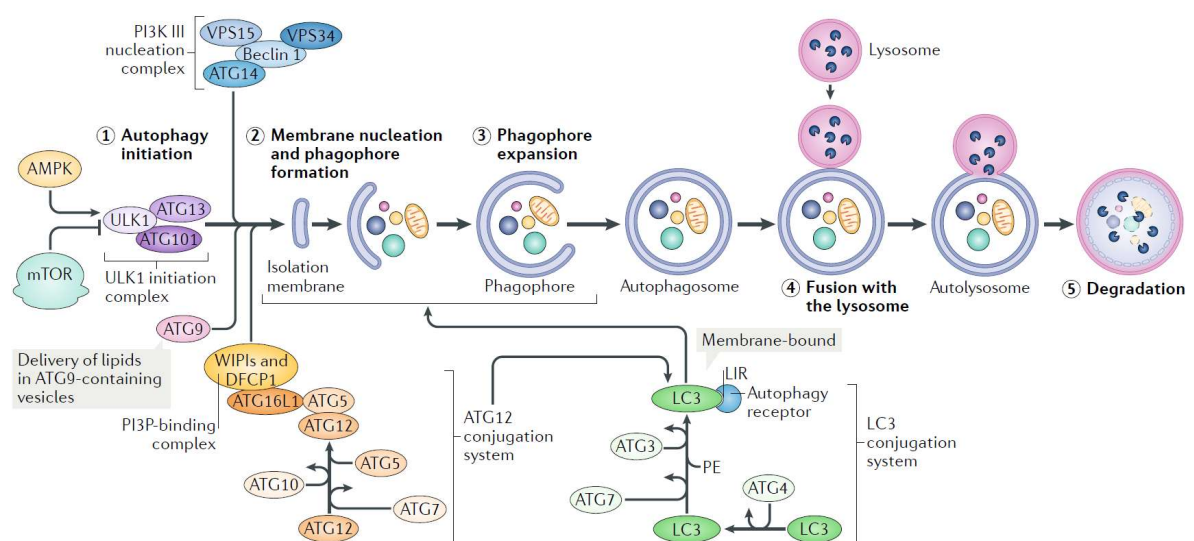


Figura 16. El procés de la macroautofàgia. mTOR i AMPK són els principals reguladors de l'autofàgia, amb mTOR actuant com a inhibidor i AMPK com a activador. Quan s'indueix l'autofàgia, el material citoplasmàtic (càrrega) és envoltat per una doble membrana, a partir de la formació d'una estructura anomenada fagòfor fins al segrest en vesícules de doble membrana, els autofagosomes, que posteriorment es fusionen amb lisosomes formant autolisosomes, on la càrrega és degradada. L'autofàgia és un procés de varis passos, que inclouen (1) iniciació, (2) nucleació de membrana i formació del fagòfor, (3) expansió del fagòfor, (4) fusió amb el lisosoma i (5) degradació, i estan regulats per les proteïnes relacionades amb l'autofàgia (ATGs). Les ATGs es troben formant varis complexos: el complex d'iniciació de la quinasa 1 de tipus Unc-51 (ULK1), el complex PI3K de classe III de nucleació i el complex d'unió del fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P), que dirigeix la distribució de la maquinària que permet la formació de l'autofagosoma i inclou els sistemes de conjugació d'ATG12 i de LC3 (Hansen et al., 2018).

- I. **Iniciació:** La formació de l'autofagosoma s'inicia amb la generació d'una membrana d'aïllament (fagòfor) que s'origina a partir de membranes del reticle endoplasmàtic, de l'aparell de Golgi, dels mitocondris i membrana plasmàtica. La iniciació del fagòfor és promoguda pel complex

d'iniciació ULK, que està format per ULK1/2, ATG13, FIP200 (*FAK family-interacting protein of 200 kDa*) i ATG101. mTOR és l'efector principal de l'autofàgia, i quan està actiu és capaç d'inhibir l'autofàgia mitjançant la interacció amb el complex ULK i la fosforilació directa de la proteïna ULK1. En canvi, una inhibició de mTOR produeix la seva dissociació del complex ULK, produint un canvi en la fosforilació d'ULK1 i la seva activitat catalítica. Aquesta activació produeix la fosforilació d'ATG13 i FIP200 i conseqüentment l'inici de l'autofàgia (Dikic and Elazar, 2018; Sciarretta et al., 2018).

- II. **Nucleació i formació del fagòfor:** El complex de nucleació PI3K de classe III està format per Beclin1, ATG14L, VPS34 (*Vacuolar Protein Sorting 34*) i VPS15 (*Vacuolar Protein Sorting 15*) i és l'encarregat d'iniciar el procés de nucleació. ULK1 fosforila Beclin1 activant així el complex, el qual és fonamental per a la formació del nou autofagosoma. VPS34 genera PI3P a partir de la fosforilació de fosfatidil inositol (PI), necessari per la nucleació i el creixement del fagòfor, i la seva activitat requereix de VPS15. El PI3P promou la translocació de múltiples proteïnes de l'autofàgia al lloc de formació del fagòfor, com DFCP1 (*Double FYVE-Containing Protein 1*) i WIPI1 (*WD repeat domain Phosphoinositide-Interacting protein 1*) que són proteïnes efectores essencials per a la iniciació de la nucleació de la doble membrana de la vesícula (Kroemer et al., 2010; Kim and Lee, 2014). La proteïna amb funció antiapoptòtica Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), és un important regulador negatiu de l'autofàgia mitjançant la interacció entre els seus dominis BH3 i els de Beclin1, i inhibint conseqüentment l'autofàgia (Ravanan et al., 2017; Dikic and Elazar, 2018).
- III. **Expansió del fagòfor:** Durant l'expansió, el fagòfor segresta la càrrega autofàgica, madura i es tanca. L'elongació i el tancament de l'autofagosoma es produeixen mitjançant diverses proteïnes ATG, que es divideixen en dos sistemes de conjugació, el sistema de conjugació d'ATG12 i el sistema de conjugació de LC3. El sistema de conjugació d'ATG12 implica altres membres com ATG7 (com a enzim E1), ATG10 (com a enzim E2) i ATG16L i forma el complex multimèric ATG12-ATG5-ATG16L. ATG12 es conjuga a ATG5 mitjançant l'acció d'ATG7 i ATG10, i s'uneix no covalentment a ATG16L. Aquest complex permet la correcta curvatura i allargament del fagòfor i té funció lligasa E3 essencial per la lipidació de LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) mitjançant la seva conjugació a la fosfatidiletanolamina (PE).

El sistema de conjugació LC3 inclou ATG4 (una proteasa), ATG7 (com a enzim E1) i ATG3 (com a enzim E2). Es dona per accions seqüencials, primer ATG4 talla pro-LC3 a LC3-I (la forma lliure difusa), i posteriorment actuen ATG7 i ATG3 per conjugar la PE a LC3, generant la forma lipidada de LC3 coneguda com LC3-II. LC3-II s'associa de forma estable a les membranes dels autofagosomes (tant a la superfície interna com en l'externa), promovent l'expansió del fagòfor i facilitant el reclutament de la càrrega autofàgica, ja que interacciona amb els receptors de

càrrega autofàgica amb domini d'interacció amb LC3 (LIR; *LC3-interacting region*) (Ravanan et al., 2017; Dikic and Elazar, 2018).

- IV. **Fusió i degradació:** La unió de les proteïnes i orgànuls que són inclosos als autofagosomes per a ser degradats és facilitada per receptors i proteïnes adaptadores, com el sequestosoma-1 (SQSTM1 o p62; *Sequestosome-1*) que s'expressa de forma constitutiva i conté un domini d'unió a la ubiquitina per segrestar proteïnes ubiquitinades i una regió d'interacció a LC3 (domini LIR) per alliberar proteïnes segrestades. Altres proteïnes adaptadores com NBR1 (*Next to BRCA1 gene 1 protein*) i ALFY (*Autophagy-linked FYVE-domain containing protein*) funcionen com a pont entre el LC3-II ancorat a la membrana interna de l'autofagosoma i les proteïnes o agregats a ser degradats.

Els autofagosomes madurs es fusionen amb els lisosomes per formar autofagolisosomes (o autolisosomes), on tot el contingut és degradat per l'acció dels enzims lisosomals. El contingut degradat torna al citosol mitjançant permeases, de manera que els productes resultants són reincorporats al metabolisme cel·lular. Així doncs, juntament amb la càrrega, també són degradades les proteïnes adaptadores i la fracció de LC3-II que es troba localitzada a la membrana interna de l'autofagosoma. Per contra, la fracció de LC3-II que es troba a la part externa és reciclada (Ravanan et al., 2017; Dikic and Elazar, 2018; Sciarretta et al., 2018).

3.2.2 Autofàgia selectiva

Inicialment es pensava que l'autofàgia era una via de degradació no selectiva, no obstant, actualment se sap que hi ha dos tipus d'autofàgia, la no selectiva i la selectiva. En resposta a la privació de nutrients, l'autofàgia no selectiva s'activa per proporcionar a les cèl·lules aminoàcids i nutrients essencials per a la seva supervivència. En canvi, l'autofàgia selectiva es produeix per eliminar específicament orgànuls danyats o en excés, o bé proteïnes agregades i que té lloc fins i tot en condicions riques de nutrients. L'autofàgia selectiva pot eliminar estructures cel·lulars concretes, com mitocondris danyats (mitofàgia), reticle endoplasmàtic (er-fàgia), agregats proteics (agrefàgia), peroxisomes (pexofàgia), lisosomes (lisofàgia), entre d'altres.

L'autofàgia selectiva es desenvolupa gràcies a l'acció d'adaptadors autofàgics que són capaços de reconèixer senyals en la càrrega autofàgica. En mamífers, es troben freqüentment marcats amb ubiquitina. Els adaptadors solen tenir un domini d'unió a la ubiquitina (UBD) i un domini d'interacció amb LC3 (LIR), el qual facilita la unió a LC3. Com a resultat, aquests adaptadors actuen com a ponts que incorporen les proteïnes marcades amb ubiquitina (Ub) a les vies de degradació autofàgica (Dikic and Elazar, 2018).

La mitofàgia és crucial per al control de qualitat mitocondrial i la supervivència cel·lular. La mitofàgia s'activa durant l'estrès, permetent l'eliminació dels mitocondris danyats i està estretament acoblada

a la biogènesi mitocondrial, de manera que els mitocondris eliminats són reemplaçats contínuament per mitocondris nous. Hi ha dues vies de senyalització que controlen la mitofàgia, la via PINK1/Parkin i la mitofàgia regulada per receptors (Figura 17).

- » **Via PINK1/Parkin:** PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) és una serina/treonina quinasa que, en condicions fisiològiques, és transportada a la membrana mitocondrial interna i seguidament degradada pel proteasoma. En mitocondris danyats, es produeix una disminució del potencial de membrana que condueix a l'estabilització de PINK1 a la membrana mitocondrial externa. PINK1 s'activa mitjançant autofosforilació que altera la conformació de Parkin, promovent el seu reclutament a la superfície mitocondrial i desencadenant la seva activitat Ub lligasa E3 mitjançant la seva fosforilació i de la ubiquitina. Parkin poli-ubiquitinitza les proteïnes mitocondrials, i les cadenes de poli-ubiquitina són fosforilades per PINK1 que servirà com a senyal per a la maquinària autofàgica. Les proteïnes adaptadores, p62, NDP52 (*Nuclear Dot Protein 52*) i OPTN (*Optineurin*), reconeixen les cadenes de poli-Ub fosforilades de les proteïnes mitocondrials a través dels dominis UBD i inicien la formació de l'autofagosoma mitjançant la interacció directa amb LC3 amb els seus dominis LIR.

La via PINK1/Parkin intervé en el control de qualitat mitocondrial, ja que, PINK1 desencadena l'activitat de DRP1 promovent la fissió mitocondrial i permetent la degradació autofàgica. A més, existeix el recanvi de MFN depenent de Parkin, que evita la fusió mitocondrial permetent l'aïllament de mitocondris defectuosos. PINK1 fosforila MFN2 permetent la seva associació amb Parkin, interrompent els llocs de contacte ER-mitocondri, separant els orgànuls danyats i facilitant-ne l'eliminació (Fivenson et al., 2017; Dikic and Elazar, 2018; Palikaras et al., 2018).

- » **Mitofàgia regulada per receptors:** Els receptors de mitofàgia NIX (*Nip3-like protein X*), BNIP3 (*BCL2 interacting protein 3*) i FUNDC1 (*FUN14 domain-containing protein 1*) es localitzen a la membrana mitocondrial externa i interaccionen directament amb LC3 per regular l'eliminació dels mitocondris. S'ha demostrat també que la cardiolipina i la prohibitina 2 (PHB2), que són proteïnes que es troben a la membrana mitocondrial interna, són exposades al citosol i interaccionen amb LC3 a través dels seus dominis LIR, actuant com a proteïnes adaptadores i promovent la formació de l'autofagosoma. NIX i BNIP3 són proteïnes amb un domini BH3, i són fosforilats per PINK1 augmentant la seva afinitat per LC3 a través dels seus dominis LIR, suggerint una relació entre la via PINK1/Parkin i els receptors. A més, aquests receptors interfereixen en la dinàmica mitocondrial promovent la fissió reclutant DRP1 a la superfície mitocondrial, i associant-se amb OPA1 per inhibir la fusió mitocondrial. En condicions d'hipòxia, HIF1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*) regula els nivells de NIX, BNIP3 i FUNDC1 promovent la seva expressió per afavorir la mitofàgia (Fivenson et al., 2017; Gkikas et al., 2018; Palikaras et al., 2018).

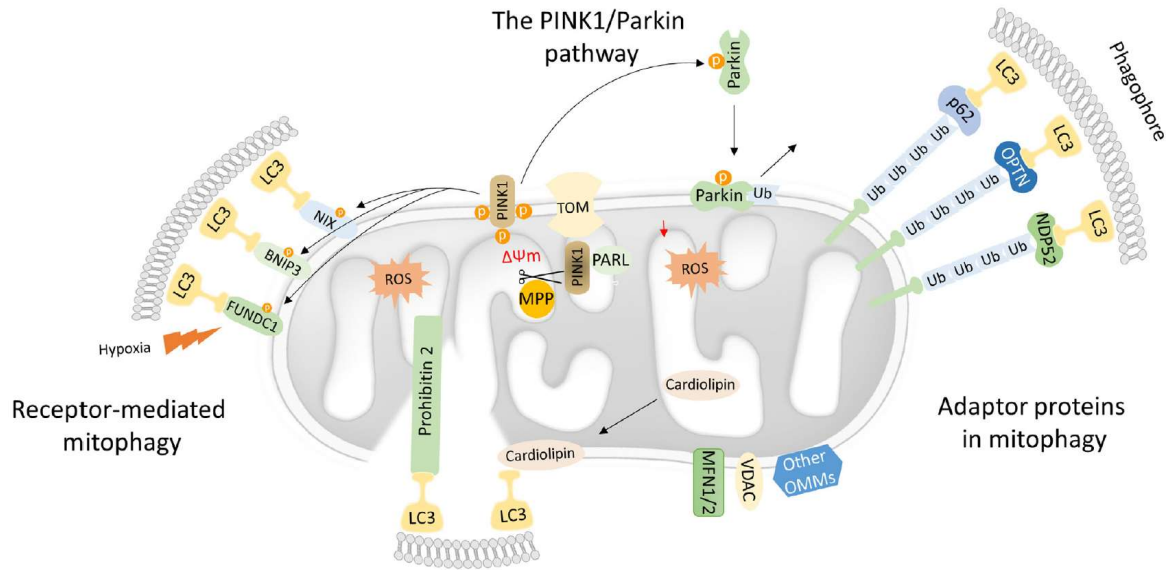


Figura 17. La mitofàgia. En mitocondris danyats, PINK1 s'estabilitza a la membrana externa on promou el reclutament de Parkin mitjançant una sèrie de fosforilacions tant de Parkin com de la ubiquitina. Al seu torn, Parkin desencadena la poliubiquitinació de diverses proteïnes de la membrana mitocondrial externa. Les proteïnes poli-Ub són reconegudes per molècules adaptadores, com són p62, OPTN i NDP52, promovent el seu reconeixement de LC3 i la formació de l'autofagosoma. La mitofàgia regulada per receptors es basa en diverses proteïnes de la membrana mitocondrial externa, en concret NIX, BNIP3 i FUNDC1. També PHB2 i la cardiolipina serveixen com a receptors mitofàgics una vegada s'exposen al citosol i recluten LC3 a través dels seus motius LIR (Gkikas et al., 2018).

Es sap que el control de qualitat mitocondrial és fonamental per l'homeòstasi cardíaca i per evitar l'envelliment i el desenvolupament de malalties cardíques. Diversos estudis han demostrat que la interrupció de proteïnes autofàgiques té conseqüències greus per al cor, tant en condicions basals com en resposta a l'estrès. S'ha demostrat que la mitofàgia regulada per Parkin és cardioprotectora després d'un infart de miocardi, ja que la interrupció de Parkin provoca l'acumulació de mitocondris disfuncionals i es correlaciona amb una supervivència reduïda. En un estrès com la isquèmia-reperfusió, es produeix la inhibició de la mitofàgia provocant una acumulació de mitocondris danyats i la pèrdua de cardiomiòcits. A més a més, l'envelliment s'associa generalment amb una autofàgia reduïda al cor, provocant l'acumulació de mitocondris disfuncionals i una major susceptibilitat a l'estrès. Molts dels components de l'autofàgia redueixen els seus nivells amb l'edat, contribuint a una autofàgia reduïda. Degut a això, es va veure que la sobreexpressió d'Atg5 era protector activant l'autofàgia i allargant la vida. La sobreexpressió de Parkin, PINK1 i BNIP3 també resulten en una funció contràctil miocàrdica millorada i una vida més llarga (Moyzis and Gustafsson, 2019).

3.3 Apoptosi

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada conservat evolutivament i és essencial per a l'homeòstasi de l'organisme. Es desencadena en resposta a un estrès cel·lular fisiològic o patològic, permetent l'eliminació de cèl·lules malmeses i es caracteritza pel manteniment de les membranes cel·lulars intactes permetent la seva eliminació per fagocitosi. Primer té lloc una fase d'iniciació, que pot ser via mitocondrial (via intrínseca) o via mitjançant receptors de mort (via extrínseca), i

posteriorment, les dues vies convergeixen en una segona fase d'execució caracteritzada per l'activació de les caspases, últimes responsables de les característiques morfològiques d'aquesta mort apoptòtica (Figura 18). Les característiques morfològiques de l'apoptosi són una reducció del volum cel·lular, la condensació de la cromatina, la fragmentació nuclear i de l'ADN, el trencament específic de proteïnes cel·lulars i la formació de cossos apoptòtics. Finalment, té lloc la fase d'eliminació, en la qual els macròfags fagociten els cossos apoptòtics sense activar una resposta inflamatòria (Kroemer et al., 2009; Ichim and Tait, 2016; Kiraz et al., 2016).

Les caspases són cisteïn-proteases i es classifiquen en caspases iniciadores, que són les Caspases 8 i 9 i són les que inicien el procés, i caspases executores, que són les Caspases 3, 6 i 7 i són els efectors apoptòtics. Les caspases iniciadores s'activen a partir de procaspases inactives i activen les caspases executores, que inicien una cascada d'esdeveniments que promouen la fragmentació de l'ADN a partir de l'activació d'endonucleases, l'eliminació de proteïnes nuclears i del citoesquelet, l'expressió de lligands per a cèl·lules fagocítiques i la formació de cossos apoptòtics (D'Arcy, 2019).

- » **Via extrínseca:** S'inicia amb l'activació de receptors de mort transmembrana, que mitjançant la unió del seu lligand pateixen un canvi conformacional que inicia la cascada de senyalització. Els principals receptors de mort són CD95 o Fas (el seu lligand és CD95L o FasL), TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) i els receptors de mort de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*). La unió del lligand amb el receptor forma un complex on s'uneixen molècules adaptadores citosòliques com FADD (*Fas-Associated Death Domain Protein*), mitjançant els seus dominis de mort permetent el reclutament de la procaspasa-8. La Caspasa 8 s'activa per processament proteolític i activa a les Caspases 3 i 7, que inicien els esdeveniments que conduiran a la mort apoptòtica.
- » **Via intrínseca:** Diferents estímuls de mort produeixen canvis en la membrana mitocondrial que provoquen l'obertura del porus mitocondrial de permeabilitat transitòria (mPTP; *mitochondrial Permeability Transition Pore*), la pèrdua del potencial de membrana i l'alliberament de proteïnes pro-apoptòtiques al citosol, com el citocrom C, el factor inductor de l'apoptosi (AIF; *Apoptosis-inducing Factor*) i l'endonucleasa G (EndoG). El citocrom C s'uneix a la proteïna citosòlica Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*), que té un domini de reclutament i activació de caspases CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) on la Caspasa 9 és reclutada i activada. El complex citocrom C/Apaf-1/Caspasa 9 s'anomena apoptosoma, i recluta i activa la Caspasa-3, la qual processa proteolíticament substrats específics produint canvis cel·lulars i bioquímics típics de l'apoptosi.

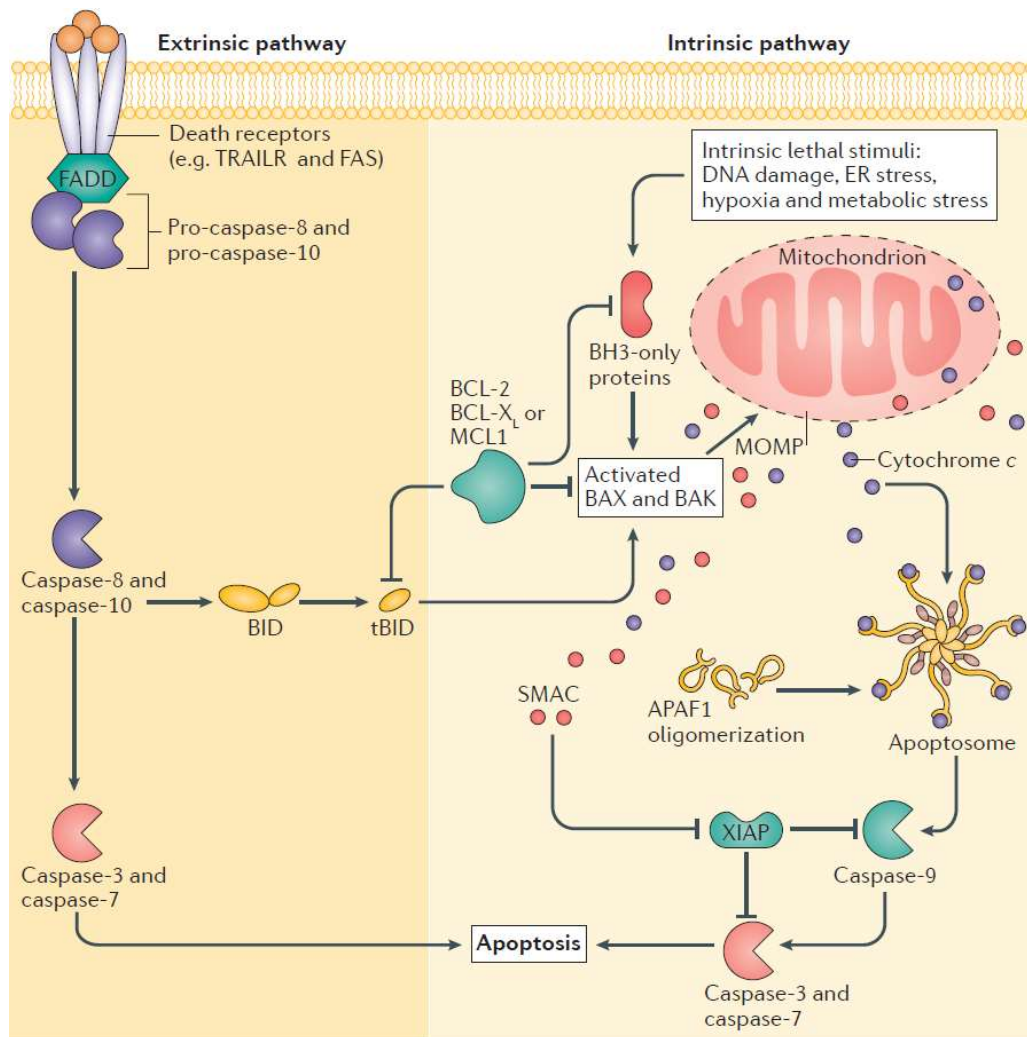


Figura 18. Via extrínseca i intrínseca de l'apoptosi. En la via extrínseca, la unió del lligand amb el seu receptor de mort activa les caspases iniciadores (Caspasa 8 i 10) mitjançant la unió de proteïnes adaptadores com FADD. Les Caspases 8 i 10 activen les Caspases 3 i 7, promovent l'apoptosi. La via intrínseca és induïda per estressos com dany a l'ADN, estrès d'ER, hipòxia o estrès metabòlic i provoquen l'activació de proteïnes *BH3-only*, que a la vegada activen les proteïnes pro-apoptòtiques Bax i Bak, les quals desencadenen la permeabilització de la membrana mitocondrial permetent l'alliberament de SMAC i citocrom C al citosol. El citocrom C interacciona amb Apaf-1 formant l'apoptosoma que activa la Caspasa 9. Aquesta, al seu torn, activa les Caspases 3 i 7 donant lloc a l'apoptosi. SMAC facilita l'apoptosi inhibint a XIAP, que és un inhibidor de l'apoptosi (Ichim and Tait, 2016).

Tots aquests esdeveniments són regulats principalment per la família de proteïnes Bcl-2, que poden actuar com a pro-apoptòtics o anti-apoptòtics (Kiraz et al., 2016).

En el context del miocardi, la via de senyalització per apoptosi està implicada en el correcte desenvolupament embrional del cor tant influenciant la diferenciació dels cardiomiòcits (Putinski et al., 2013) com, segons ha demostrat el nostre grup, la seva proliferació (Cardona et al., 2015). Malgrat la creença que estava implicada en la mort del miocardi en diverses patologies (Foo et al., 2005), el nostre grup ha contribuït a demostrar que la mort dels cardiomiòcits diferenciats no implica l'activació de caspases (Inserte et al., 2016) ja que es troben silenciades en el miocardi diferenciat (Bahi et al., 2006). Tot i això, l'apoptosi afecta a altres tipus cel·lulars implicats en la lesió cardíaca durant la isquèmia/reperfusió (Davidson et al., 2020)

3.3.1 Família Bcl-2

Els membres de la família Bcl-2 són els principals reguladors del procés apoptòtic i determinen la integritat de la membrana mitocondrial. Es divideixen en tres subfamílies; membres anti-apoptòtics (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, MCL-1 i BFL-1), membres pro-apoptòtics (Bax i Bak), i membres de la família "BH3-only" (com Bid, Bim, Puma i Noxa). Els membres anti i pro-apoptòtics posseeixen quatre dominis homòlegs conservats (BH1-4), amb el domini BH3 com a domini de mort (Figura 19). Els membres "BH3-only" són un subconjunt de proteïnes pro-apoptòtiques que només s'activen en condicions d'estrès, i quan són actives, inactiven els membres anti-apoptòtics mitjançant una unió que promou l'activació dels membres pro-apoptòtics (Bax i Bak), que permetran l'alliberament del citocrom C mitjançant la permeabilització de la membrana mitocondrial i promovent la via intrínseca de l'apoptosi (Kiraz et al., 2016; Gross and Katz, 2017).

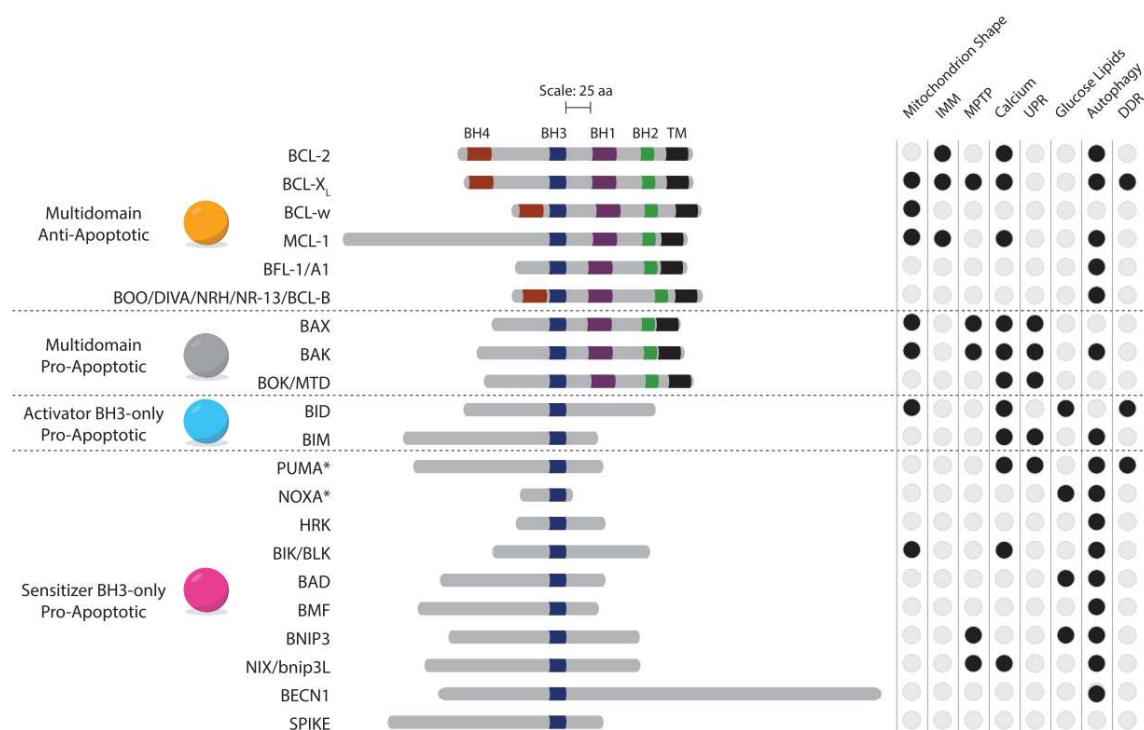


Figura 19. Classificació de la família Bcl-2. Els membres de la família Bcl-2 es divideixen en anti-apoptòtics, pro-apoptòtics, i una subfamília de membres pro-apoptòtics "BH3-only". A la figura estan representats els dominis d'homologia (BH) compartits i conservats i les regions transmembrana (TM). Els cercles negres mostren funcions alternatives dels membres de la família Bcl-2 (Gross and Katz, 2017).

Tots els membres de la família Bcl-2 comparteixen funcions típiques, es dimeritzen amb altres membres de la família Bcl-2, contribueixen a la regulació de l'homeòstasi mitocondrial mitjançant proteïnes d'unió i a la formació del porus mitocondrial.

El nostre grup va demostrar que els fibroblasts cardíacs expressen nivells elevats de Bcl-2, proteïna que els confereix resistència a l'apoptosi induïda durant la isquèmia. Bcl-2 exerceix el seu efecte protector mitjançant la inhibició de l'alliberament del citocrom C (Mayorga et al., 2004). Aquells

resultats suggerien que Bcl-2 pot ser un factor clau per regular la supervivència dels fibroblasts cardíacs i per tant, regular la formació de la cicatriu i la remodelació cardíaca.

3.3.1.1 Funcions no apoptòtiques dels membres de la família de Bcl-2

Diversos estudis han demostrat que membres de la família Bcl-2, com Bax i Bak, regulen la dinàmica mitocondrial sota estímuls apoptòtics i no apoptòtics mitjançant la interacció amb DRP1 en el procés de fissió mitocondrial o amb MFN1/2 en el procés de fusió mitocondrial (Karbowski et al., 2006; Cleland et al., 2011).

Bcl-X_L es localitza a la membrana mitocondrial interna i interacciona amb l'ATP sintasa i és important per al manteniment del potencial de membrana mitocondrial, ja que s'ha demostrat que impedeix la fuga de protons modulant directament l'ATP sintasa i permet l'augment de producció d'ATP en situacions d'increment de la demanda energètica (Alavian et al., 2011).

Perciavalle et al suggereixen que la deleció de MCL-1 resulta en nombrosos defectes mitocondrials, com crestes mitocondrials desorganitzades, pèrdua de la xarxa mitocondrial tubular, disminució de l'activitat enzimàtica del complex I, II i III de la cadena de transport electrònic, disminució de la formació de supercomplexos respiratoris i disminució dels nivells d'ATP i de consum d'oxigen (Perciavalle et al., 2012).

En la resposta de proteïnes mal plegades, IRE1 α promou l'apoptosi en última instància amb l'activació de JNK que fosforila i inhibeix les funcions anti-apoptòtiques de Bcl-2 i Bcl-X_L. En canvi, Bax i Bak s'uneixen a IRE1 α per modular l'amplitud de la seva senyalització. En conjunt, la via UPR està modulada per membres de la família Bcl-2 davant de danys cel·lulars irreversibles amb l'objectiu d'una resposta adaptativa (Hetz, 2006; Chonghaile et al., 2015).

En l'autofàgia, Beclin1 té un domini funcional BH3, de manera que els membres anti-apoptòtics com Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w i MCL-1 poden unir-se a Beclin1 i impedir que formi el complex d'inici, actuant com a reguladors negatius. No obstant, les proteïnes "*BH3-only*" com Bad, BNIP3 i Noxa promouen l'autofàgia a l'alliberar Beclin1 del complex anti-apoptòtic inhibidor. BNIP3 promou la mitofàgia a l'actuar com a receptor de LC3 i també promou l'activació de PINK1. No obstant, la mitofàgia és inhibida per les proteïnes anti-apoptòtiques que s'uneixen i impedeixen la translocació de Parkin, però pot ser neutralitzat per proteïnes "*BH3-only*" com Bad, Bim, Noxa i Puma. Així doncs, la senyalització pro-apoptòtica estimula la mitofàgia com a mecanisme protector contra la pèrdua de la funció mitocondrial (Pattingre et al., 2005; Levine et al., 2008; Gross and Katz, 2017).

3.4 Relació entre UPR, autofàgia i apoptosi

Quan una cèl·lula detecta senyals d'estrès, aquesta respon o bé adaptant-se a l'estrès, o bé induint la mort cel·lular. La cèl·lula activa un mecanisme de supervivència com a resposta adaptativa, però quan els mecanismes adaptatius no aconsegueixen restablir l'homeòstasi cel·lular, la cèl·lula acaba sofrint la mort mitjançant l'apoptosi o altres tipus de mort cel·lular programada. Com s'ha explicat en l'apartat 3.1, quan la cèl·lula experimenta estrès de reticle, activa la UPR per tal d'eliminar l'acumulació de proteïnes mal plegades mitjançant els sensors PERK, IRE1 α i ATF6, però és una resposta adaptativa limitada a un estrès de curt termini. Quan l'estrès d'ER no es resol activant la UPR, la cèl·lula utilitza l'autofàgia com a mecanisme de supervivència per degradar les proteïnes mal plegades, però si l'estrès d'ER és sostingut en el temps s'acaba induint l'apoptosi.

En diversos models cel·lulars s'ha demostrat que ATF4 (activat per PERK) indueix l'autofàgia regulant transcripcionalment gens com ATG7, ATG10 i ATG5, no obstant, també pot induir l'apoptosi mitjançant la degradació de l'inhibidor de l'apoptosi XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) i promovent l'activació de CHOP en un estrès prolongat. CHOP promou l'apoptosi activant BIM i disminuint l'expressió de Bcl-2. Bcl-2 protegeix de l'estrès de reticle disminuint els nivells de Ca²⁺ mitjançant la interacció amb els receptors d'inositol 3-fosfat (IP₃R) i es troba unit a Beclin1 regulant negativament l'autofàgia. A més, s'uneix als membres pro-apoptòtics, inhibint-los i evitant l'obertura del porus mitocondrial, no obstant la seva inactivació augmenta la susceptibilitat a l'apoptosi, degut a que no s'uneix a Bax i Bak, i a l'alliberament de Ca²⁺ de l'ER. BIM inicia la via intrínseca de l'apoptosi activant Bax i Bak, induint l'obertura del porus mitocondrial i permetent l'alliberament del citocrom C. CHOP també indueix ERO1 α que activa els receptors IP₃, afavorint l'alliberament de Ca²⁺ als mitocondris i promovent l'apoptosi.

IRE1 α actiu forma un complex amb TRAF2 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor-2*) i ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase-1*), que activen la via de JNK que pot promoure l'autofàgia o l'apoptosi. En les fases inicials de l'estrès d'ER, la fosforilació de Bcl-2 mediada per JNK promou la dissociació del complex Bcl-2/Beclin1 promovent l'autofàgia. Tanmateix, l'activació sostinguda de JNK acaba promovent l'apoptosi per la inactivació de Bcl-2. A més, XBP-1 promou l'autofàgia mitjançant l'activació transcripcional de Beclin1. L'alliberament de Ca²⁺ de l'ER al citosol estimula la via dependent de CaMKK/AMPK, ja que l'activació d'AMPK inhibeix mTOR induint l'autofàgia. No obstant, l'alliberament de Ca²⁺ sostingut acaba promovent l'apoptosi (Figura 20).

En resum, un cert grau d'autofàgia pot eliminar les proteïnes mal plegades i, per tant, reduir l'estrès de reticle. Tanmateix, l'activació excessiva de l'autofàgia induïda per una llarga durada de l'estrès pot acabar provocant apoptosi. Així doncs, els efectes de l'autofàgia induïda per l'estrès d'ER en la supervivència cel·lular són diferents i té un doble paper de supervivència o mort, que pot dependre de la durada i la intensitat de l'estrès de reticle (Ravanan et al., 2017; Song et al., 2017).

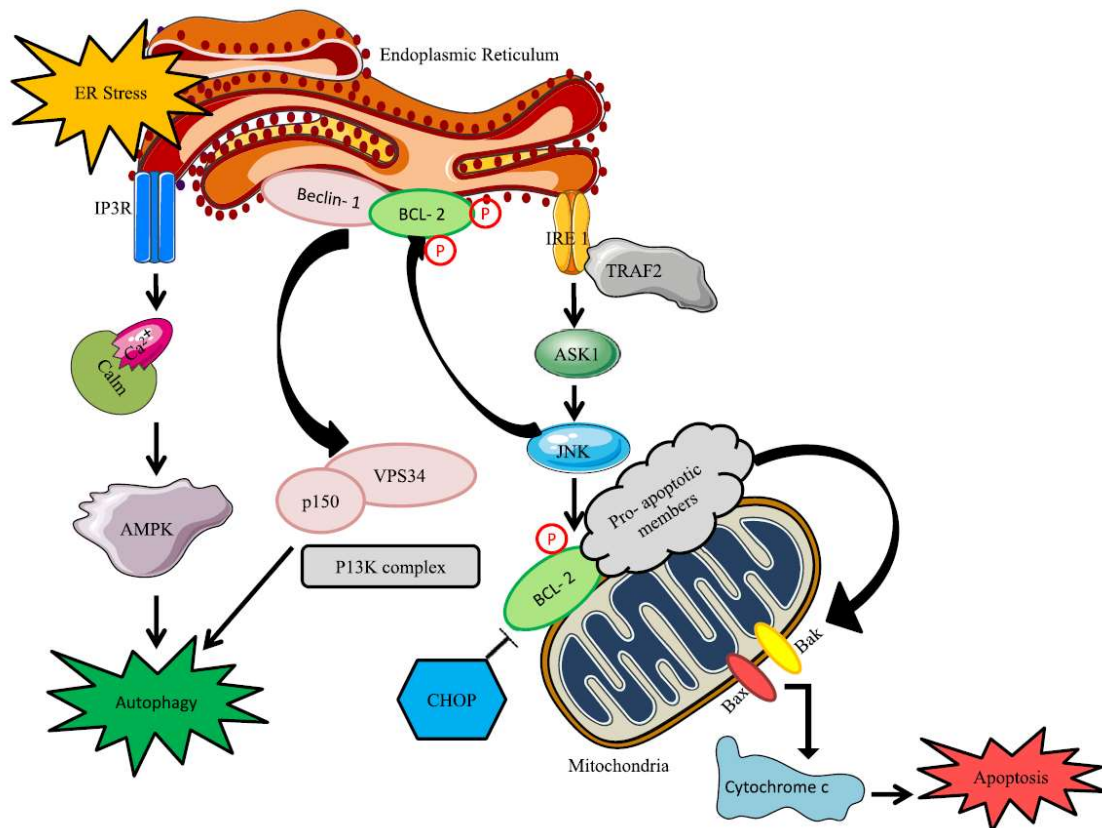


Figura 20. Model esquemàtic de la relació entre la UPR, l'autòfagia i l'apoptosi. Quan una cèl·lula pateix estrès de reticle, activa la via UPR per eliminar les proteïnes mal plegades. Si l'acumulació de proteïnes supera la capacitat de la UPR, segons l'impacte de l'estrès, la cèl·lula activa l'autòfagia, com a mecanisme de supervivència, o l'apoptosi, com a mecanisme de mort cel·lular. La molècula clau entre aquests dos mecanismes és Bcl-2, que és fosforilada per dissociar-se de Beclin1 i promoure l'autòfagia, o bé CHOP disminueix els nivells de Bcl-2 i es tradueix en l'activació de membres pro-apoptòtics que condueixen a l'apoptosi (Ravanan et al., 2017).

3.5 Vies de senyalització cel·lular que promouen supervivència

3.5.1 Vies RISK i SAFE

Estudis recents han demostrat que en la senyalització cardioprotectora, s'activa una cascada de senyalització intrínseca per a la supervivència que implica dues vies principals: la via RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*), en la que participen les kinases PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), Akt/PKB, ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), i GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*), i la via SAFE (*Survivor Activating Factor Enhancement*) en la que hi participa TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) i STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) (Kalakech et al., 2014).

La via RISK implica la combinació de dues cascades de senyalització paral·leles; la via PI3K/Akt i la via MEK1/ERK1/2. La via RISK doncs, es refereix a un grup de proteïnes quinases promotores de supervivència que confereixen cardioprotecció degut a la inhibició de l'obertura del porus mitocondrial. L'activació de receptors acoblats a proteïnes G inicia cascades de senyalització

intracel·lular incloent PI3K/Akt i ERK. La unió de factors de creixement a receptors tirosina-quinasa (RTK) promou la fosforilació de lípids de membrana, a través de la fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K), que actuen reclutant quinases a la membrana. L'activació de PI3K promou la formació de PIP₃ (*phosphatidyl inositol (3,4,5)-triphosphate*) que són llocs d'unió per a PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) i Akt/PKB. El reclutament de la proteïna Akt a la membrana plasmàtica, permet a PDK1 accedir i fosforilar la Thr³⁰⁸, donant lloc a l'activació d'Akt/PKB. A més, Akt/PKB també pot ser fosforilada en altres aminoàcids pel complex mTORC2. La fosforilació d'Akt indueix la fosforilació de diverses proteïnes diana modificant la seva funció per tal de promoure supervivència, proliferació i moltes altres funcions biològiques relacionades amb el metabolisme. A més dels seus rols al citoplasma, s'ha descrit la presència d'Akt fosforilat al mitocondri que indueix la fosforilació i inactivació de GSK-3 β , inhibint l'obertura del porus mitocondrial (Abeyrathna and Su, 2015).

En paral·lel, l'activació de MEK1 fosforila i activa a ERK1/2 provocant, entre d'altres esdeveniments, la seva translocació al mitocondri on inhibeix l'obertura del porus mitocondrial mitjançant la inactivació de GSK-3 β (Brooks and Andrews, 2013). Altres dianes de la via RISK són enzims com la quinasa p70S6, eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) i la proteïna quinasa C (PKC). A més, també fosforila i inactiva Bad, Bax, Bim i les caspases, bloquejant en última instància l'obertura del porus mitocondrial (Lecour, 2009).

Una altra via de senyalització important que s'activa durant la isquèmia i la isquèmia/reperfusió al cor és la via SAFE, en la que participen les quinases JAK (*Janus Kinase*) i les proteïnes STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Les JAK són una família de tirosina quinases que s'associen als receptors de membrana i tenen un paper important en la transducció de senyals del citosol al nucli. La unió de diferents tipus de factors extracel·lulars, incloent citocines, interferó, hormones i factors de creixement, als seus receptors de membrana, promou la seva agregació, unió i activació per fosforilació creuada de membres de la família JAK que, al seu torn activaran per fosforilació els membres de la família STAT que es dirigeixen a nucli on regulen l'expressió de gens implicats en el control del desenvolupament i l'homeòstasi cel·lular. La combinació del tipus de receptor activat, amb els particulars membres JAK i STAT reclutats en la cascada de senyalització dirigiran una resposta específica per part de la cèl·lula (Figura 21). La família de proteïnes STAT consta de set membres: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6. Així doncs, la via JAK/STAT té un paper crucial en l'expressió de gens sensibles a l'estrès (Lecour, 2009) però també està implicada en respostes fisiològiques, com en la resposta immune, desenvolupament, supervivència, proliferació, entre d'altres (Salas et al., 2020).

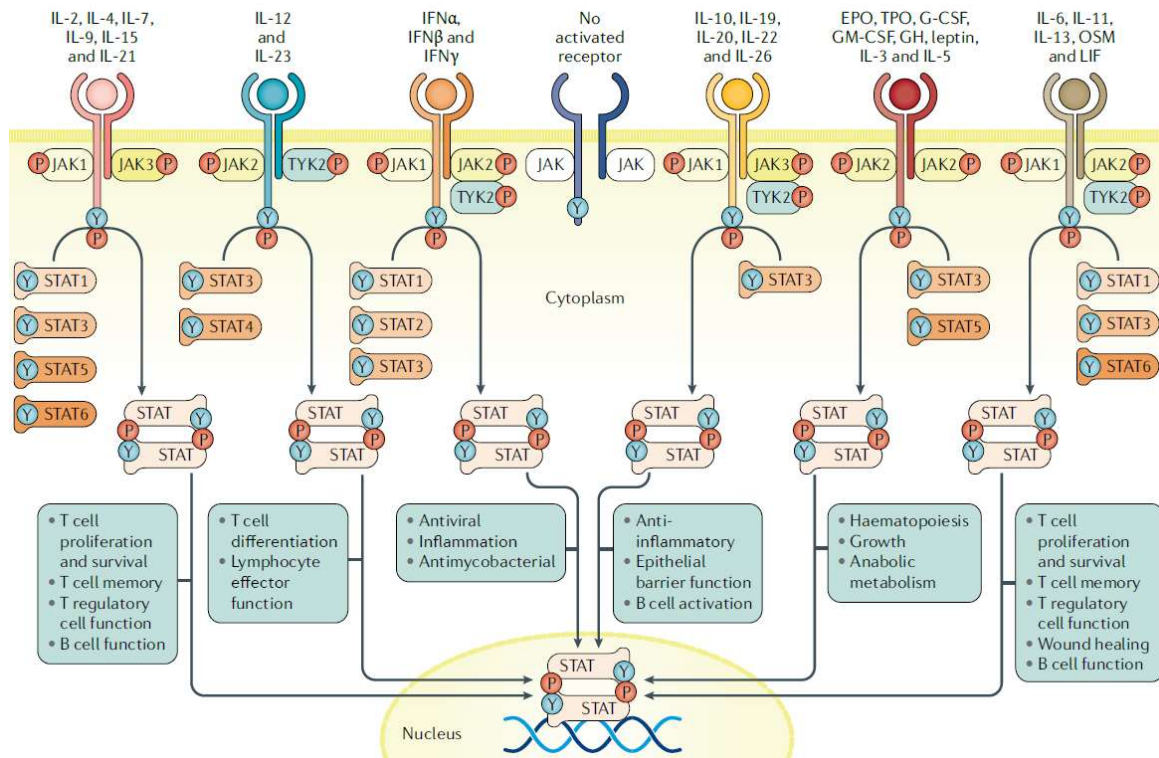


Figura 21. Diferents vies de senyalització intracel·lular regulades per la família de tirosina quinases JAK. JAK i STAT utilitzen segons missatgers per transmetre informació extracel·lular al nucli per modificar l'expressió gènica i les respostes cel·lulars. La senyalització per la via canònica JAK-STAT s'inicia amb la unió d'un lligand al receptor, donant com a resultat l'autofosforilació i/o transfosforilació de JAKs i dels residus tirosina del receptor. L'activació de JAK induïx canvis conformationals que porten els JAKs associats a cada subunitat del receptor molt pròxims l'un de l'altre, provocant una sèrie de posteriors fosforilacions que resulten en la fosforilació, dimerització i activació de proteïnes STAT. Segons el lligand i el receptor, s'activen diferents combinacions de JAKs i STATs amb un alt grau d'especificitat. Els STAT homodimeritzats o heterodimeritzats es transloquen al nucli i regulen la transcripció de gens modulants respostes implicades en la supervivència, proliferació i metabolisme (Salas et al., 2020).

En particular, STAT3 té un paper crucial en el desenvolupament, la resposta de fase aguda, la inflamació crònica, l'autoimmunitat i el metabolisme. Pot ser fosforilat a dos llocs, la Tyr⁷⁰⁵ i la Ser⁷²⁷. La fosforilació a la Tyr⁷⁰⁵ comporta la homodimerització de STAT3, la seva translocació al nucli i unió a l'ADN i la seva posterior activitat transcripcional. En canvi, la fosforilació a la Ser⁷²⁷ es pot produir per diferents quinases, com ERK1/2, JNK o MAP quinases. Aquesta fosforilació es considera un esdeveniment secundari a la fosforilació a la Tyr⁷⁰⁵ i és necessària per la màxima activitat transcripcional de STAT3. En models cel·lulars de càncer i en cèl·lules precursors hematopoietiques, s'ha suggerit que la via JAK/STAT i en especial STAT3 regula l'expressió de gens relacionats amb la proliferació i la supervivència, incloent *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *MCL-1*, *Fas*, *Ciclina D1*, alguns factors de creixement i factors de transcripció com NF-κB, tot i que aquests experiments es van realitzar utilitzant inhibidors de JAK, la qual cosa impedeix identificar el factor STAT implicat (Nielsen et al., 1999; Sepúlveda et al., 2007). Resultats fonamentats en models de sobre-expressió de STAT3 constitutivament actiu o dominant negatiu suggereixen que STAT3 podria regular l'expressió dels gens anti-apoptòtics *Bcl-2* (Fukada et al., 1996; Stephanou and Latchman, 2000; Haga et al., 2003; Bhattacharya et al., 2005) i *Bcl-X*, així com reduir l'expressió dels gens pro-apoptòtics *Bax* i *Bad* (Fukada et al., 1996; Haga et al., 2003).

STAT3 també s'ha trobat a la membrana mitocondrial interna i es coneix com mitoSTAT3. Aquest, s'ha relacionat amb el control de la cadena de transport electrònic i la producció d'ATP (essent essencial la fosforilació a la Ser⁷²⁷ per aquesta localització), la regulació dels nivells dels ROS, el creixement cel·lular, la protecció de lesions en isquèmia-reperfusió mitjançant la regulació del porus mitocondrial, el manteniment del potencial de membrana i inclús en l'homeòstasi del calci (Wegrzyn et al., 2009; Meier et al., 2017).

La via RISK i la via SAFE presenten interacció entre elles, ja que s'ha demostrat que la inhibició de STAT3 bloqueja l'activació de components de la via RISK com Akt o Erk. De la mateixa manera, la inhibició de la via RISK resulta en la no fosforilació de STAT3. Per la seva implicació en la regulació de la supervivència del miocardi durant diverses situacions patològiques i, en particular, la isquèmia/reoxigenació, la via SAFE emergeix com una potencial diana terapèutica rellevant en el tractament de malalties cardiovasculars (Hadebe et al., 2018; Valls-Lacalle et al., 2018).

3.5.2 Via Nrf2

El factor de transcripció *Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) és un regulador important de l'homeòstasi redox mitjançant el control d'una àmplia gamma de gens diana que comparteixen una seqüència d'ADN comuna anomenada ARE (element de resposta antioxidant) a la regió promotora assegurant que la seva activitat augmenta en resposta a alteracions en l'estat redox, privació de nutrients, inflamació o toxicitat.

En condicions basals, Nrf2 es troba al citoplasma unit a Keap1 (*Kelch-like ECH Associating Protein 1*) a través del complex E3 lligasa Keap1-Cullin3 (Cul3)-Rbx1 i és degradat constitutivament pel proteasoma, mantenint nivells baixos de NRF2. En condicions d'estrès, Nrf2 s'allibera de Keap1, s'estabilitza i posteriorment es transloca al nucli formant heterodímers amb proteïnes Maf, s'uneix als elements ARE de les regions dels promotors dels gens diana, activant la seva transcripció. Nrf2 és regulat tant a nivell transcripcional com a nivell post-traducciona. El promotor del gen *Nrf2* inclou un lloc d'unió a NF-κB que pot ser induït per estrès o inflamació, i la transcripció de Nrf2 pot ser induïda també per la via de senyalització PI3K/Akt, augmentant-ne l'expressió (Tonelli et al., 2018).

Els gens diana de Nrf2 estan implicats en una àmplia gamma de processos biològics com la resposta antioxidant (Glutatió-S-Transferasa (GST), GPx, CAT, SOD, Tioredoxina (TRX)), la inflamació (interacció amb NF-κB), metabolisme de Fe-S (HO-1 (*Stress Response Protein Heme Oxygenase 1*) i la ferritina), regeneració del NADPH, (com la G6PD (*Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*)) i autofàgia (p62 interacciona amb Keap1 activant Nrf2), entre altres. A més, regula l'oxidació dels àcids grassos que influencia el metabolisme dels lípids. Per tant, Nrf2 té un paper fonamental en el manteniment de l'homeòstasi redox cel·lular (Liu et al., 2019).

3.5.3 HIF1

En condicions de normòxia, les cèl·lules generen ATP a través de la fosforilació oxidativa mitocondrial, requerint l'oxigen com a acceptor d'electrons final. En canvi, en baixes concentracions d'oxigen, les cèl·lules ajusten el seu consum d'oxigen i utilitzen la glicòlisi citoplasmàtica anaeròbica per evitar l'esgotament d'oxigen. La fosforilació d'ADP exclusiva durant la glicòlisi és un procés que rendeix menys ATP que quan es troba acoblada a la fosforilació oxidativa, però no requereix oxigen i protegeix les cèl·lules de l'anòxia total i de la mort cel·lular.

El factor 1 induïble per hipòxia (HIF1) és el principal regulador de les respostes a la hipòxia. Consta de dues subunitats, HIF1 α i HIF1 β , que s'expressen constitutivament, però només la subunitat HIF1 α és afectada pels nivells d'oxigen. En condicions de normòxia, HIF1 α és degradat ràpidament mitjançant hidroxilació per les PHD (*Prolyl Hydroxylase Domain Proteins*) i ubiquïtinització i posterior degradació al proteasoma. En canvi, en condicions d'hipòxia, HIF1 α no és hidroxilat i ambdues subunitats es transloquen al nucli, on formen heterodímers i s'uneixen als elements de resposta a la hipòxia (HRE) activant la transcripció de gens de resposta a la hipòxia (Semenza, 2001; Dengler et al., 2014).

Com a principal regulador de la resposta a la hipòxia, la senyalització de HIF1 α té com a objectius una àmplia gamma de gens, ja que participa en diversos processos biològics com el metabolisme de la glucosa, incrementant l'expressió de transportadors de glucosa (GLUTs), l'angiogènesi, induint l'expressió de factors pro-angiogènics com VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) per formar nous vasos sanguinis, la proliferació i la supervivència cel·lular, induint l'expressió de la ciclina D1 i c-myc entre altres, la inflamació, mitjançant la interacció amb NF- κ B i Stat3, i l'autofàgia, induint l'expressió de Bnip3 per activar la mitofàgia en condicions d'hipòxia prolongada (Semenza, 2010; Dengler et al., 2014; Balamurugan, 2016).

3.6 Vies implicades en la inflamació

3.6.1 Via NF- κ B

Una de les vies de transducció del senyal implicades en la inflamació és la via de NF- κ B. La família NF- κ B consta de cinc membres; el factor de transcripció p65 (o RelA), c-Rel, el factor de transcripció RelB i les subunitats p50/p105 i p52/p100 (les formes actives són p50 i p52). Aquestes subunitats tenen la capacitat de formar heterodímers amb altres membres de NF- κ B que es transloquen al nucli on activen la transcripció gènica, donant lloc a la regulació d'una multitud de funcions, incloent la supervivència i la migració, així com l'activació de la resposta immune mitjançant l'expressió de citocines inflamatòries i molècules d'adhesió.

La senyalització NF- κ B es divideix en la via canònica i la no canònica. La via canònica s'activa de manera ràpida i transitòria per citocines inflamatòries, patrons moleculars associats a patògens (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) i patrons moleculars associats a danys (DAMPs,

Damage-Associated Molecular Patterns) que actuen mitjançant receptors específics i molècules adaptadores com TNF- α i IL-1 β . L'activació del complex IKK, que inclou les subunitats catalítiques IKK α i IKK β i la subunitat reguladora IKK γ , fosforila l'inhibidor I κ B quinasa, promovent la seva degradació i la formació d'heterodímers p65-p50 que s'uniran a l'ADN. Aquesta via condueix a l'activació de gens que codifiquen per citocines inflamatòries (com TNF, IL-1 i IL6), factors de creixement, MMPs, proteïnes proliferatives (com la ciclina D1) i anti-apoptòtiques (com Bcl-2 i Bcl-X_L), enzims proinflamatoris, i molècules d'adhesió (VCAM1; *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* i ICAM1; *Intercellular Adhesion Molecule 1*). En canvi, la via no canònica és lenta ja que depèn de la síntesi *de novo* de NIK (*NF- κ B-inducing kinase*), que és el regulador central. Aquesta via s'activa per un subconjunt de citocines que pertanyen a la família TNF, com CD40L. Aquest activa el complex IKK i fosforila i inactiva l'inhibidor I κ B i exerceix els seus efectes mitjançant heterodímers RelB-p52 (Figura 22) (Tas et al., 2016; Taniguchi and Karin, 2018).

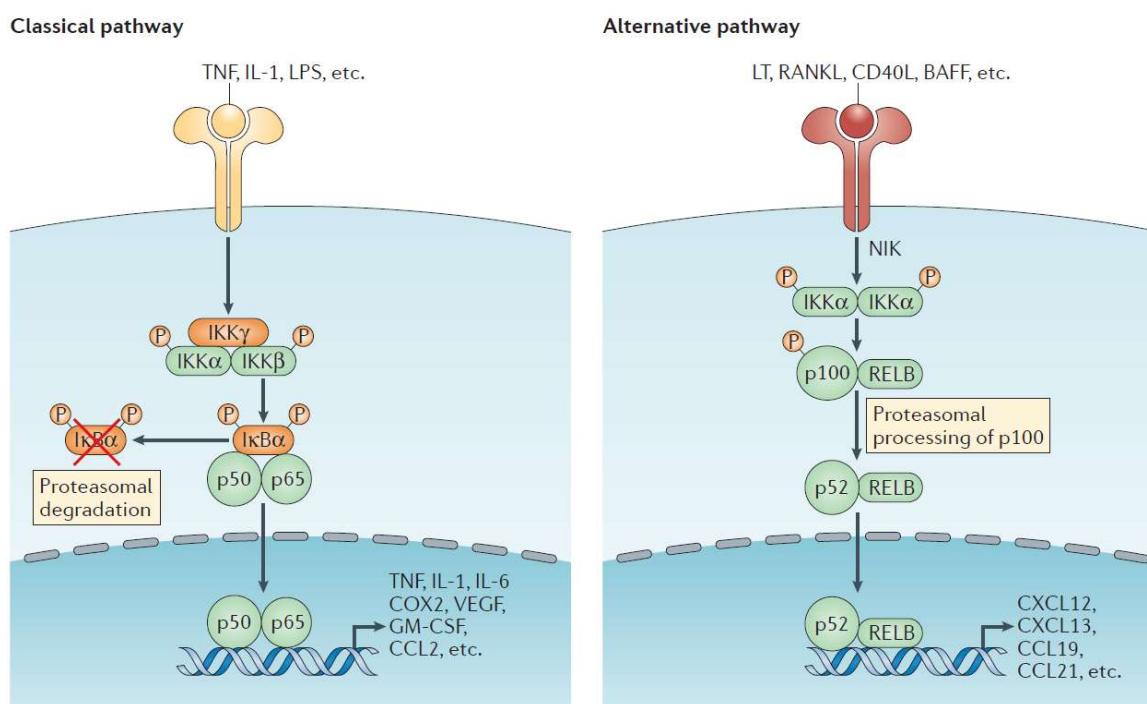


Figura 22. Via canònica i no canònica de NF- κ B. La via canònica s'activa amb lligands com TNF- α i IL-1 β que fosforilen el complex IKK que fosforila l'inhibidor I κ B alliberant els heterodímers p65-p50 que es transloquen al nucli i promouen la transcripció de gens implicats en inflamació, proliferació cel·lular i supervivència. La via no canònica s'activa amb lligands com CD40L i depèn de la síntesi de nou de NIK, que fosforila el complex IKK i es formen heterodímers RelB-p52, que promouen la transcripció gènica (Taniguchi and Karin, 2018).

La investigació realitzada en els darrers anys indica que el factor de transcripció NF- κ B pot tenir un paper clau en la fisiopatologia de la lesió miocàrdica en isquèmia-reperfusió, el preconditionament isquèmic, l'apoptosi, l'aterosclerosi, síndromes coronaris i la insuficiència cardíaca (Dhingra et al., 2019). Se sap que la senyalització de NF- κ B al cor participa en la hipertrofia, confereix cardioprotecció en isquèmia i citotoxicitat promoguda per una resposta inflamatòria prolongada. Aquests processos depenen del context cel·lular i del moment d'activació, així com el temps i la

durada de l'activació. Senyals hipertròfics promouen la degradació de I κ B així com la translocació nuclear de NF- κ B i la seva activitat transcripcional. S'ha demostrat que la inhibició farmacològica de l'activitat IKK β inhibeix l'activació de NF- κ B lligada a la hipertròfia cardíaca, la producció de citocines, estrès oxidatiu i remodelació cardíaca (Valen et al., 2001). La mort cel·lular per isquèmia i els defectes mitocondrials es poden inhibir mitjançant l'expressió forçada d'IKK β en cardiomiòcits promovent la supervivència a través de la inhibició de l'expressió de BNIP3 (Gordon et al., 2011). A més, l'activació crònica de NF- κ B dona lloc a un estat inflamatori prolongat que indueix apoptosi i una progressió cap a una insuficiència cardíaca. No obstant, l'activació primerenca de NF- κ B després d'una lesió aguda de miocardi pot ser un mecanisme adaptatiu important per prevenir l'apoptosi i preservar el nombre de cardiomiòcits (Hall et al., 2006; Dhingra et al., 2019).

La variabilitat de les funcions de NF- κ B es deu a la seva interacció amb altres factors de transcripció i proteïnes de senyalització, com Stat3 i Nrf2, factors reguladors de l'interferó (IRFs, *Interferon Regulatory Factors*), GSK-3 β , mTOR, Erk1/2, Jnk, Mapk, PI3K-Akt, entre altres.

Els factors de transcripció NF- κ B i Stat3 controlen nombrosos processos fisiològics incloent desenvolupament, diferenciació, immunitat, metabolisme cel·lular i càncer. Tant NF- κ B com Stat3 s'activen ràpidament en resposta a diversos estímuls incloent estressos i citocines, encara que estan regulats per mecanismes de senyalització completament diferents. En molts tipus cel·lulars regulen de forma cooperativa l'expressió de proteïnes implicades en la proliferació cel·lular (com la ciclina D1) i anti-apoptòtiques (com Bcl-2 i Bcl-X_L) (Grivennikov and Karin, 2010; Taniguchi and Karin, 2018).

3.6.2 Via cGAS-STING

La via cGAS-STING, inicialment descrita al sistema immunitari, és induïda per la presència d'ADN al citoplasma cel·lular, activant l'expressió de gens que indueixen inflamació i eliminació d'ADN no propi (Motwani et al., 2019). Més recentment, s'ha descrit la seva implicació en processos cel·lulars activats per estrès mitocondrial que impliquen la sortida d'ADN mitocondrial (Rongvaux et al., 2014; Riley and Tait, 2020).

Patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) són detectats pels receptors de reconeixement de patrons (PRR; *Pattern Recognition Receptors*), com per exemple els receptors *Toll-like* (TLRs). Els PRRs activen diverses vies de senyalització per l'activació de varis interferons de tipus 1 (IFN1) i citocines i quimiocines inflamatòries. Addicionalment, patrons moleculars associats a danys (DAMPs) són desencadenants immunes, com ara proteïnes i ADN que activen vies immunes innates, com la via de senyalització cGAS-STING.

La sintasa cíclica GMP-AMP (cGAS; *Cycling GMP-AMP synthase*) és un PRR que s'uneix a l'ADN de doble cadena per formar un dímer, i experimenta un canvi conformacional que facilita la conversió d'ATP i GTP en GMP-AMP cíclic (cGAMP). cGAMP funciona com un segon missatger que s'uneix a

l'adaptador de membrana de l'ER STING (*ER-resident protein stimulator of interferon genes*) induint un canvi conformacional que resulta en l'activació de STING. STING recluta i activa la quinasa que uneix TANK (TBK1; *TANK-binding kinase 1*), que al seu torn fosforila el factor de transcripció 3 regulador d'interferó (IRF3; *Interferon Regulatory Factor 3*). IRF3 fosforila, dimeritza i entra al nucli induint la transcripció de gens estimulats per interferó (ISGs; *Interferon-Stimulated Genes*), entre els que destaca Isg15 (Motwani et al., 2019; Riley and Tait, 2020).

Isg15 també pot ser activat per la via d'interferó de tipus I, en el qual la seva activació provoca la interacció del factor regulador d'interferó 9 (IRF9) amb STAT1 i STAT2 formant el complex ISGF3 (*Interferon-Stimulated gene factor 3*), que reconeix els promotors d'elements de resposta sensible a interferó (ISRE) d'Isg15 i els enzims de conjugació per induir la seva expressió (Figura 23) (Perng and Lenschow, 2018). El gen Isg15 codifica per una petita proteïna similar a la ubiquïtina implicada en un procés de modificació post-traducciona anomenat ISGilació (*ISGylation*). Mitjançant aquest procés, Isg15 s'uneix de manera covalent a una àmplia gamma de proteïnes. Isg15 existeix en dos estats, com una molècula lliure (intra o extracel·lular) o conjugada a proteïnes diana. La ISGilació és el resultat de la coordinació de tres activitats enzimàtiques: activació, conjugació i lligació, i es considera que les dianes de la ISGilació són proteïnes que s'estan traduint. No obstant, la ISGilació és una modificació reversible, de manera que Isg15 pot ser eliminat de les proteïnes conjugades mitjançant la proteasa específica d'ISG15, USP18 (Albert et al., 2018; Riley and Tait, 2020).

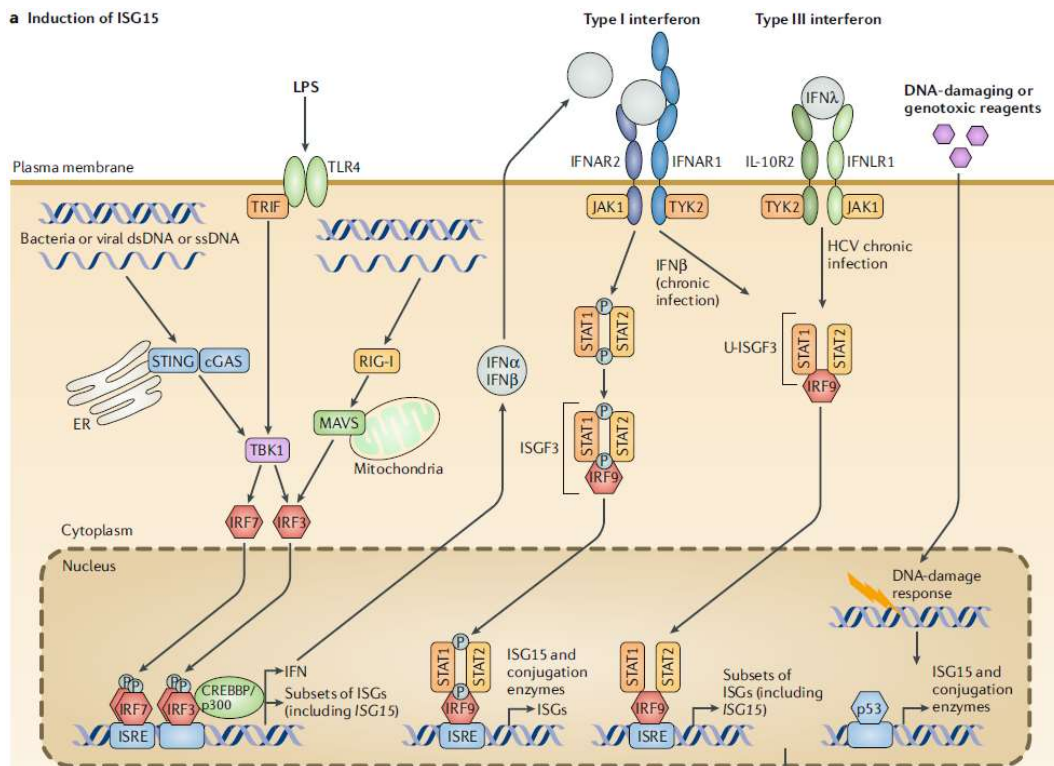


Figura 23. Via d'activació d'Isg15. L'activació de l'interferó de tipus I, provoca la interacció del factor regulador d'interferó (IRF9) amb STAT1 i STAT2 formant el complex ISGF3 (*Interferon-Stimulated gene factor 3*), que reconeix els promotors d'elements de resposta sensible a interferó (ISRE) d'Isg15 i els enzims de conjugació per induir la seva expressió. Durant una infecció vírica, o estímuls addicionals com lipopolisacàrids, ADN o ARN forani i agents nocius d'ADN també indueixen l'expressió d'Isg15 (Perng and Lenschow, 2018).

STING també activa el complex quinasa IKK de la via NF- κ B, que fosforila l'inhibidor I κ B inactivant-lo i permetent l'alliberament i entrada a nucli de NF- κ B, on juntament amb IRF3 i altres factors de transcripció s'indueix l'expressió d'interferons i citocines inflamatòries com TNF, IL-1 β i IL-6 (Figura 24) (Chen et al., 2016; Motwani et al., 2019).

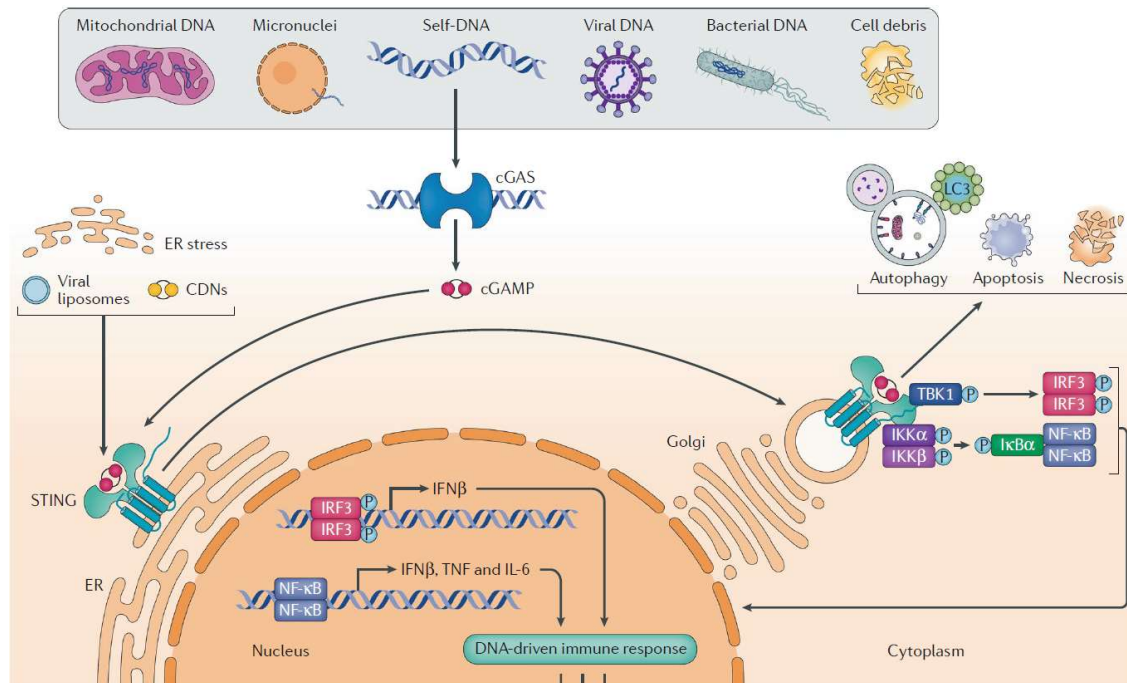


Figura 24. Via cGAS-STING. La via de detecció d'ADN citosòlic cGAS-STING està implicada en diversos processos biològics. L'ADN citosòlic pot provenir de diverses fonts, com ADNmit o ADN viral o bacterià. La unió d'ADN activa cGAS per generar el segon missatger cíclic GMP-AMP (cGAMP), que s'uneix a la proteïna STING localitzada al reticle endoplasmàtic. STING es transloca al Golgi, on recluta quineses com TBK1 i IKK, que fosforilen al factor regulador d'interferó 3 (IRF3) i l'inhibidor de NF- κ B I κ B α . IRF3 fosforilat es dimeritza i es transloca al nucli per activar la transcripció de gens d'interferó de tipus 1 com IFN β . La fosforilació d'I κ B α es tradueix en la translocació de NF- κ B al nucli, on activa la transcripció de gens que codifiquen per citocines inflamatòries com IL-6 i TNF. La senyalització STING també activa altres processos cel·lulars com l'autofàgia, l'apoptosi i la necrosi (Motwani et al., 2019).

L'ADNmit es troba a la matriu mitocondrial i per la proximitat amb la cadena de transport electrònic és particularment vulnerable a l'oxidació patint mutacions. Actualment se sap que l'ADNmit s'organitza en nucleoids, que consten d'una o varies còpies d'ADNmit i una sèrie de proteïnes diferents que l'envolten. Es coneix que diferents situacions de dany cel·lular comporten la sortida d'ADNmit al citoplasma i això es troba relacionat amb processos de mort cel·lular programada, com s'ha revisat en aquesta introducció. En la darrera dècada s'ha descobert la implicació de la via cGAS-STING activada per la presència d'ADNmit en la resposta cel·lular a diversos tipus d'estrès mitocondrial en cèl·lules que no pertanyen al sistema immunitari. En particular, la sortida massiva d'ADNmit durant el procés apoptòtic activa la via cGAS-STING promovent l'expressió d'ISG15 de forma depenent d'IFN en situacions on no hi ha, o s'han inhibit les caspases (Rongvaux et al., 2014). A més, la disminució en la replicació i contingut de l'ADNmit o la seva oxidació també s'han associat a l'activació d'aquesta via en determinats models cel·lulars com els fibroblasts embrionals de ratolí i associat a diverses patologies com infeccions virals i el lupus (West et al., 2015; Kim et al., 2019).

 Hypothesis i Objecting

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Els fibroblasts cardíacs tenen major capacitat de resistir períodes d'isquèmia comparats amb altres tipus de fibroblasts. Dades prèvies del nostre grup mostren que els fibroblasts cardíacs de rata expressen més Bcl-2, una proteïna amb funcions protectores al mitocondri que també es troba involucrada en la biologia del reticle endoplasmàtic, i que Bcl-2 és important per evitar la mort per apoptosi dels fibroblasts cardíacs en situacions d'estrès cel·lular. En el present treball volíem caracteritzar millor la biologia dels fibroblasts cardíacs i, en especial, identificar els trets bioquímics i moleculars associats a la seva capacitat de resistència a la mort cel·lular.

➤ Hipòtesi inicial

La nostra hipòtesi de partida era que els fibroblasts cardíacs, gràcies a la major supervivència conferida per Bcl-2, activen el procés de reciclatge d'òrgànuls anomenat autofàgia durant la isquèmia, permetent així mantenir la seva supervivència.

➤ Objectiu inicial

L'objectiu que ens vam plantejar inicialment per respondre la hipòtesi va ser identificar possibles diferències entre fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics en l'expressió dels principals reguladors de la via d'autofàgia en condicions normals i durant la isquèmia, així com determinar l'impacte de la inhibició de Bcl-2 sobre la supervivència i seva rellevància en aquest esdeveniment.

L'execució experimental de l'objectiu inicial va descartar la rellevància de l'autofàgia per la supervivència durant la isquèmia, però va permetre descobrir alguns trets moleculars i bioquímics diferencials als fibroblasts cardíacs que estan relacionats amb supervivència, el què ens va fer elaborar la hipòtesi següent:

➤ Hipòtesi secundària

Els fibroblasts cardíacs presenten unes adaptacions moleculars basals relacionades amb la funció mitocondrial, que en altres cèl·lules són induïbles per estrès, que els confereixen avantatge per sobreviure a la isquèmia.

➤ Objectius

1. Determinar possibles diferències en la generació i metabolisme dels radicals lliures d'oxigen en fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics.
2. Identificar diferències en el funcionament, característiques moleculars i organització dels mitocondris als fibroblasts cardíacs en relació als pulmonars i dèrmics.

3. Determinar si els fibroblasts cardíacs presenten també avantatge de supervivència a estrès de reticle endoplasmàtic, ja que s'ha vinculat amb mediadors moleculars comuns amb la biologia mitocondrial.

4. Identificar la/les vies de transducció de senyals implicada/es en la regulació dels mecanismes de resistència dels fibroblasts cardíacs a estrès cel·lular.

 Material & métodos

MATERIALS I MÈTODES

1. Animals d'experimentació

1.1 Consideracions prèvies

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

- » Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.
- » Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- » Real Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.
- » Directiva ECC 63/2010, de 22 de setembre, del Parlament Europeu, sobre la protecció dels animals utilitzats per a fins científics.

Tots els procediments exposats en els que s'han utilitzat rates, s'han realitzat sota la supervisió del personal pertinent de la nostra institució, respectant totes les disposicions legals i ètiques vigents per a la manipulació d'animals d'experimentació. A més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

Les rates han estat allotjades en instal·lacions de barrera, seguint procediments lliures de patògens en les sales de treball. Els animals s'han mantingut amb cicles de 12 hores de llum/fosc, a una temperatura constant de 18-22°C, humitat del 30-70% i accés *ad libitum* a aigua i menjar (Irradiat Teklad Global 14% dieta proteínica de rosegadors, Harlan). Les cries de rata utilitzades pel cultiu primari de fibroblasts neonatals procedeixen de rates Sprague-Dawley, allotjades en sales convencionals.

2. Tècniques de Biologia Cel·lular

2.1 Cultius cel·lulars

2.1.1 Cultiu primari i manteniment de fibroblasts neonatals de rata

Els fibroblasts neonatals de rata s'obtenen a partir de cries de rata Sprague-Dawley d'entre 2 i 3 dies d'edat per obtenir un bon rendiment en l'obtenció de fibroblasts. Els fibroblasts d'interès són els fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics i es mantenen en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 4,5 gr/L de glucosa (Gibco #41965) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS; Gibco #10270) (prèviament inactivat a 56°C durant 30 minuts), 1 mM de piruvat sòdic (Gibco #11360), 1% d'aminoàcids no essencials 100x (NEAA; Gibco #11140), 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomina (P/S; Gibco #15140).

Pel cultiu primari de fibroblasts cardíacs, s'extreuen els cors asèpticament i es deixen en una placa de petri model p100 amb una solució salina glucosada tamponada prèviament preparada (ADS 1x) a partir d'una solució mare d'ADS 10x (NaCl 6.8 g, Na₂HPO₄·2H₂O 120 mg, KCl 400 mg, MgSO₄·7H₂O 197 mg, Glucosa 1 g, Hepes 4.8 g fins a 100 ml d'aigua, pH 7.4). Es pressionen suaument els cors per a que expulsin la sang del lumen i es treuen les aurícules per reduir la contaminació del cultiu amb musculatura llisa. Seguidament es fan talls longitudinals als ventricles per tal d'afavorir el procés de digestió i es transfereixen 4 cors per tub de tipus eppendorf amb 1 ml de solució de digestió preescalfada (20 µl de col·lagenasa de tipus II de Worthington (10 U/ml, #LS004174) amb 1 ml d'ADS 1x escalfat a 37°C) i s'incuben durant 15 minuts a 37°C amb una agitació de 1000 rpm. El sobrenedant es transfereix a un tub de centrifuga estèril amb tap que conté medi per tal de neutralitzar la col·lagenasa. Al tub eppendorf s'afegeix de nou 1 ml de solució de digestió i es repeteix el procés de digestió fins a 3 vegades per assegurar que tot el teixit estigui digerit. Una vegada finalitzades les digestions, es centrifuga el tub de centrifuga durant 5 minuts a 800 rpm i es suspèn el pellet amb 1 ml de medi que es sembra en una placa p100. Aquesta placa s'incuba durant 45 minuts a 37°C, 5% de CO₂. Durant aquest temps, els fibroblasts cardíacs i les cèl·lules endotelials es quedaran adherits a la placa mentre que els cardiomiòcits quedaran suspesos degut a la manca del substrat adient per adherir-se. Transcorreguts els 45 minuts es descarta el sobrenedant i s'afegeix medi nou a la placa.

Pel cultiu primari de fibroblasts pulmonars, s'extreuen els pulmons, es netegen amb solució ADS 1x i es trossegueu en bocins petits per afavorir la digestió. Pels fibroblasts dèrmics es neteja i es desinfecta la zona d'incisió (pell de l'esquena) amb etanol al 70%, s'extreu la pell, es neteja amb solució ADS 1x i es trosseja en bocins petits per afavorir la digestió. Seguidament, es transfereixen dos pulmons/pell per tub eppendorf amb 1 ml de solució de digestió preescalfada (20 µl de col·lagenasa de tipus II de Worthington (10 U/ml) amb 1 ml d'ADS 1x). A continuació s'incuba durant 45 minuts a 37°C i a 1000 rpm. Transcorreguts els 45 minuts, es transfereix el sobrenedant a un tub de centrifuga estèril amb medi per neutralitzar la col·lagenasa. Als tubs eppendorfs s'afegeix de nou 1 ml de solució de digestió i es repeteix el procés de digestió fins a 3 vegades per assegurar que el teixit estigui digerit. Una vegada finalitzades les digestions, es centrifuguen els tubs de centrifuga durant 3 minuts a 1000 rpm i es suspèn el pellet amb 1 ml de medi que es sembra en una placa p60. Al dia següent, si la placa no està confluent es fa un rentat amb PBS 1x per eliminar cèl·lules mortes i restes cel·lulars i s'afegeix medi nou. En el cas que estigui confluent, es passen les cèl·lules a una placa p100 i es deixa créixer fins arribar a la confluència (Figura 25).

Quan els cultius de fibroblasts estan confluents s'han de dividir pel manteniment de les cèl·lules *in vitro*. Breument, es fan dos rentats amb PBS 1x i s'incuben amb tripsina-EDTA (Gibco #25200) a 37°C durant 3 minuts. Quan les cèl·lules estan desenganxades es transfereixen a un tub estèril que conté medi per tal d'inactivar la tripsina. Es centrifuguen 3 minuts a 1000 rpm i s'elimina el

sobrenedant. El pellet es suspèn amb medi i es sembren en proporció de 4 plaques per cada placa p100 original (dilució 1/4).

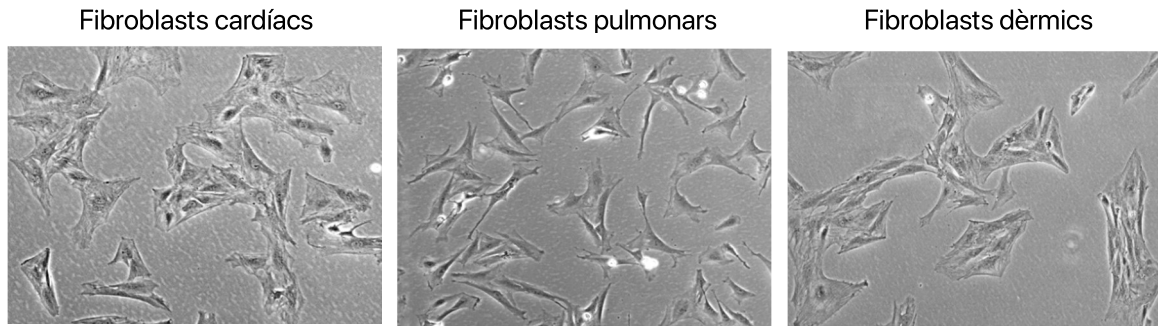


Figura 25. Imatges representatives en contrast de fase dels diferents tipus de fibroblasts primaris derivats de rates neonatals.

2.1.2 Manteniment de la línia cel·lular HEK 293T

La línia cel·lular humana de ronyó embrionari HEK293T és una variant de la línia cel·lular humana de l'epiteli renal 293 transformada amb l'adenovirus Ad5 i que expressa l'antigen T de SV40. És una línia cel·lular que creix molt ràpid i es transfecta fàcilment, essent un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars i extracel·lulars, secretades o de membrana. Les cèl·lules HEK293T creixen en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 4,5 gr/L de glucosa (Gibco #41965) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS; Gibco #10270) (prèviament inactivat a 56°C durant 30 minuts), 1 mM de piruvat sòdic (Gibco #11360), 1% d'aminoàcids no essencials 100x (NEAA; Gibco #11140), 100 U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomicina (P/S; Gibco #15140) a 37°C i en condicions d'elevada humitat i 5% CO₂.

El manteniment d'aquesta línia cel·lular es realitza dues vegades per setmana a una dilució 1/10. Breument, es fan dos rentats amb PBS 1x i s'incuben amb tripsina-EDTA a 37°C durant 3 minuts per tal de desenganxar les cèl·lules de la placa. Després es transfereixen a un tub de centrifuga que conté medi per inactivar la tripsina i es centrifuguen durant 3 minuts a 1000 rpm. Finalment es sembren en proporció de 10 plaques per cada placa p100 (dilució 1/10).

2.2 Tractaments i drogues utilitzades

Taula 1. Tractaments i drogues utilitzats en aquest treball.

<i>Droga</i>	<i>Proveïdor</i>	<i>Nº catàleg</i>	<i>Concentració</i>	<i>Diluent</i>
<i>Cloroquina</i>	Sigma-Aldrich	C6628	30 µM	H ₂ O
<i>3-Metil adenina</i>	Sigma-Aldrich	M9281	5 mM	H ₂ O
<i>3-Nitropropionat</i>	Sigma-Aldrich	N5636	300 µM	Etanol
<i>Silibinina</i>	Sigma-Aldrich	S0417	100 µM	DMSO
<i>Tyrphostin AG490</i>	Sigma-Aldrich	T3434	100 µM	DMSO

Per la condició d'isquèmia experimental es sembren els fibroblasts en solució Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, CaCl₂ 0.9 mM i MgCl₂ 0.5 mM) amb un pH inicial de 7.2, i s'incuben en la cambra d'hipòxia Whitley H35 Hypoxystation (Don Whitley Scientific) al 5% de CO₂ i 95% de N₂ a una concentració de 0.2% d'oxigen.

2.3 Recomptes cel·lulars

2.3.1 Recompte de viabilitat amb Blau Tripà

El reactiu Blau Tripà 0.4% (Gibco #15250) és un colorant vital que s'utilitza per a tenyir selectivament les cèl·lules mortes. Les cèl·lules vives es mantenen incolores degut a que tenen la membrana plasmàtica intacta i l'expulsen activament, mentre que les cèl·lules mortes es tenyeixen de color blau. El reactiu Blau Tripà s'utilitza a una concentració final del 0.1%.

Per tal de determinar la viabilitat cel·lular és important establir el número de cèl·lules abans d'iniciar els tractaments experimentals. Es sembren 250.000 fibroblasts per pou (placa multipou de 6 pous: M6) en duplicats, i transcorregudes 48 hores, es realitza el primer comptatge per tal d'establir el número de cèl·lules previ al tractament, que correspondrà al temps 0. En aquest moment, es tracten les cèl·lules segons correspongui i es compten les cèl·lules passades 24, 48 i 72 hores després del tractament. La viabilitat es calcula segons la fórmula= N° cèl·lules vives al temps final/N° cèl·lules vives al temps 0 i s'expressa en percentatge. Per a realitzar els comptatges, es renten les cèl·lules amb PBS 1x, es tripsinitzen i es centrifuguen 3 minuts a 1000 rpm. El pellet es suspèn en 200 µl de PBS 1x i finalment es fa la tinció amb el Blau tripà, afegint en un eppendorf 20 µl de PBS 1x, 10 µl de blau tripà i 10 µl de cèl·lules. D'aquests, s'omplirà per capilaritat la càmera de Neubauer i es comptarà al microscopi de contrast de fase.

2.4 Subfraccionament cel·lular

El subfraccionament cel·lular consisteix en la separació dels principals components de la cèl·lula, el nucli i el citosol, i s'utilitza per analitzar la localització específica d'una proteïna dins de la cèl·lula. Aquest protocol es basa en l'ús de tampons de lisi i extraccions proteiques específiques per cada fracció cel·lular que permeten enriquir la fracció d'interès.

2.4.1 Extracció de nucli

Per l'extracció de nuclis s'ha utilitzat el kit Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation de Sigma-Aldrich (#Nuc-101). El protocol seguit és el que descriu el distribuïdor. Breument, es parteix d'aproximadament 3×10^6 cèl·lules en plaques p100. Es fa un rentat amb PBS 1x fred, es lisa amb el tampó Nuclei EZ lysis buffer i es deixa 5 minuts en gel. Després es centrifuga 5 minuts a 500 g a 4°C i s'aspira el sobrenedant que conté el citoplasma. El pellet, fracció nuclear, es suspèn de nou en tampó de lisi i s'incuba 5 minuts en gel i es centrifuga 5 minuts a 500 g a 4°C. El pellet final es suspèn en tampó de

lisi de proteïna (100mM Tris HCl pH 6,8, 2% SDS) i es quantifica la mostra pel mètode de Lowry amb el kit Bio-Rad DC Protein Assay.

2.5 Producció de lentivirus en la línia cel·lular HEK293T

2.5.1 Transfecció amb polietilenamina (PEI) i producció de lentivirus

La majoria de membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, essent molt difícil que les molècules amb càrrega negativa puguin travessar-les. La polietilenamina (PEI) és un polímer catiònic sintètic que condensa l'ADN plasmídic neutralitzant les càrregues negatives i permetent la formació de complexos, els quals presenten una elevada afinitat per la majoria de membranes cel·lulars donant lloc a una alta efectivitat de transfecció (Florea et al., 2002).

Degut a la gran quantitat de partícules lentivirals necessàries per transduir els cultius és necessari partir de 4 plaques p100 a una densitat de $2,5 \times 10^6$ cèl·lules per placa. L'endemà de sembrar les cèl·lules, es canvia el medi per DMEM sense sèrum fetal boví ni antibiòtics. Es transfecten un total de 40 µg d'ADN, que corresponen als tres vectors plasmídic; 20 µg del plasmidi lentiviral d'interès, 13 µg del plasmidi empaquetador psPAX2 i 7 µg del plasmidi pM2G que codifica per proteïnes de l'embolcall víric. Per a cada µg d'ADN a transfectar es dilueixen 5 µl de PEI (10 µM; Sigma-Aldrich #408727) en 4 volums de solució estèril de NaCl 150 mM, per tant, es dilueixen 200 µl de PEI en 800 µl de NaCl 150 mM. L'ADN també es dilueix en NaCl 150 mM en un volum final d'un ml i un cop es tenen les dues barreges, la solució de PEI s'afegeix a la de l'ADN, es vorteja 1 minut i es deixa reposar a temperatura ambient durant 10 minuts per a que es formin els complexos de PEI i ADN. Finalment, s'afegeix la solució de transfecció gota a gota a cada placa p100 de HEK293T i es deixen a l'incubador. Transcorregudes 3 hores es canvia el medi de transfecció que conté els complexos per medi complet de HEK293T.

Al cap de 3 dies de la transfecció es recull el medi que conté el virus a la campana de seguretat biològica Biolla. El medi es centrifuga durant 10 minuts a 2500 rpm i seguidament es recupera el sobrenedant i es filtra a través d'un filtre de xeringa de 0,45 µm per eliminar qualsevol cèl·lula que pugui quedar al medi. Un cop filtrat es centrifuga a 50.000g durant 3 hores a 4°C. Finalment s'aspira el sobrenedant i es suspèn el pellet de lentivirus en una solució de PBS al 1% de sèrum fetal boví (FBS) i es congela a -80°C en alíquotes de treball fins la seva utilització.

2.5.2 Transducció dels cultius amb lentivirus

Un cop finalitzat el cultiu de fibroblasts de rata, es sembren en plaques de cultiu p35 a una densitat de 250.000 cèl·lules/placa i es transdueixen amb 15 µl de virus concentrats directament al medi de cultiu. Les cèl·lules es deixen en contacte amb els lentivirus durant unes 18 hores i seguidament es renova el medi per medi complet fresc. Els fibroblasts es mantenen durant 2-3 dies i després s'inicia el tractament o es processen per analitzar-los.

2.6 Immunofluorescència (IF)

La immunofluorescència (IF) és una tècnica que mitjançant la utilització d'anticossos específics conjugats amb fluorocroms permet identificar la localització cel·lular de les proteïnes d'interès.

Les cèl·lules es sembren a una densitat de 20.000 cèl·lules/pou en cobreobjectes de vidre col·locats en plaques de 24 pous (M24) prèviament esterilitzats amb etanol al 70%. Es deixa el temps necessari per adquirir la confluència desitjada del cultiu i després es duu a terme el tractament. Transcorregut el temps de tractament, es fixen les cèl·lules amb 4% de paraformaldehid (PFA) durant 20 minuts per mantenir intacta l'estructura cel·lular i la localització de les proteïnes. Seguidament es fan dos rentats amb PBS 1x i s'incuba amb solució de bloqueig (5% sèrum fetal boví (FBS), 5% d'albumina de sèrum boví (BSA), 0,1% Tritó X-100 en PBS 1x) durant 1 hora a temperatura ambient en agitació. Durant el bloqueig, el Tritó permeabilitza les membranes permetent l'accés dels anticossos als seus antígens i el sèrum bloqueja els llocs d'unió inespecífics.

Després s'incuba amb l'anticòs primari (Taula 2) diluït en solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C. L'endemà es fan dos rentats amb PBS 1x i s'incuba amb el corresponent anticòs secundari (Taula 2) junt amb les sals de bisbenzimidà Hoechst 33342 (1 µg/ml) diluïts en PBS 1x, durant 1 hora a 4°C. Per acabar es fan dos rentats amb PBS 1x i es munten els cobreobjectes sobre portaobjectes afegint prèviament 5 µl de Mowiol (Mowiol 4-88, glicerol 50%, 0.2M Tris-HCl pH 8.5). Les imatges s'obtenen amb el microscopi confocal Olympus FluoView™ FV1000.

Taula 2. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per la immunofluorescència. S'indica proveïdor, n° de catàleg i dilució.

<i>Anticòs</i>	<i>Dilució</i>	<i>Proveïdor</i>	<i>N° de catàleg</i>
<i>Lipoamida DH</i>	1: 250	Abcam	ab133551
<i>α-tubulina</i>	1: 1.000	Sigma-Aldrich	T5168
<i>Conill Alexa Fluor 488</i>	1: 500	Invitrogen	A11034
<i>Ratolí Alexa Fluor 594</i>	1: 500	Invitrogen	A11005

2.7 Anàlisi de la producció de ROS

La quantificació de les espècies reactives de l'oxigen es realitza mitjançant la sonda fluorescent MitoSOX™ Red (Invitrogen #M36008), l'oxidació de la qual genera un producte proporcional a la quantitat de l'espècie reactiva anió superòxid (O_2^-). Aquesta producció de ROS s'ha mesurat en els diferents tipus de fibroblasts en condicions de normòxia i condicions d'isquèmia.

La sonda MitoSOX™ Red s'utilitza per a determinar els nivells mitocondrials de l'espècie reactiva anió superòxid (O_2^-) analitzant la fluorescència per citometria de flux (excitació/emissió màxima a 510nm/580nm). Breument, els fibroblasts es tripsinitzen, es renten dues vegades amb PBS 1x i es compten manualment amb una càmera de Neubauer. Es suspèn el mateix número de fibroblasts de

cada tipus en PBS 1x, i s'afegeix MitoSOX™ Red a una concentració final de 2,5 µM en cada suspensió cel·lular. Les cèl·lules desenganxades s'incuben amb la sonda en tubs estèrils de 15 ml a 37°C, 5% CO₂ durant 10 minuts protegits de la llum. Després de la incubació es fan dos rentats amb PBS 1x, es suspenen les cèl·lules en 150 µl de PBS 1x i es transfereixen a tubs de poliestirè de fons arrodonit (Deltalab) adequats per al citòmetre. Es determina la fluorescència emesa a 580 nm després d'excitar a 510 nm mitjançant el citòmetre BD FACSCantoll (Becton Dickinson).

2.8 Anàlisi de la massa mitocondrial i el potencial de membrana mitocondrial

La quantificació de la massa mitocondrial es realitza mitjançant la sonda fluorescent MitoSpy™ Green FM (BioLegend® #424805), que és permeable i entra als mitocondris de forma independent al potencial de membrana. D'altra banda, la quantificació del potencial de membrana mitocondrial es realitza mitjançant la sonda fluorescent MitoProbe™ DilC1(5) (ThermoFisher Scientific, #M34151), que penetra a les cèl·lules i s'acumula als mitocondris en resposta al potencial de membrana. La fluorescència s'analitza per les dues sondes per citometria de flux (excitació/emissió màxima 490nm/516nm (MitoSpy™) i 638nm/658nm (MitoProbe™) amb el citòmetre BD FACSCantoll (Becton Dickinson).

Breument, els fibroblasts es tripsinitzen, es renten dues vegades amb PBS 1x i es compten manualment amb una càmera de Neubauer. Es suspèn el mateix nombre de fibroblasts de cada tipus en PBS 1x, i s'afegeix la sonda MitoSpy™ (a 250 nM) o MitoProbe™ (a 50 nM) en cada suspensió cel·lular. Les cèl·lules desenganxades s'incuben amb les sondes en tubs estèrils de 15 ml a 37°C, 5% CO₂ durant 30 minuts protegits de la llum. Després de la incubació es fan dos rentats amb PBS 1x, es suspenen les cèl·lules en 150 µl de PBS 1x i es transfereixen a tubs de poliestirè de fons arrodonit (Deltalab) adequats per al citòmetre.

2.9 Mesura de la respiració mitocondrial

El consum d'oxigen es mesura mitjançant l'equip de respirometria d'alta resolució Oxygraph-2k (Oroboros, Àustria) que permet mesurar la cinètica de consum de l'oxigen en pressions parcials baixes d'oxigen (Gnaiger et al., 1995). L'oxigen que es troba dins la cambra es difon a través d'una membrana de tefló i posteriorment es redueix a l'entrar en contacte amb un elèctrode de platí polaritzat a 0,8V, generant un corrent elèctric que detecta l'equip.

Abans d'iniciar l'anàlisi de la respiració mitocondrial, les cambres es renten acuradament per evitar contaminacions; primer amb etanol al 100%, a continuació amb etanol al 70% i finalment es fan tres rentats amb aigua abans d'afegir el medi DMEM per calibrar el respiròmetre. El medi DMEM ha d'estar prèviament escalfat i les mesures es fan amb agitació suau (400 rpm). Un cop afegit el DMEM, es tanquen les cambres per eliminar l'excés de medi i d'oxigen i posteriorment s'obren fins deixar una única bombolla d'aire que permet el flux d'oxigen cap a l'interior i estabilitzar les mesures.

Un cop s'estabilitza la senyal, es pot iniciar l'experiment afegint els fibroblasts a les cambres del respiròmetre. La taxa de consum d'oxigen (OCR; *Oxygen Consumption Rate*) es monitoritza a 37°C i s'expressa en pMols d'oxigen/segons*milió de cèl·lules. El número de fibroblasts en tots els anàlisis és de 400.000 fibroblasts/ml.

En primer lloc es mesura la respiració basal de les cèl·lules (R) amb les cambres tancades. La respiració basal o de rutina es monitoritza durant almenys 15 minuts o fins que la senyal s'estabilitza.

A continuació s'afegeix Oligomicina (2,5µM; *Oligomycin from Streptomyces diastatochromogenes*, Sigma #O4876), que inhibeix l'ATP sintasa (complex V) per tal de mesurar el consum d'oxigen desacoblat de la producció d'ATP, la fuga de protons (proton LEAK (L)). Després es fan addicions seriadades de FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, Sigma #C2920) (0.5 µM per addició) que és un desacoblant del gradient de protons generat per l'activitat de la cadena de transport d'electrons que permet determinar la capacitat de respiració (teòrica) màxima (E), i finalment s'afegeix Antimicina A (2,5 µM; *Antimycin A from Streptomyces sp.*, Sigma #A8674) que és un inhibidor del complex III i s'utilitza per a determinar el consum d'oxigen residual (ROX) en condicions en les que la cadena de transport d'electrons és inactiva (Connolly et al., 2018) (Figura 26).

Per analitzar els resultats obtinguts amb l'anàlisi de la respiració mitocondrial, tots els estats respiratoris (R, L i E) es corregeixen per ROX, i prèviament totes les mesures es corregeixen pel consum d'oxigen en absència de cèl·lules en el medi, ja que no sempre és igual a 0.

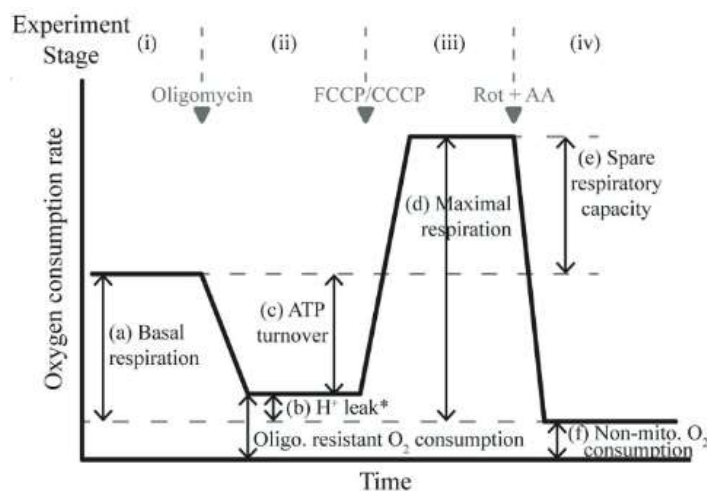


Figura 26. Esquema del protocol experimental per l'anàlisi de la respiració mitocondrial (Connolly et al., 2018).

2.10 Quantificació dels nivells de succinat

La quantificació dels nivells de succinat es realitza amb el kit Succinate Assay Kit Colorimetric d'Abcam. Es necessiten aproximadament 1 milió de cèl·lules, per això, prèviament es sembren els

fibroblasts en plaques. Un cop estan confluents, es tripsinitzen i es compten per tenir el mateix número de cèl·lules en totes les condicions a analitzar. Seguidament es fan dos rentats amb PBS 1x fred, es centrifuga a 1.000 rpm durant 3 minuts i es suspèn el pellet amb 100 µl de tampó del kit. S'homogeneïza amb la pipeta i es centrifuga a 14.000 rpm durant 5 minuts a 4°C. Es recull el sobrenedant i es filtra amb les columnes 10 kDa d'Abcam i es guarda en gel. Una vegada tenim les mostres preparades, es realitza una recta patró amb concentracions conegudes de succinat per poder interpolar l'absorbància de les mostres. Degut a que és possible que les mostres generin "soroll" (*background*), en paral·lel es prepara un mix en el que no s'afegeix el convertidor de succinat i donarà els valors de soroll de fons els quals s'hauran de restar a la mostra (en el cas que n'hi hagi). Una vegada preparats els mix de reacció i de soroll de fons, s'afegeix 50 µl a cada pou i es deixa durant 30 minuts a 37°C protegit de la llum, i finalment es llegeix la placa a una absorbància de 450nm a l'espectrofotòmetre Epoch (Biotek Instruments).

3. Tècniques de Bioquímica i Biologia Molecular

3.1 Construccions plasmídiques per al silenciament gènic

En enginyeria genètica, es considera un vector a una molècula d'ADN que s'utilitza per introduir una seqüència d'ADN en una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà o expressarà. Generalment es tracta d'un plasmidi, que són molècules d'ADN circular extracromosòmic que es troben en bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i poden haver-hi múltiples còpies del plasmidi en una mateixa cèl·lula bacteriana.

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

3.1.1 Interferència d'ARN

La interferència d'ARN (ARNi) és una tècnica que permet reprimir l'expressió gènica d'una seqüència específica. El mecanisme d'interferència d'ARN es basa en la degradació específica de l'ARN missatger (ARNm) diana mitjançant una via enzimàtica endògena que involucra el complex inductor del silenciament de l'ARN (RISC, *RNA-induced silencing complex*).

Els ARNs de doble cadena (dsARNs, *double stranded RNAs*) són reconeguts i tallats per l'enzim Dicer que genera siRNAs (*small interfering RNAs*) que són fragments d'ARN bicatenari d'entre 21 i 23 nucleòtids amb 2 nucleòtids desaparellats en cada extrem 3'. Una de les cadenes del siRNA (cadena

guia) s'incorpora al complex RISC i aquest localitza la cadena guia a l'ARNm complementari i la talla. L'ARNm és degradat per altres nucleases endògenes truncant així la traducció de l'ARNm (Wittrup and Lieberman, 2015). Un dels mètodes d'interferència d'ARN són els shRNAs (*small hairpin RNAs*), que són dsARNs que contenen una seqüència de 19-21 nucleòtids homòloga a la seqüència del gen que es vol silenciar seguida d'uns nucleòtids que generaran la forquilla ("hairpin") i una seqüència reversa complementària a l'anterior (Figura 27).

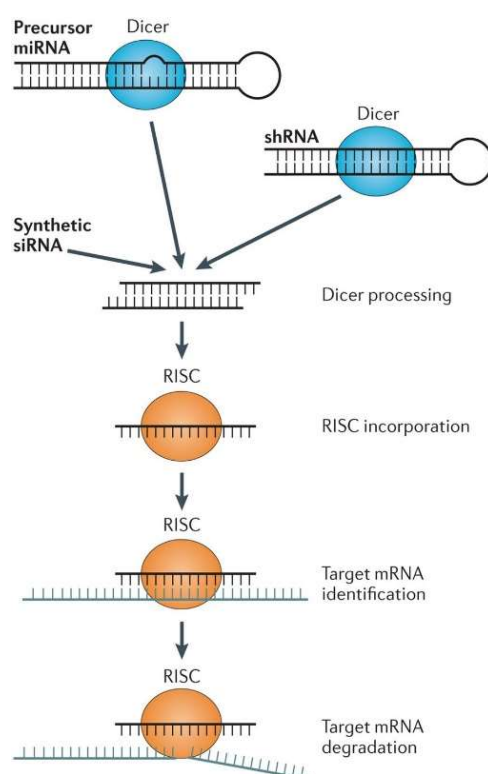


Figura 27. Mecanisme d'interferència d'ARN pel silenciament de l'expressió gènica.

3.1.2 Construccions de shRNA

Taula 3. shRNAs utilitzats en el nostre estudi.

<i>Vector</i>	<i>Gen</i>	<i>Codi</i>	<i>Casa Comercial</i>
<i>PLK 0.1 puro</i>	<i>Scrambled</i>	TRCN0000000001	Sigma-Aldrich
<i>PLK 0.1 puro</i>	<i>Atg7</i>	TRCN0000305991 TRCN0000375444	Sigma-Aldrich
<i>PLK 0.1 puro</i>	<i>BNIP3</i>	TRCN0000009690 TRCN0000009691	Sigma-Aldrich
<i>PLK 0.1 puro</i>	<i>Bcl-2</i>	TRCN0000004679 TRCN0000004680 TRCN0000006261	Sigma-Aldrich

3.2 Amplificació en cadena de la polimerasa

3.2.1 Extracció d'ARN

L'extracció d'ARN dels cultius cel·lulars es fa utilitzant el kit comercial *RNeasy® mini kit* (Qiagen) acoblat a la digestió amb DNasa I, que permet eliminar tot l'ADN genòmic contaminant que pugui quedar a la mostra i que donaria una senyal falsa. Un cop extret l'ARN, es quantifica al Nanodrop (ND-1000 UV/Vis Spectrofotometer, Nanodrop Technologies) i mitjançant un gel d'agarosa al 1% es comprova que no estigui degradat. Finalment els extractes d'ARN es guarden al congelador a -80°C.

3.2.2 Síntesi de cDNA

La reacció de transcripció reversa es realitza per a la obtenció d'ADN complementari (cDNA) segons el protocol de l'enzim transcriptasa reversa de Taqman (Applied Biosystems) a partir d'1 µg d'ARN. La reacció conté dNTPs, MgCl₂, hexàmers, inhibidors de RNases i la transcriptasa reversa en les proporcions indicades pel fabricant. Breument, s'incuben les mostres d'ARN 2 minuts a 90°C i tot seguit s'afegeix la mescla de reacció i s'inicia el programa de transcripció reversa: 10 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 5 minuts a 95°C. El producte final de la reacció es pot utilitzar per una PCR convencional o bé per una PCR en temps real (RT-PCR).

3.2.3 PCR en temps real (RT-PCR)

La tècnica de PCR en temps real (RT-PCR) utilitza una sonda específica per a analitzar l'expressió relativa d'ARNm de cada gen d'interès. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom, FAM™, que el termociclador CFX96™ de Bio-Rad detecta i quantifica. Tant les sondes com la mix de la reacció, Taqman PCR Mastermix Universal, són d'Applied Biosystems, i s'utilitzen en les proporcions indicades pel fabricant.

El programa que s'utilitza és el següent:

x40 cicles			
50°C	95°C	95°C	60°C
2 min	10 min	15 sec	1 min

Els resultats s'obtenen en forma de Ct (*Cycle threshold*), que és el cicle de PCR on comença el creixement exponencial del producte de la PCR. Per tant, com més cDNA del gen hi hagi en la mostra de partida, més baix serà el Ct. La quantitat relativa d'ARNm de cada gen es calcula de la següent manera: $\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen GAPDH (control)}$

i respecte la mostra control: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ mostra control} - \Delta Ct \text{ mostra}$

A partir d'aquests càlculs la concentració relativa de l'ARNm respecte al control és $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. De cada mostra se'n fan tres rèpliques de les quals es calcula la mitjana i errors estàndard. Els gens analitzats i la referència de cada sonda es troben a la Taula 4.

Taula 4. Sondes utilitzades per l'anàlisi en la RT-PCR.

<i>Gen</i>	<i>Codi</i>
<i>GAPDH</i>	Rn01775763_g1
<i>Nrf-2</i>	Rn00582415_m1
<i>Isg15</i>	Rn01519614_m1

3.3 Immunodetecció de proteïnes

3.3.1 Western blot

El Western Blot és una tècnica que s'utilitza per la immunodetecció de proteïnes en una mostra determinada i consisteix en la separació per pes molecular de les proteïnes mitjançant una electroforesi en gels d'acrilamida, una posterior transferència a membranes de PVDF (Immobilon-P; Millipore) i finalment la detecció amb anticossos específics contra les proteïnes d'interès.

3.3.1.1 Extracció de proteïna total

L'extracció proteica es basa en el trencament d'interaccions entre les proteïnes permetent l'alliberament de proteïnes unides a estructures macromoleculares. El tampó d'extracció conté Tris-HCl 125 mM (pH 6.8) i 2% de detergent SDS (*Sodium dodecyl sulfate*), el qual desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims, incloses les proteases que podrien danyar l'extracte.

Primer de tot es fan dos rentats amb PBS 1x un cop aspirat el medi per eliminar les restes que hagin pogut quedar i després s'afegeix el tampó d'extracció. L'extracció ha de ser ràpida per tal d'evitar degradacions i que l'extracte representi l'estat fisiològic de la cèl·lula viva. A continuació es soniquen les mostres durant 30 segons en gel (Branson 450 Digital Sonifier, Marshall Scientific) per fragmentar l'ADN i eliminar la viscositat de la mostra. En aquest punt es pot seguir amb el protocol o bé congelar les mostres.

3.3.1.2 Quantificació de proteïnes pel mètode de Lowry

La quantificació de proteïnes és necessària abans de migrar les mostres en gels SDS-PAGE per poder carregar la mateixa quantitat de proteïna per cada mostra i per tant, poder interpretar correctament els resultats, ja que d'aquesta manera, les diferències no es deuran a la càrrega.

Per determinar la quantitat de proteïna en una mostra s'utilitza el mètode de Lowry mitjançant el kit Bio-Rad DC Protein Assay de Bio-Rad Laboratories (#500-0116). Primer es realitza una recta patró

amb concentracions conegudes de BSA (albúmina de sèrum boví) per després poder interpolar l'absorbància de les mostres. A continuació afegirem les diferents mostres. Tant la recta patró com les mostres s'afegeixen per duplicat, en una placa de 96 pous (M96). Tot seguit es barregen els reactius A (tartrat de coure alcalí) i S (en proporció 50:1), i s'afegeix la barreja als pous amb les mostres (25 µL a cada pou). A continuació s'hi afegeix el reactiu de Folin (reactiu B, 200 µL per pou), es deixa produir la reacció colorimètrica durant 5 minuts i després es llegeix la placa a una absorbància de 620 nm amb l'espectrofotòmetre Epoch (Biotek Instruments).

3.3.1.3 Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Els gels desnaturalitzants de poliactilamida amb SDS s'utilitzen per separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (Amresco), que és una solució al 39% d'acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0.1% de TEMED (Sigma-Aldrich, #T9281) com a iniciador de la reacció i persulfat amònic (PSA, Sigma-Aldrich #A7460) al 0.05% com a catalitzador.

S'utilitzen gels discontinus, és a dir, formats per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents; el gel apilador a la part superior i el gel de resolució a la part inferior. El gel apilador és on es carreguen les mostres i té un percentatge d'acrilamida baix (5%) que es prepara en tampó Tris-HCl 125 mM a pH 6.8, i serveix per sincronitzar l'entrada de les proteïnes al gel de resolució. El gel de resolució es prepara en tampó Tris-HCl 375 mM a pH 8.8 i el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que volem separar, i és el que realment separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Per proteïnes de baix pes molecular s'utilitzen gels amb un percentatge superior d'acrilamida que l'utilitzat per a separar proteïnes d'alt pes molecular. Primer es polimeritza el gel de resolució en la part inferior, i una vegada polimeritzat, es prepara el gel apilador on s'afegeix una pinta per tal de fer els pous per carregar les mostres.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 370 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% β-mercaptoetanol, 50% glicerol i blau de bromofenol), s'ajusten les mostres a un mateix volum final amb tampó de càrrega 1x i es carreguen al gel. En un dels pous es carrega un marcador de pesos moleculars pretenyit (Fisher Scientific) per a poder referenciar les bandes. L'electroforesi es migra a un amperatge constant de 20 mA i quan les mostres entren al gel de resolució es puja a 25 mA. El gel es migra en el tampó de migració (glicina 110 mM, Tris 24 mM, SDS 0.1%) en el sistema HoeferSE260 (Amersham Biosciences).

3.3.1.4 Transferència de proteïnes

La transferència de proteïnes es fa en un sistema de transferència semisec. Primer, cal hidratar la membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) en metanol 100% durant 10 minuts, rentar-la en H₂O i després cal submergir-la en tampó de transferència (48 mM Tris, 0.0375% SDS, 39 mM glicina i

20% metanol), en el qual també s'ha de submergir el paper de transferència i el gel per tal d'equilibrar-los durant uns 15 minuts. Un cop equilibrats es pot començar la transferència; es col·loquen dos papers de transferència sobre l'ànode, a sobre es posa la membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida i dos papers de transferència més. Cal assegurar-se que no quedin bombolles entre el gel i la membrana. Finalment es posa la tapa (càtode) i s'inicia la transferència a un amperatge constant 0,8 mA per cm² de membrana durant 1 hora en el sistema Hoefer TE70XP (Amersham Biosciences).

3.3.1.5 Immunodetecció de proteïnes

Un cop finalitzada la transferència proteica, la membrana es posa en solució Ponceau que és capaç de tenyir les proteïnes transferides a la membrana d'una forma reversible i permet tenir una idea de la càrrega proteica i com ha anat la transferència. A continuació, es renta en TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) i tot seguit es bloqueja en solució de bloqueig (TBS-T amb 5% de llet desnatada en pols) durant 1 hora a temperatura ambient. El bloqueig permet la unió als llocs que han quedat lliures amb la transferència i evitar unions inespecífiques de l'anticòs. Després del bloqueig es fan tres rentats de 10 minuts en TBS-T i s'incuba amb una dilució en TBS-T de l'anticòs primari (Taula 5) amb 0.02% d'Azida sòdica per evitar contaminació bacteriana. La incubació s'acostuma a deixar durant tota la nit a 4°C.

Després de la incubació, la solució de l'anticòs es recupera i es guarda a 4°C per a poder ser reutilitzada. A la membrana es fan tres rentats de 10 minuts en TBS-T, i després s'incuba 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari (Taula 6), que es dilueix en solució de bloqueig. Passat aquest temps es fan tres rentats de 10 minuts en TBS-T.

Taula 5. Anticòsos primaris utilitzats per al Western Blot. S'indica el proveïdor, n^o de catàleg i dilució.

<i>Anticòs</i>	<i>Dilució</i>	<i>Proveïdor</i>	<i>N^o de catàleg</i>
<i>Akt</i>	1: 1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-1618
<i>Atg7</i>	1: 1000	Cell Signaling	#2631
<i>Atf4</i>	1:1000	Cell Signaling	#11815
<i>Bcl-2</i>	1: 500	BD Biosciences	610538
<i>Beclin-1</i>	1: 500	BD Biosciences	612112
<i>Bnip3</i>	1: 1000	Cell Signaling	#3769
<i>Caspasa-3</i>	1: 3000	Cell Signaling	#9665
<i>Catalasa</i>	1: 500	Santa Cruz Biotechnology	sc-271803
<i>CHOP (GADD153)</i>	1: 1000	Cell Signaling	#2895
<i>Citocrom C</i>	1: 2000	Abcam	ab110325
<i>Complex I (NDUFS3)</i>	1: 1000	Invitrogen	459130
<i>Complex II (SDHa)</i>	1: 2000	Molecular Probes	A11142
<i>Complex III (Core 2)</i>	1: 1000	Molecular Probes	A11143

<i>Complex IV (Cox4)</i>	1: 1000	Molecular Probes	A21348
<i>Complex V (F₁F₀a)</i>	1: 1000	Molecular Probes	A21350
<i>DLD</i>	1: 5000	Abcam	ab133551
<i>DRP1</i>	1: 1000	BD Biosciences	611112
<i>GSK3β</i>	1: 1000	Abcam	ab18893
<i>LC3 A/B</i>	1: 2000	Abcam	ab128025
<i>MEK 1/2</i>	1: 2000	Cell Signaling	#9122
<i>MFN2</i>	1: 1000	Sigma-Aldrich	M6319
<i>MnSOD</i>	1: 500	Santa Cruz Biotechnology	sc-133134
<i>OPA1</i>	1: 1000	BD Biosciences	612606
<i>P62 (SQSTM1)</i>	1: 1000	Cell Signaling	#5114
<i>P65</i>	1: 1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-372
<i>pelF2a</i>	1: 1000	Cell Signaling	#9721
<i>PGC-1a</i>	1: 1000	Novus Biologicals	NBP1-04676
<i>Porina (VDAC1)</i>	1: 5000	Abcam	ab15895
<i>p-Akt (Ser473)</i>	1: 1000	Cell Signaling	#4060
<i>p-GSK3α/β (Ser21/9)</i>	1: 1000	Cell Signaling	#9331
<i>p-STAT3 (Tyr705)</i>	1: 2000	Cell Signaling	#9145
<i>STAT3</i>	1: 2000	Abcam	ab68153
<i>TFAM</i>	1: 1000	Abcam	ab131607
<i>αBIP (GRP78)</i>	1: 3000	Santa Cruz Biotechnology	sc-1051

Taula 6. Anticossos secundaris utilitzats per al Western Blot. S'indica el proveïdor, n° de catàleg i dilució.

<i>Anticòs</i>	<i>Dilució</i>	<i>Proveïdor</i>	<i>Nº de catàleg</i>
<i>Cabra-IgG HRP</i>	1:20.000	Sigma-Aldrich	A5420
<i>Conill-IgG HRP</i>	1:5.000	Sigma-Aldrich	A0545
<i>Ratolí-IgG HRP</i>	1:10.000	Sigma-Aldrich	A9044

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

Per comprovar la càrrega de cadascuna de les mostres tenyim el gel després de la transferència amb Blau de Coomassie (0.1% CBB-R250, 50% metanol, 10% àcid acètic) i per tenir un control de càrrega real de la membrana aquesta es tenyeix amb Naphtol Blue (Sigma-Aldrich).

4. Eines bioinformàtiques

Image J és un programa de processament d'imatge digital de domini públic programat en Java desenvolupat pel National Institutes of Health (NIH). Aquesta aplicació permet visualitzar i analitzar imatges obtingudes a partir de qualsevol microscopi. És molt útil ja que permet editar o donar color a qualsevol imatge, quantificar intensitats, comptar punts, seleccionar regions d'interès, desenvolupar anàlisi de colocalització, entre d'altres funcions.

<https://imagej.nih.gov/ij/>

5. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). El test de Kruskal-Wallis s'ha utilitzat per comparar més de dos grups, amb un test post-hoc de Dunn, i el test Dunnett quan es compara a un control. El test de Mann-Whitney s'ha utilitzat per comparar dos grups. El test 2WAY-ANOVA s'ha utilitzat per determinar l'efecte del silenciament gènic i la presència d'oxigen o addició de tractaments sobre els valors experimentals i per una possible interacció. Els experiments s'han realitzat mínim tres vegades, el número exacte de repeticions apareix en cada figura i tots els tests estadístics són amb una $p \leq 0.05$.

 Resultats

RESULTATS

1. Expressió de Bcl-2 i la seva implicació en la supervivència

Els resultats previs del grup havien demostrat que els fibroblasts cardíacs són més resistents a la inducció de mort cel·lular per estímuls que activen l'apoptosi per la via mitocondrial com el tractament amb estaurosporina o la privació de sèrum al medi de cultiu, i que indueixen menys apoptosi durant la isquèmia experimental que els fibroblasts pulmonars i dèrmics (Mayorga et al., 2004). Aquest fet depèn de l'elevada expressió de *Bcl2* en els fibroblasts cardíacs, ja que la repressió d'aquest gen per interferència d'ARN produïa sortida de Citocrom C del mitocondri, activació de Caspasa-3 i una incidència de nuclis apoptòtics similar a la resta de fibroblasts durant la isquèmia (Mayorga et al., 2004). Per tant, el que vam fer primer és replicar l'estudi però analitzant directament la supervivència en presència de nivells normals o silenciats de *Bcl2*, utilitzant transducció lentiviral que permet generar una població cel·lular homogènia, la qual no s'havia pogut fer al primer treball perquè el silenciament de *Bcl2* es va realitzar per transfecció, amb una eficàcia reduïda en fibroblasts primaris.

El silenciament de l'expressió de *Bcl2* als fibroblasts cardíacs va induir una reducció del nombre de cèl·lules respecte al grup control transduït amb lentivirus "*Scrambled*" (control) de més del 30% en normòxia i va incrementar la mortalitat un 20% en isquèmia (condició d'isquèmia experimental en solució de Tyrode en pO₂ de 0.2% durant 24h), indicant que Bcl-2 és important per la supervivència (i proliferació) dels fibroblasts cardíacs en condicions basals (de normòxia), a més de protegir-los durant la isquèmia (Figura 1).

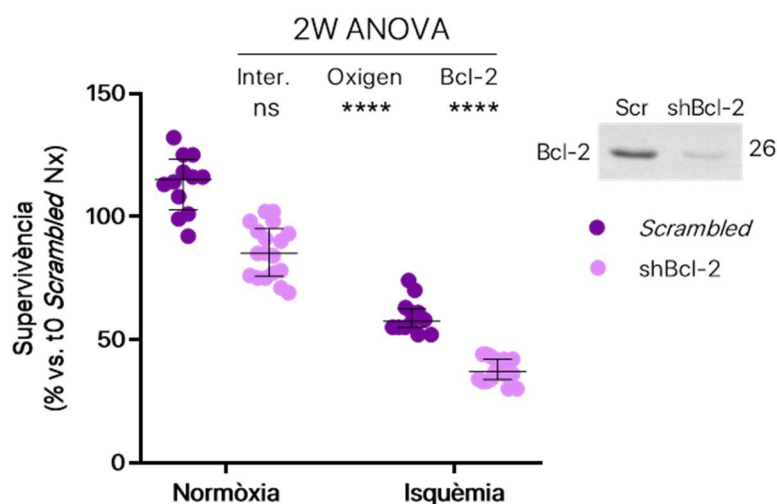


Figura 1. El silenciament de *Bcl2* als fibroblasts cardíacs indueix la pèrdua de supervivència, i possiblement, proliferació, tant en normòxia com en isquèmia. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 72h post-transducció en condicions de normòxia i d'isquèmia (24h). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment de sotmetre a la isquèmia (t=0h). En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 6 experiments independents per duplicat (N=6). El silenciament de Bcl-2 sempre es confirma per Western Blot. L'anàlisi estadístic per 2W-ANOVA indica que les diferències degudes a l'expressió de Bcl-2 i les degudes a la presència d'oxigen són significatives (****p≤0.0001) però no hi ha interacció significativa entre les dues variables. Nx: Normòxia; Scr: *Scrambled*.

Degut al resultat inesperat que indica la importància de Bcl-2 en la supervivència, i probablement també en la proliferació, dels fibroblasts cardíacs en condicions basals, a més de durant la isquèmia, ens vam plantejar la possibilitat que Bcl-2 fos important pel control de l'autofàgia en aquestes cèl·lules i que, com a mecanisme implicat en el reciclatge d'òrgànuls i en l'obtenció d'energia en situacions d'estrès cel·lular (com s'ha descrit a l'apartat 3.2 de la introducció), aquesta tingués un paper important per la supervivència tant en condicions de normòxia com durant la isquèmia.

El primer que vam fer va ser analitzar si el tractament dels fibroblasts amb Rapamicina (400 nM), un inhibidor de mTOR que, al seu torn, és inhibidor de l'autofàgia i per tant induïx el procés autofàgic, modificava l'expressió de *Bcl2* (Tanemura et al., 2012; Kim et al., 2015). Vam observar que la rapamicina induïa un increment en l'abundància de Bcl-2 especialment als fibroblasts cardíacs, tot i no ser significatiu estadísticament (i de LC3-II confirmant l'increment en l'autofàgia a tots els fibroblasts) (Figura 2). Així doncs, vam decidir analitzar si la inhibició de l'autofàgia alterava de forma específica la supervivència dels fibroblasts cardíacs en isquèmia.

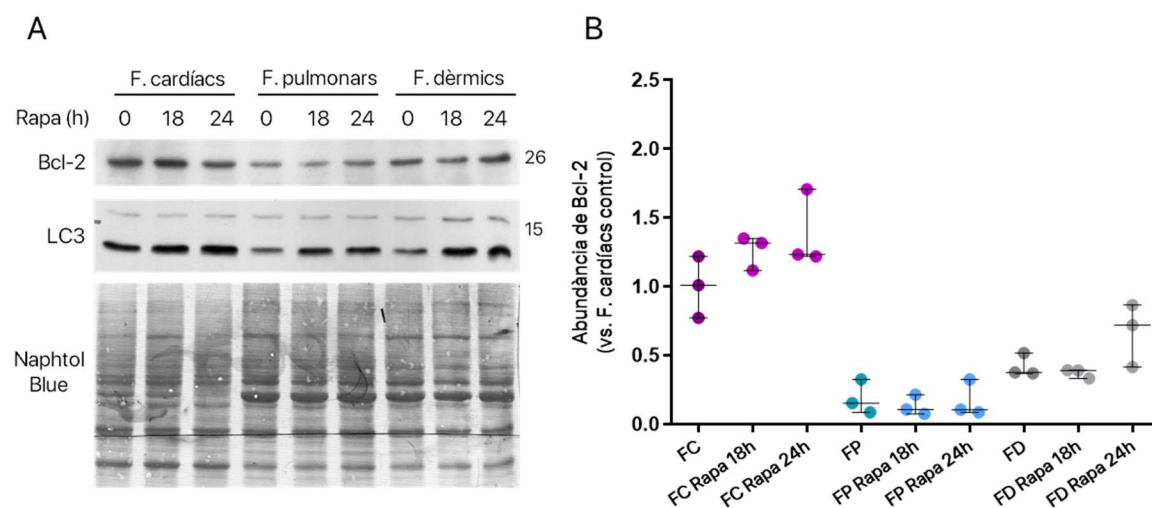


Figura 2. Els fibroblasts cardíacs induïxen l'expressió de Bcl-2 i LC3 en presència de rapamicina. (A) Anàlisi de l'expressió de Bcl-2 i LC3 en condicions basals i en presència de Rapamicina (400 nM) durant 18h i 24h mitjançant Western Blot dels diferents tipus de fibroblasts. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric del Western Blot de Bcl-2. Les dades es normalitzen dividint pels valors dels fibroblasts en condicions basals. En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 3 experiments independents (N=3). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (No significatiu vs. FC control). FC: Fibroblasts cardíacs; FP: Fibroblasts pulmonars; FD: Fibroblasts dèrmics; Rapa: Rapamicina.

2. Implicació de l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts

2.1 Caracterització de l'expressió de marcadors autofàgics

L'autofàgia és un procés adaptatiu que pot ser induït com a resposta a diferents senyals d'estrès, com la hipòxia, actuant com a mecanisme primari de supervivència, com s'explica a l'apartat 3.2 de la Introducció. Degut a 1) resultats previs del grup en els que es demostrava que els fibroblasts cardíacs tenen més capacitat de supervivència que altres tipus de fibroblasts fins a 72h d'isquèmia

experimental; 2) que els fibroblasts cardíacs tenen nivells constitutivament superiors de Bcl-2 que altres fibroblasts i aquest està relacionat amb la seva major supervivència; i 3) que als fibroblasts cardíacs l'activador d'autofàgia rapamicina indueix un increment de l'expressió de *Bcl2*, vam voler analitzar l'expressió de diversos marcadors autofàgics per determinar si els fibroblasts cardíacs tenen una major activació de l'autofàgia en condicions d'isquèmia. Per això, vam determinar l'expressió de Beclin1, Bcl-2 i Atg7 de les fases inicials de l'autofàgia, p62 com a proteïna de càrrega autofàgica, LC3 present en els autofagosomes, i Bnip3 com a marcador de la mitofàgia. A més, vam determinar l'expressió de Caspasa-3 (total i activa) com a indicador de l'apoptosi. Pel que fa a Beclin1 no vam trobar diferències d'expressió entre els diferents tipus de fibroblasts i no variava tampoc en condicions d'isquèmia. D'altra banda, p62 i LC3 disminuïen la seva expressió en isquèmia, probablement degut a l'activació de l'autofàgia i la seva pròpia degradació, però sense diferències entre fibroblasts. De fet, l'anàlisi de l'expressió de *LC3* a nivell de transcrit va caure en tots els fibroblasts durant la isquèmia (dades de PCR quantitativa no mostrades). Atg7 no variava l'expressió en isquèmia, no obstant, els fibroblasts cardíacs expressaven nivells més elevats. A més, tal i com ja havia demostrat el grup, els fibroblasts cardíacs expressen més Bcl-2 (Mayorga et al., 2004) i mantenen l'expressió en condicions d'isquèmia. Addicionalment, als fibroblasts pulmonars i dèrmics, però no als cardíacs, vam detectar processament de Caspasa-3, compatible amb la seva activació, en condicions d'isquèmia. És interessant remarcar que Bnip3 va presentar una expressió incrementada i mantinguda en el temps en isquèmia en els fibroblasts cardíacs en comparació als altres fibroblasts (Figura 3).

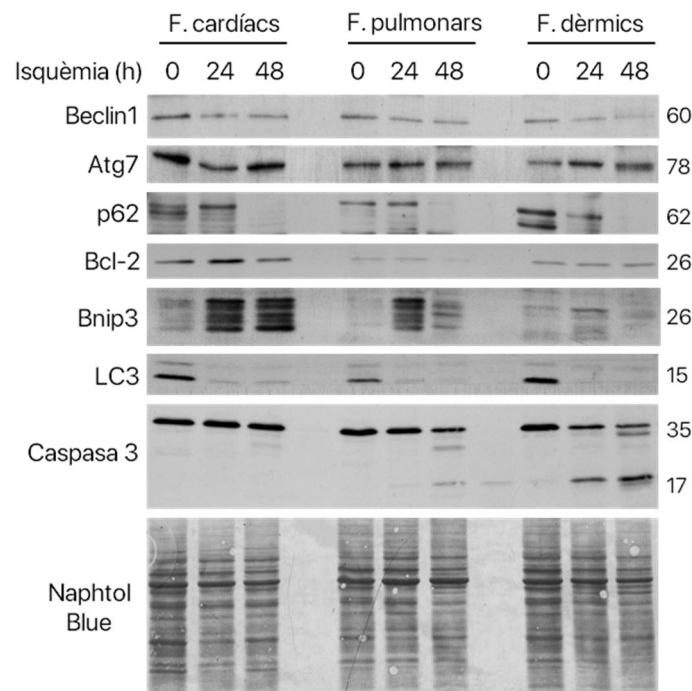


Figura 3. Els fibroblasts cardíacs expressen més Bcl-2 i Atg7, i en condicions d'isquèmia expressen més Bnip3 que els altres tipus de fibroblasts. Anàlisi de l'expressió de marcadors autofàgics i apoptòtics en condicions de normòxia i d'isquèmia mitjançant Western Blot. El Naphtol blue es va utilitzar com a control de càrrega. La imatge és representativa de 3 experiments independents amb resultats similars (N=3).

2.2 Efecte del silenciament de proteïnes implicades en l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts durant la isquèmia

Degut a la diferència d'expressió de *Bnip3* en condicions d'isquèmia als fibroblasts cardíacs, i del seu paper en la mitofàgia i l'activació per Hif1, vam decidir analitzar l'efecte del silenciament gènic de *Bnip3* mitjançant shRNAs en la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i d'isquèmia. Els fibroblasts es van transduir lentiviralment amb el shRNA control (*Scrambled*) i els shRNAs 1 i 2 de *Bnip3* durant 72h i després es van sotmetre a isquèmia durant 24h. Les dades mostren que el silenciament de *Bnip3* als fibroblasts cardíacs afecta la supervivència un 20% en condicions de normòxia, però no té cap efecte diferencial en condicions d'isquèmia (Figura 4).

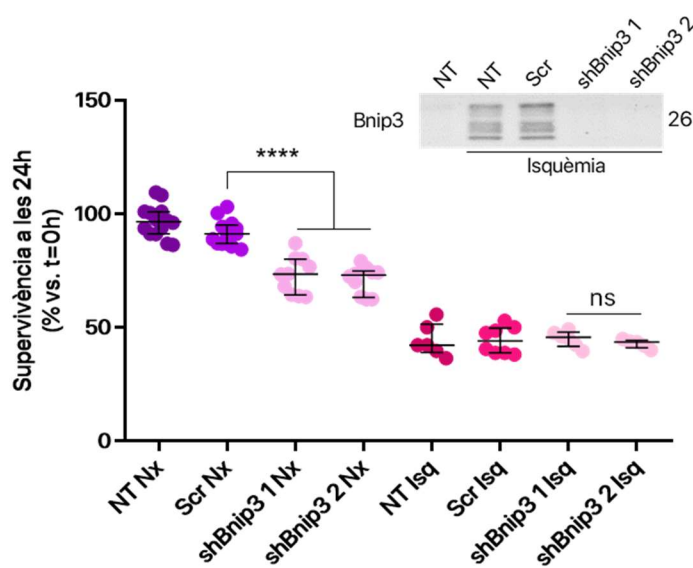


Figura 4. El silenciament gènic de *Bnip3* als fibroblasts cardíacs afecta la supervivència en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 72h post-transducció en condicions de normòxia i d'isquèmia (24h). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment de sotmetre a la isquèmia (t=0h). En el gràfic s'observa mediana ± rang interquartil de 4 experiments independents per duplicat (N=4). El silenciament de *Bnip3* sempre es confirma per Western Blot. S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$ vs. t=0h). NT: No transduït; Scr: *Scrambled*; Isq: Isquèmia.

L'efecte del silenciament de *Bnip3*, que s'ha implicat en la mitofàgia, sobre la supervivència dels fibroblasts cardíacs ens va portar a preguntar-nos si obtindríem el mateix resultat al silenciar un gen com *Atg7*, que participa en l'expansió del fagòfor i forma part del sistema de conjugació d'*Atg12*, donat que no és específic d'una autofàgia selectiva, a diferència de *Bnip3*.

Així doncs, vam realitzar el silenciament gènic d'*Atg7* amb dos shRNAs sobre els fibroblasts cardíacs tant en condicions de normòxia com d'isquèmia per tal d'analitzar la supervivència. Els fibroblasts es van transduir lentiviralment amb el shRNA control (*Scrambled*) i els shRNAs 1 i 2 d'*Atg7* durant 72h i després es van sotmetre a isquèmia durant 24h. Tal i com es mostra en la Figura 5, el silenciament gènic d'*Atg7* als fibroblasts cardíacs va afectar la supervivència un 20-25% en condicions de normòxia, però no va tenir cap efecte significatiu en condicions d'isquèmia.

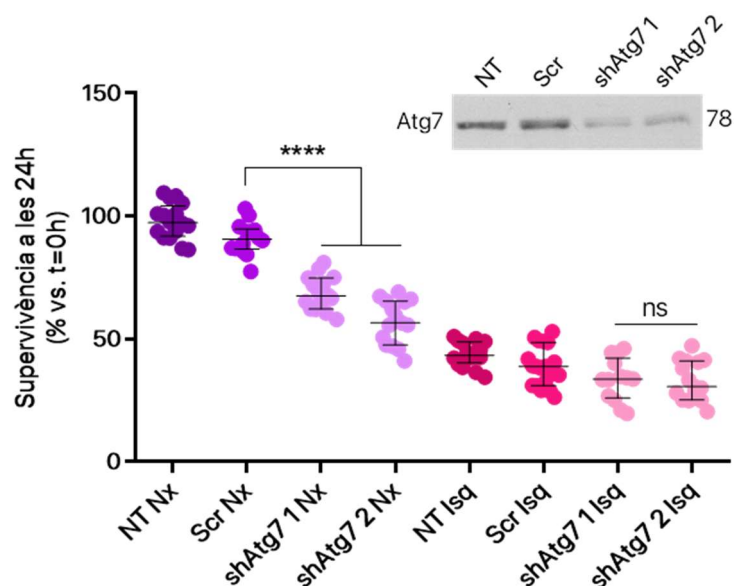


Figura 5. El silenciament gènic d' *Atg7* als fibroblasts cardíacs afecta la supervivència en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 72h post-transducció en condicions de normòxia i d'isquèmia (24h). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment de sotmetre a la isquèmia (t=0h). En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 8 experiments independents per duplicat (N=8). El silenciament d' *Atg7* sempre es confirma per Western Blot. S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$ vs. t=0h). NT: No transduït, Scr: *Scrambled*, Nx: Normòxia; Isq: Isquèmia.

2.3 Efecte de la inhibició farmacològica de l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts

A rel d'aquests resultats, vam voler analitzar l'efecte del bloqueig de l'autofàgia mitjançant la inhibició farmacològica en els diferents tipus de fibroblasts en condicions de normòxia i d'isquèmia per tal de determinar si es tractava d'un tret diferencial dels fibroblasts cardíacs. Primer, vam utilitzar l'inhibidor 3-metiladenina (3-MA, 5 mM), que actua en les etapes inicials de l'autofàgia, concretament bloqueja el complex de nucleació PI3K de classe III. Vam tractar els diferents tipus de fibroblasts amb la 3-MA durant 24h en condicions de normòxia i en condicions d'isquèmia. El bloqueig de l'autofàgia va disminuir un 20% la supervivència dels fibroblasts cardíacs en normòxia, però no va afectar la supervivència en condicions d'isquèmia (Figura 6).

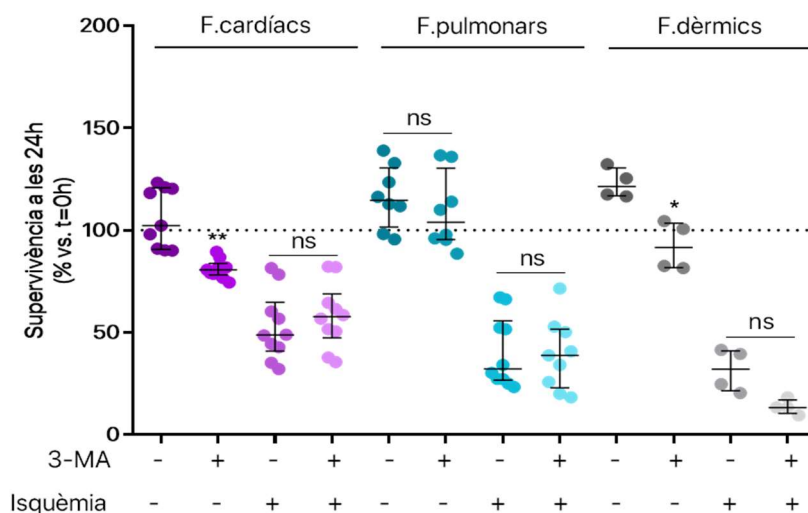


Figura 6. El bloqueig de l'autòfagia amb la 3-MA afecta la supervivència dels fibroblasts en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 24h en condicions de normòxia i d'isquèmia (\pm 3-MA, 5 mM). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment d'afegir la 3-MA (t=0h). En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de 4-5 experiments independents. S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (** $p \leq 0.01$ | * $p \leq 0.05$ | ns no significatiu vs. No tractament de cada tipus de fibroblast).

Degut a possibles efectes inespecífics de la 3-MA, vam voler analitzar la supervivència amb un altre inhibidor de l'autòfagia, la Cloroquina (CQ, 30 μ M), un inhibidor de la fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma. Vam tractar els diferents tipus de fibroblasts amb la CQ durant 24h en condicions de normòxia i en condicions d'isquèmia, i el resultat que vam obtenir va ser similar a l'obtingut amb la 3-MA. El bloqueig de l'autòfagia no va afectar la supervivència en condicions d'isquèmia, però sí que afectava en condicions de normòxia, sobretot als fibroblasts cardíacs, en els quals la supervivència va disminuir un 30% a l'igual que als altres tipus de fibroblasts (Figura 7).

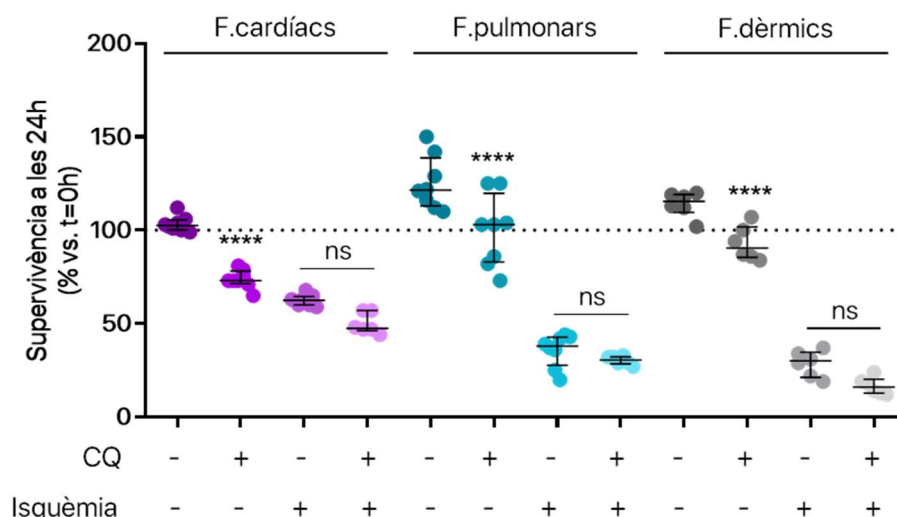


Figura 7. El bloqueig de l'autòfagia amb la CQ afecta la supervivència dels fibroblasts en condicions de normòxia però no en condicions d'isquèmia. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 24h en condicions de normòxia i d'isquèmia (\pm CQ, 30 μ M). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment d'afegir la CQ (t=0h). En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de com a mínim 5 experiments independents ($N \geq 5$). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$ | ns no significatiu vs. No tractament de cada tipus de fibroblast)

L'anàlisi d'expressió de proteïnes va mostrar que la Cloroquina induïa l'acumulació de LC3, ja que impedeix la fusió del fagosoma amb el lisosoma reduint la seva eliminació (Figura 8). El mateix vam observar per Bnip3, especialment acumulat als fibroblasts cardíacs, suggerint la seva possible participació en el procés autofàgic, tot i que el seu silenciament no va afectar de forma específica la supervivència dels fibroblasts cardíacs en isquèmia. Malgrat que els resultats obtinguts amb aquesta sèrie d'experiments de bloqueig de l'autofàgia per mètodes genètics i químics no ens permet distingir entre bloqueig de la proliferació o disminució de la viabilitat pel que fa als fibroblasts pulmonars i els dèrmics, no sembla que hi hagi un efecte determinant de l'autofàgia en la supervivència dels fibroblasts cardíacs durant la isquèmia, descartant la hipòtesi inicial.

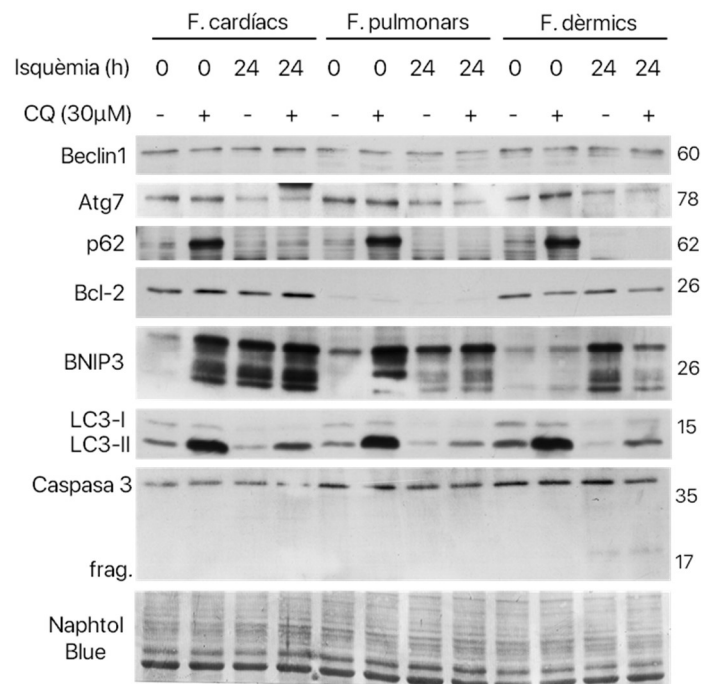


Figura 8. El tractament amb Cloroquina induïx l'acumulació de Bnip3 i de LC3. Anàlisi de l'expressió de proteïnes relacionades amb l'autofàgia en presència o absència de Cloroquina (30µM) en condicions de normòxia i d'isquèmia experimental dels fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. La imatge és representativa de 3 experiments independents amb resultats similars (N=3).

3. Anàlisi de l'estrès oxidatiu

3.1 Quantificació d'espècies reactives de l'oxigen

La interrupció del flux sanguini condueix a una situació patològica complexa anomenada isquèmia, que consisteix en una disminució de la tensió d'oxigen que inactiva la cadena respiratòria i per tant, afecta a la producció d'energia. Quan moren els cardiomiòcits, l'espai que ocupaven és reemplaçat per matriu extracel·lular sintetitzada pels fibroblasts cardíacs. Els nostres resultats demostren que els fibroblasts cardíacs tenen una taxa de supervivència més elevada que altres tipus de fibroblasts a períodes de fins a 72h d'isquèmia experimental. A més, està descrit que en condicions d'hipòxia els nivells de ROS incrementen tenint efectes deleteris (Lushchak, 2014). Aquests fets ens van portar a investigar la possible implicació del control dels ROS en la supervivència dels fibroblasts cardíacs.

Per quantificar la producció de ROS als cultius de fibroblasts primaris es va utilitzar la sonda MitoSOX™ Red que ja havia sigut emprada en treballs previs (Blasco et al., 2018). La sonda MitoSOX™ Red és un reactiu derivat de la hidroxietidina (HE) que, segons el productor, permet detectar de manera selectiva la producció de l'anió superòxid (O_2^-) generat a l'interior dels mitocondris de cèl·lules vives mitjançant citometria de flux. Aquesta sonda té càrrega positiva facilitant així la seva entrada i acumulació específica als mitocondris, i la posterior emissió de fluorescència com a conseqüència de la seva oxidació i subseqüent unió a l'ADN mitocondrial. Tot i això, els nostres controls previs indiquen que aquesta sonda també detecta altres tipus de ROS (Blasco et al., 2018), de forma que a partir d'ara, parlarem de ROS de forma inespecífica. Es va determinar la producció de ROS als fibroblasts neonatals primaris cardíacs, pulmonars i dèrmics de rata en condicions basals i en isquèmia experimental.

En condicions basals, els fibroblasts cardíacs presenten nivells més elevats de ROS d'origen mitocondrial en comparació amb els fibroblasts dèrmics, que tenen nivells un 50% menors i els fibroblasts pulmonars, que són els que presenten nivells més baixos, un 60% menors (Figura 9A). En la condició d'isquèmia experimental (Solució de Tyrode en pO_2 de 0.2% durant 24h), els fibroblasts pulmonars i dèrmics van incrementar marcadament els seus nivells de ROS, de l'ordre de 3 i 5 vegades sobre el nivell basal respectivament, mentre que els fibroblasts cardíacs mantenen els nivells de ROS a valors semblants als basals (Figura 9B). Així doncs, els fibroblasts cardíacs tenen uns nivells més elevats de ROS (suposadament de l'anió superòxid O_2^-) mitocondrial en condicions basals i són capaços de mantenir i controlar millor l'increment dels ROS, en relació als seus nivells basals, en condicions d'isquèmia.

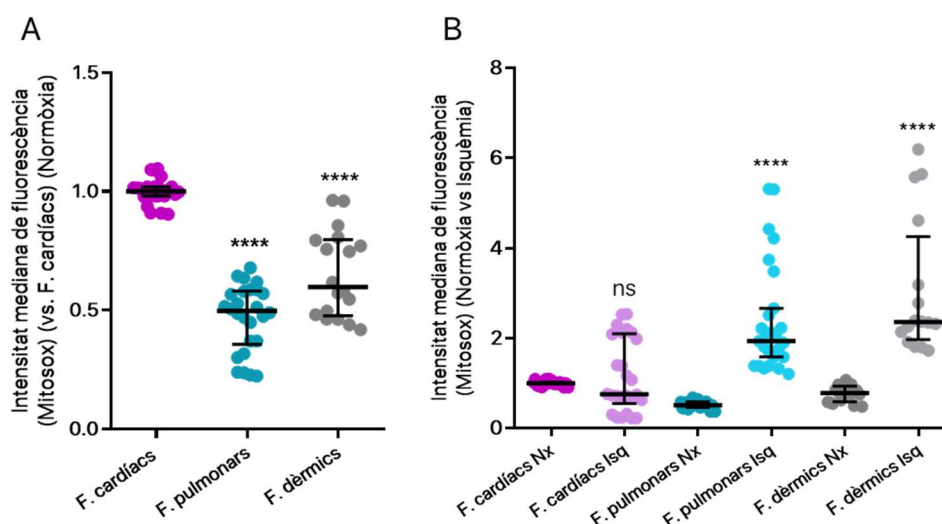


Figura 9. Els fibroblasts cardíacs produeixen nivells més elevats de ROS mitocondrial en condicions basals i controlen l'increment en condicions d'isquèmia experimental. Quantificació de la producció de ROS en condicions basals i en isquèmia dels diferents tipus de fibroblasts. (A,B) Determinació de la producció de l'anió superòxid (O_2^-) mitocondrial mitjançant marcatge amb la sonda MitoSOX™ Red en condicions basals (A) i en condicions basals i en isquèmia (24h) (B). Degut a oscil·lacions interexperimentals de la senyal, les dades es normalitzen dividint per la mitja dels fibroblasts cardíacs en condicions basals. En els gràfics s'observa mediana ± rang interquartil de 16 experiments independents (n=16). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (****p≤0.0001 vs. Fibroblasts cardíacs (A); vs Normòxia de cada tipus de fibroblasts (B)). Isq: Isquèmia

3.2 Anàlisi de l'expressió d'enzims antioxidants

A rel de la diferència detectada entre els nivells de ROS als fibroblasts cardíacs en relació als altres tipus de fibroblasts tant en condicions basals com durant la isquèmia, vam voler analitzar l'expressió d'enzims antioxidants, concretament de la superòxid dismutasa dependent de manganés (MnSOD), la Catalasa i la Glutatió peroxidasa (GPx), per veure si podien explicar les diferències observades en les concentracions de ROS als diferents fibroblasts. Com s'observa en la Figura 10, els fibroblasts cardíacs en condicions basals expressen nivells més elevats dels tres enzims analitzats en comparació als altres fibroblasts.

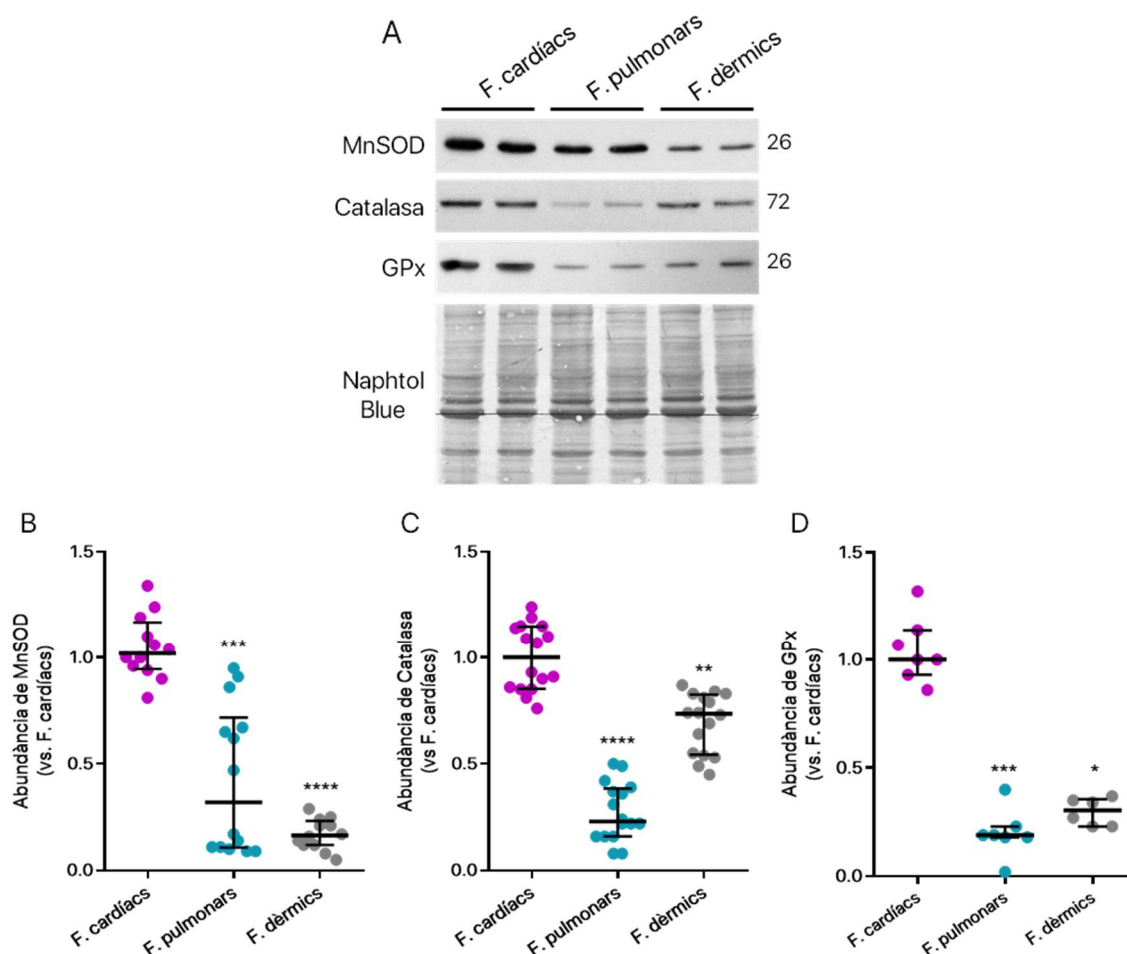


Figura 10. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de MnSOD, Catalasa i Glutatió Peroxidasa que els fibroblasts pulmonars i dèrmics. Expressió d'enzims antioxidants en condicions basals dels diferents tipus de fibroblasts. (A) Anàlisi de l'expressió de superòxid dismutasa (MnSOD), catalasa i glutatió peroxidasa (GPx) mitjançant Western Blot dels diferents tipus de fibroblasts en condicions basals. El Naphtol blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B-D) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots de MnSOD (B), Catalasa (C) i GPx (D). Les dades es normalitzen dividint per la mitja dels fibroblasts cardíacs en condicions basals. En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil de 16 experiments independents (n=16). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (****p≤0.0001, *** p≤0.001, ** p≤0.01, * p≤0.05 vs. Fibroblasts cardíacs).

Aquests resultats indicaven que els fibroblasts cardíacs tenen major expressió dels principals enzims antioxidants de ROS i, malgrat tenir nivells de ROS més elevats en condicions normals, són capaços de controlar millor el seus nivells durant la isquèmia. Per això vam voler analitzar els nivells del tripèptid glutatió en el seu estat reduït (GSH), que és utilitzat per la cèl·lula com a coenzim de la glutatió peroxidasa per neutralitzar els ROS, i així millorar la comprensió del maneig dels ROS pels fibroblasts. Les dades van mostrar que els fibroblasts cardíacs tenen més quantitat de GSH que la resta de fibroblasts en condicions normals i que aquests nivells disminueixen significativament durant la isquèmia, a diferència del què passa amb els fibroblasts de pulmó i de pell (Figura 11).

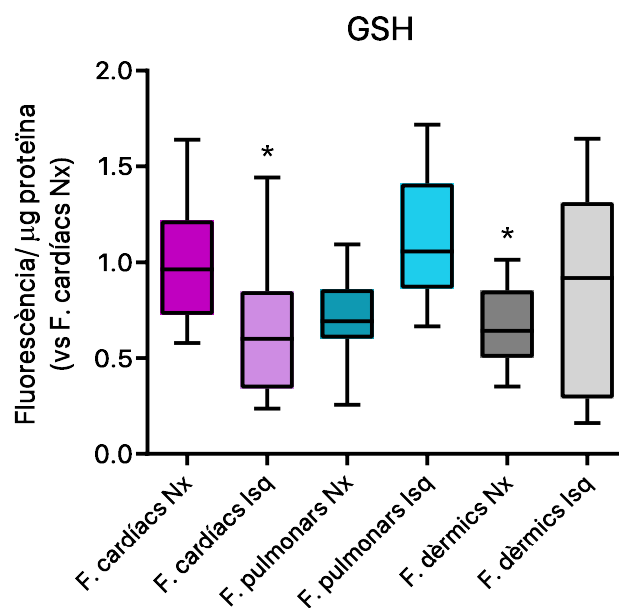


Figura 11. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells més elevats de glutatió reduït (GSH) que els fibroblasts pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i aquests disminueixen durant la isquèmia. Les dades mostren valors individuals de fluorescència corregida per la proteïna i relacionada amb la mitja dels valors dels fibroblasts cardíacs en normòxia, amb els valors mínim i màxim per cada grup i la mitjana (N=8). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (* $p \leq 0.05$ vs. Fibroblasts cardíacs). Nx: Normòxia; Isq: Isquèmia.

4. Anàlisi de la respiració mitocondrial

4.1 Anàlisi del consum d'oxigen en condicions basals

Degut a la diferència en el comportament de la producció de ROS en els diferents tipus de fibroblasts i tenint en compte que la principal font de ROS és la cadena de transport electrònic, és a dir, la respiració mitocondrial (Osellame et al., 2012), vam voler analitzar si hi havia diferències entre els diferents tipus de fibroblasts en aquesta funció cel·lular en condicions basals. Per analitzar la respiració mitocondrial es va utilitzar l'equip de respirometria d'alta resolució Oxygraph-2k que permet mesurar el consum d'oxigen de cèl·lules intactes en suspensió.

En primer lloc, s'analitza la respiració basal o de rutina amb l'objectiu d'estimar el consum normal d'oxigen del cultiu, que és indicatiu de la demanda energètica basal. A continuació s'afegeix l'Oligomicina, un inhibidor de l'ATP sintasa (complex V) que provoca una disminució del consum d'oxigen de les cèl·lules. El consum d'oxigen en aquestes condicions es coneix com a fuita (*LEAK*), i defineix el consum d'oxigen desacoblat de la fosforilació oxidativa. Així doncs, l'addició d'Oligomicina ens permet estimar el consum d'oxigen que es destina a la producció d'ATP (teòrica) i el consum d'oxigen degut a la fuita de protons. Després s'afegeix el FCCP, un agent que impedeix la generació del gradient de protons que estimula el consum d'oxigen i permet calcular la respiració teòrica màxima. La diferència entre la respiració basal i la respiració teòrica màxima és la que es coneix com capacitat de reserva, que indica la capacitat potencial de resposta d'una cèl·lula enfront a un estrès i/o d'increment de la demanda energètica. Finalment, s'afegeix l'Antimicina A, un inhibidor del complex III de la cadena de transport electrònic, que provoca una disminució del consum d'oxigen fins uns nivells que es coneixen com *ROX* (consum d'oxigen residual) o consum d'oxigen no mitocondrial. Aquest valor s'utilitza per relativitzar la resta de valors, com s'ha explicat a l'apartat 2.9 dels materials i mètodes.

Tal i com es mostra a la Figura 12, en totes les mesures de respirometria realitzades dels diferents tipus de fibroblasts, els fibroblasts cardíacs van tenir un major consum d'oxigen basal (Figura 12A). A més, les diferències van ser significatives en tots els estats (Figura 12B-F). Així doncs, podem afirmar que els fibroblasts cardíacs neonatals de rata consumeixen més oxigen durant la respiració basal o de rutina (Figura 12B); tenen un consum d'oxigen més elevat desacoblat de la producció d'ATP (fuita de protons) (Figura 12C) i un consum d'oxigen associat a la fosforilació d'ADP major (Figura 12D). L'addició d'un agent desacoblant (FCCP), que indueix nivells de consum d'oxigen màxims, va evidenciar que els fibroblasts cardíacs tenien una capacitat respiratòria màxima (teòrica) major (Figura 12E) i també una capacitat respiratòria de reserva més elevada (Figura 12F). A més, la ràtio "*netROUTINE*", que expressa el consum d'oxigen associat a la fosforilació oxidativa en funció de la capacitat de la cadena de transport electrònic, suggeria que els fibroblasts cardíacs necessitaven consumir nivells més baixos d'oxigen per produir ATP respecte a la seva capacitat màxima en comparació als fibroblasts pulmonars i dèrmics (Figura 12G).

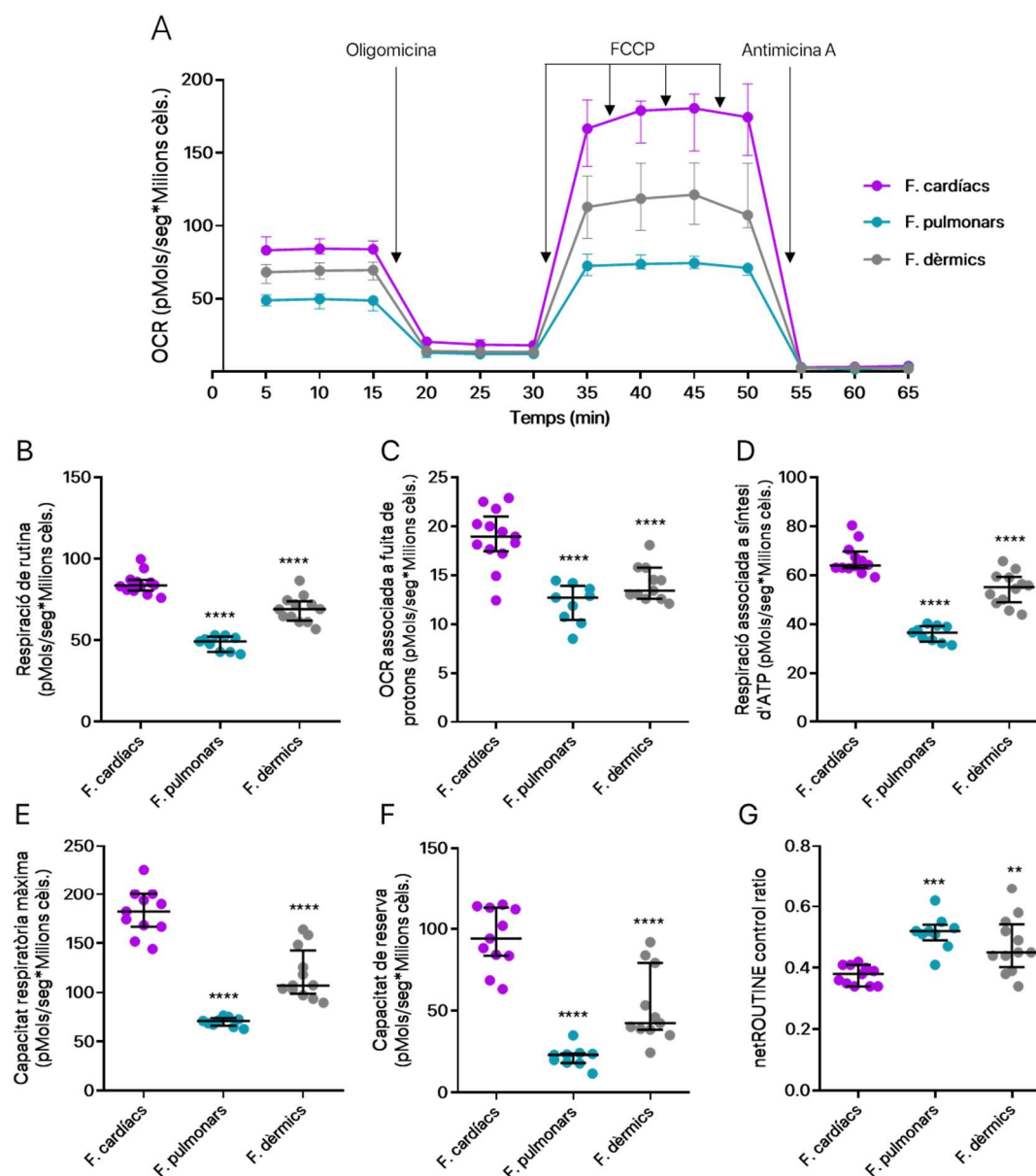


Figura 12. Els fibroblasts cardíacs consumeixen més oxigen en comparació als altres fibroblasts en condicions basals. Anàlisi de la respirometria dels diferents tipus de fibroblasts. (A) Mediana±rang interquartil del consum d'oxigen dels diferents tipus de fibroblasts en les diferents condicions. (B-F) Gràfics comparatius entre els tres tipus de fibroblasts i les diferents mesures. (G) Càlcul de la fracció de la capacitat màxima destinada a la producció d'ATP. Degut a oscil·lacions interexperimentals, les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions basals (N=12). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$ | *** $p \leq 0.001$ | ** $p \leq 0.01$ vs. Fibroblasts cardíacs).

Degut a que la concentració fisiològica d'oxigen en la major part dels teixits es troba dins d'un rang entre 1 i 10 kPa ($pO_2 = 1-10\%$) (Carreau et al., 2011; Ortiz-Prado et al., 2019), i els cultius de fibroblasts primaris es mantenen a un 21% d'oxigen als incubadors, vam voler comprovar que els resultats de respirometria obtinguts no fossin deguts a una adaptació dels fibroblasts a un estat d'“hiperòxia” per l'elevada pressió d'oxigen a la cambra. Per això, vam realitzar cultiu primari de fibroblasts, els quals una vegada obtinguts es van sotmetre al 3% d'oxigen a la cambra d'hipòxia fins al dia de l'experiment. El dia de la respirometria vam mantenir un 3% d'oxigen constant dins de l'Oxygraph-2k mitjançant injecció controlada d'argó.

A una pO_2 de 3%, els fibroblasts cardíacs segueixen tenint un major consum d'oxigen basal (Figura 13A-G). Els fibroblasts cardíacs consumeixen més oxigen durant la respiració de rutina (B), durant el desacoblament de la producció d'ATP (fuita de protons) (C) i tenien un major consum d'oxigen associat a la producció d'ATP (D). També tenien una capacitat respiratòria màxima (teòrica) major (E) i una capacitat respiratòria de reserva més elevada (F) que els fibroblasts de pulmó i de pell. Així mateix es va observar una tendència dels fibroblasts cardíacs a tenir una menor ràtio "netROUTINE", però sense diferències significatives. Així doncs, tot i que els valors de consum d'oxigen a pO_2 de 3% van ser més baixos en general, les diferències observades en els paràmetres de respiració obtinguts al 21% d'oxigen semblen deguts a diferències que molt probablement tenen lloc a l'organisme.

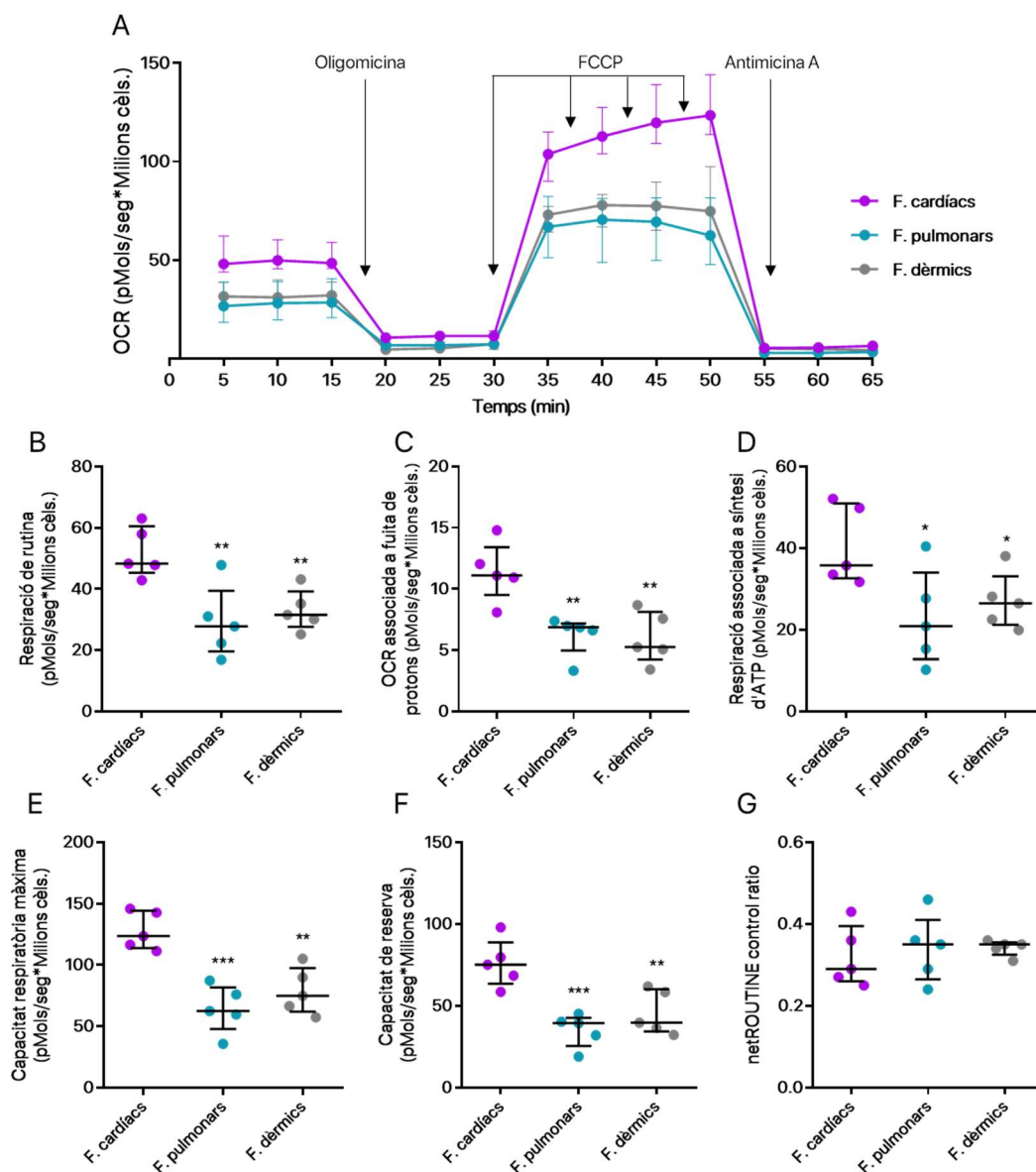


Figura 13. Els fibroblasts cardíacs consumeixen més oxigen en comparació als altres fibroblasts en concentracions d'oxigen fisiològiques (3% O_2). Anàlisi de la respirometria dels diferents tipus de fibroblasts. (A) Mediana±rang interquartil del consum d'oxigen dels diferents tipus de fibroblasts en les diferents condicions. (B-F) Gràfics comparatius entre els tres tipus de fibroblasts i les diferents mesures. (G) Càlcul de la fracció de la capacitat màxima destinada a la producció d'ATP. Degut a oscil·lacions interexperimentals, les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions basals (N=5). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (** $p \leq 0.001$ | ** $p \leq 0.01$ | * $p \leq 0.05$ vs. Fibroblasts cardíacs).

4.2 Anàlisi del possible rol de Bcl-2 en el control de la respiració

Com que 1) els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de Bcl-2 (Mayorga et al., 2004), 2) s'havia suggerit que, en models de cèl·lules tumorals, Bcl-2 regula la respiració mitocondrial i la producció de ROS (Chen and Pervaiz, 2007; Cherh et al., 2010), i 3) la capacitat de reserva respiratòria s'ha associat a un increment de la supervivència després de la isquèmia (Pfleger et al., 2015); vam voler analitzar el possible paper de Bcl-2 en el control de la capacitat de reserva respiratòria dels fibroblasts mitjançant la comparació entre cultius primaris de fibroblasts cardíacs normals i fibroblasts cardíacs on s'havia induït el silenciament gènic de *Bcl2* amb transducció de shRNAs. Com a control d'inhibició de la capacitat de reserva vam utilitzar el compost 3-nitropropionat (3-NP, 300 μ M), que bloqueja el complex II, i s'ha proposat com a responsable de la capacitat de reserva (Pfleger et al., 2015), tal i com s'ha explicat a l'apartat 2.4.2 de la introducció. El resultat que vam obtenir és que l'abundància de Bcl-2 no determinava el consum d'oxigen associat a la producció d'ATP ni la capacitat de reserva respiratòria en els cultius primaris de fibroblasts cardíacs (Figura 14).

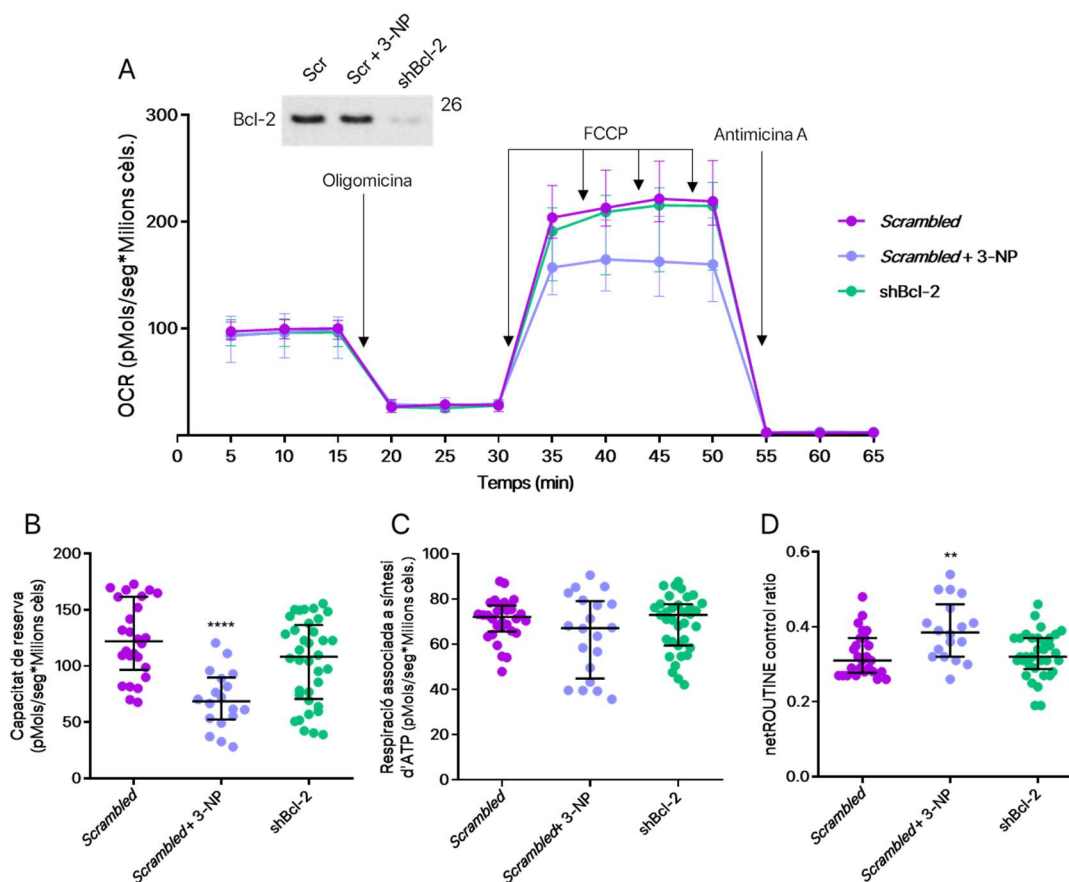


Figura 14. El silenciament del gen *Bcl2* no afecta a la capacitat de reserva respiratòria ni al consum d'oxigen associat a la producció d'ATP en els fibroblasts cardíacs. Anàlisi de la respirometria dels fibroblasts cardíacs transduïts amb *Scrambled*, *Scrambled*+ 3-NP (300 μ M) i shRNA de Bcl-2. (A) Mediana \pm rang interquartil del consum d'oxigen de les diferents condicions dels fibroblasts cardíacs. (B-C) Diferències obtingudes en la capacitat de reserva i la respiració associada a la síntesi d'ATP. (D) Càlcul de la fracció de la capacitat màxima destinada a la producció d'ATP. Degut a oscil·lacions interexperimentals, les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs transduïts amb *Scrambled*. N=20. El silenciament de Bcl-2 sempre es confirma per Western Blot. S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** p \leq 0.0001, ** p \leq 0.01 vs. *Scrambled*).

4.3 Anàlisi de l'expressió dels components de la cadena respiratòria

Els nostres resultats demostren que els fibroblasts cardíacs consumeixen més oxigen en condicions basals que els altres tipus de fibroblasts estudiats. Per això vam decidir analitzar l'expressió dels diferents complexos de l'ETC. Vam analitzar l'expressió de diferents components de cada complex: la subunitat NDUFS3 del complex I, la subunitat SDH α del complex II, la subunitat UQCRC2 del complex III, la subunitat Cox IV del complex IV i la subunitat F₁F₀ α del complex V (ATP sintasa). Tot i analitzar una única subunitat per cada complex, està descrit que mantenen una estequiometria 1:1 en les subunitats que els formen (Wirth et al., 2016). A més, vam analitzar l'expressió dels components mòbils Citocrom C i, mitjançant cromatografia líquida amb espectròmetre de masses (LC-MS), el coenzim Q total així com el seu estat redox. Les dades mostren que els fibroblasts cardíacs expressaven nivells més elevats de les subunitats dels complexos II, III, IV i V, mentre que no hi havia diferències d'expressió ni del complex I ni del Citocrom C (Figura 15).

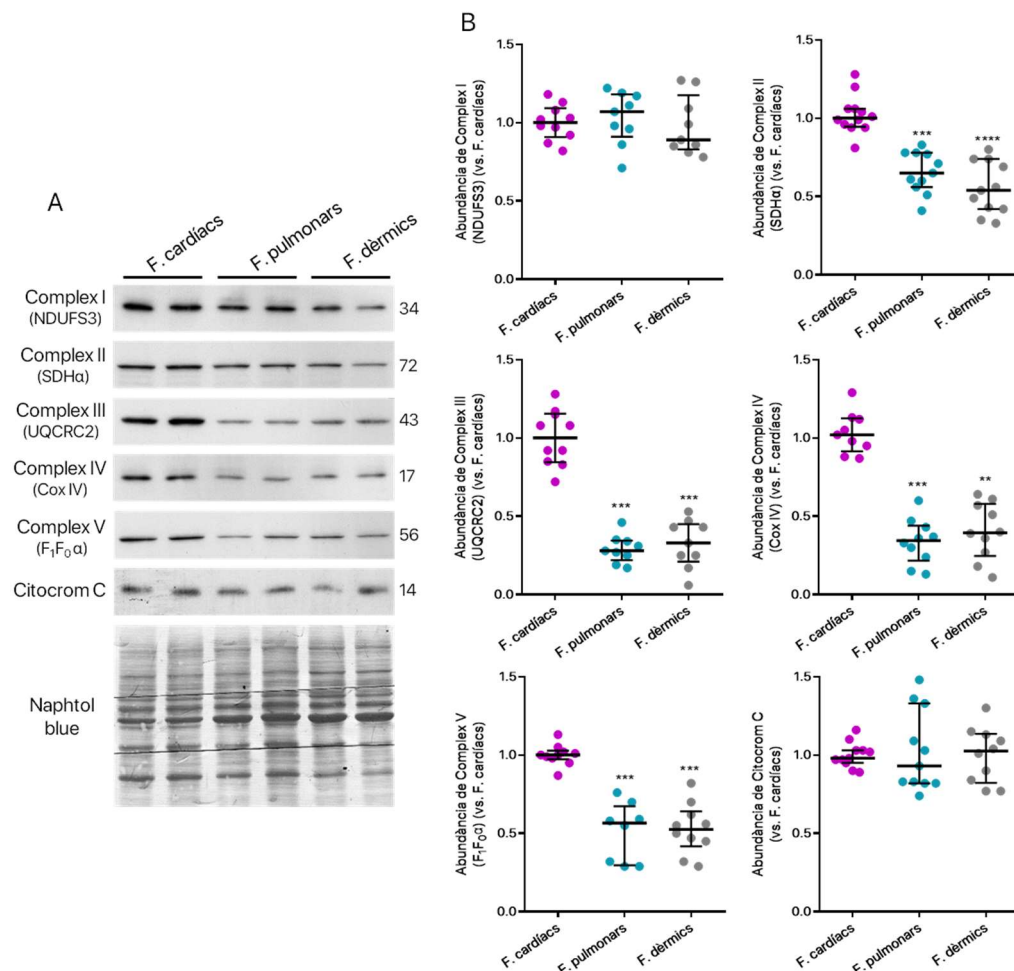


Figura 15. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de les subunitats dels complexos II, III, IV i V però no del complex I ni de citocrom C. Expressió de subunitats dels diferents components de la cadena de transport electrònic en condicions basals dels diferents tipus de fibroblasts. (A) Anàlisi de l'expressió de les subunitats NDUFS3 (complex I), SDH α (complex II), UQCRC2 (complex III), Cox IV (complex IV), F₁F₀ α (complex V) i de citocrom C, mitjançant Western Blot. El Naphtol blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions basals. En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil de 10 experiments independents (n=10). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (***p≤0.0001, **p≤0.001, *p≤0.01 vs. F. cardíacs).

Tal i com s'ha explicat a la introducció (apartat 2.4.2.1), els complexos de la cadena de transport electrònic es troben organitzats en supercomplexos per un transport dels electrons més eficient. Degut al resultat de l'expressió diferencial dels complexos en els fibroblasts cardíacs, es podria pensar que el contingut de supercomplexos o l'associació de complexos de la cadena respiratòria és diferent als fibroblasts cardíacs i això podria tenir un impacte tant en el consum d'oxigen, com en la capacitat de reserva i la producció de ROS per aquests fibroblasts.

Degut a que l'expressió de Citocrom C (com a component mòbil de la cadena de transport electrònic) no variava en els diferents tipus de fibroblasts, vam voler analitzar l'altre element mòbil, el Coenzim Q. Pel que fa al coenzim Q, es va analitzar la quantitat de coenzim Q₉ i Q₁₀ (les dues isoformes que es troben en rosegadors, tot i que és més abundant el CoQ₉) en els seus dos estats: reduït i oxidat (ràtio CoQH₂/CoQ) i la quantitat total. No vam detectar diferències en aquests paràmetres entre els diferents fibroblasts pel que fa a la ràtio de coenzim Q₁₀H₂/Q₁₀ ni en la quantitat total de CoQ₉ ni CoQ₁₀, no obstant, hi ha una tendència d'una ràtio més baixa de Q₉H₂/Q₉ en els fibroblasts cardíacs, és a dir, nivells més baixos de CoQ₉H₂ (Figura 16).

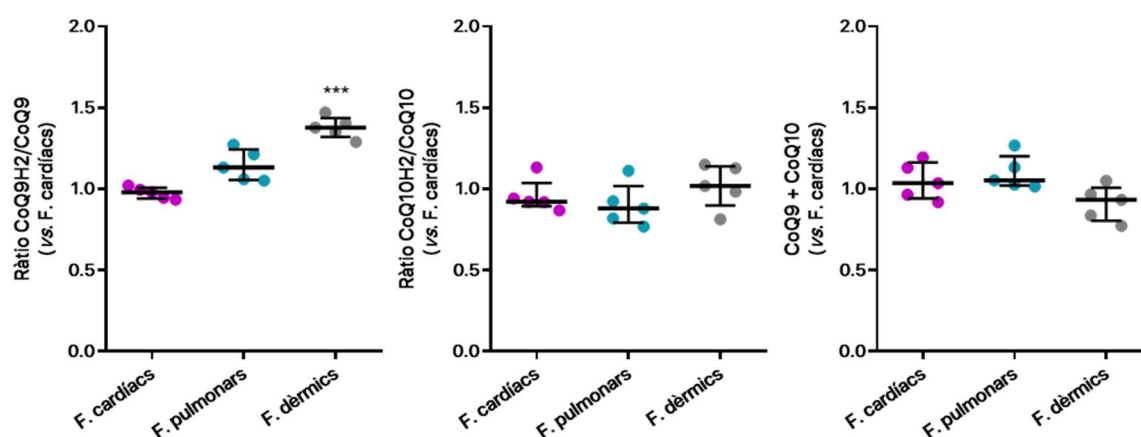


Figura 16. Els fibroblasts cardíacs mostren una tendència a una ràtio més baixa de CoQ9H₂/CoQ9, però no hi ha diferències en la ràtio CoQ10H₂/CoQ10, ni en la quantitat total de CoQ9 i CoQ10. Ràtios CoQ9H₂/CoQ9 i CoQ10H₂/CoQ10 i quantitat total de CoQ9 i CoQ10 mitjançant LC-MS. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs. En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil de 5 cultius independents (n=5). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (***)p≤0.001 vs. Fibroblasts cardíacs).

4.4 Estudi de l'origen dels ROS als fibroblasts

En el model cardíac, en particular durant la isquèmia i reoxigenació posterior, s'ha relacionat un augment de ROS a través de la cadena de transport electrònic amb un augment dels nivells de succinat que té lloc durant la hipòxia i que ràpidament és oxidat durant la reoxigenació, augmentant el flux d'electrons cap al CoQ i el complex III. Això està associat al retorn dels electrons del CoQ reduït al complex I (RET, *reverse electron transport*) i a un alt potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) degut a l'elevada taxa de bombeig de protons pels complexos III i IV, segons el model proposat per Chouchani et al. 2014 (Chouchani et al., 2014). A més, els grups de Luke O'Neill a Irlanda, Evanna

Mills a Harvard i Michael Murphy al Regne Unit han mostrat que el succinat és un regulador metabòlic important en el control de processos inflamatoris, l'activitat respiratòria mitocondrial i la producció de ROS al sistema immunitari (Tannahill et al., 2013; Mills et al., 2016; Murphy and O'Neill, 2018).

Per investigar si el RET estava implicat en l'elevada producció de ROS en condicions basals en els fibroblasts cardíacs, vam decidir començar per analitzar els nivells de succinat dels diferents fibroblasts i el $\Delta\Psi_m$. Les dades van mostrar nivells més elevats de succinat en els fibroblasts cardíacs en condicions basals respecte als altres tipus de fibroblasts i també un $\Delta\Psi_m$ més elevat (Figura 17A-B). Aquestes dades suggerien la possibilitat de RET als fibroblasts cardíacs. Tot i això, els nivells de CoQH_2 eren iguals o inferiors en els fibroblasts cardíacs (Figura 16). Per analitzar-ho amb més detall, vam quantificar els nivells de ROS dels diferents fibroblasts en presència de Rotenona ($1\ \mu\text{M}$), que impedeix la interacció entre el complex I i el CoQ, per tal d'impedir el retorn d'electrons del CoQ al complex I (Scialò et al., 2017). Està descrit que en cas de RET, la rotenona provoca una disminució en la producció de ROS ja que evita el retorn de protons transportats pel CoQH_2 , mentre que si l'origen dels ROS és al complex I, la rotenona incrementa la producció d'aquests ja que els electrons no poden ser donats al CoQ oxidat (Chouchani et al., 2014; Scialò et al., 2017). Les nostres dades mostraven un increment dels ROS en presència de rotenona (Figura 17C), els resultats, per tant, suggereixen que tot i existir més quantitat de succinat i un potencial de membrana mitocondrial més elevat als fibroblasts cardíacs que als altres, la producció més elevada de ROS no està relacionada amb el transport revers d'electrons cap al complex I, sinó que sembla que els ROS són generats a nivell del complex I sense la implicació de CoQ.

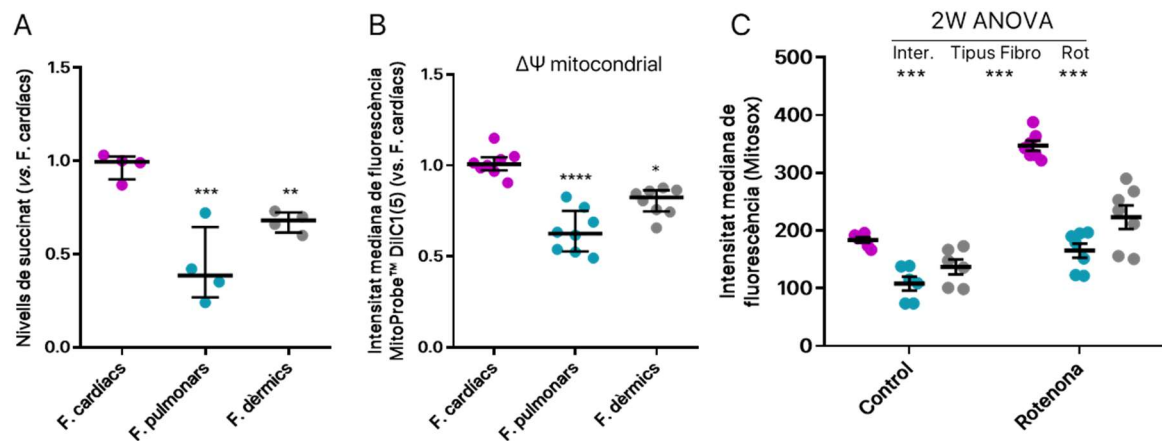


Figura 17. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells més alts de succinat, un potencial de membrana mitocondrial més elevat i l'addició de rotenona incrementa més els ROS en els fibroblasts cardíacs. (A) Quantificació dels nivells de succinat (nmol) en condicions basals mitjançant el kit Succinate Assay d'Abcam (N=4). (B) Quantificació del potencial de membrana mitjançant marcatge amb la sonda MitoProbe™ DiIC1(5) en condicions basals (N=8). (C) Determinació de la producció de l'anió superòxid (O_2^-) mitocondrial mitjançant marcatge amb la sonda MitoSOX™ Red en condicions basals i amb rotenona ($1\ \mu\text{M}$) (N=7). En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil. (A,B) S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (*** $p\leq 0.0001$ | *** $p\leq 0.001$ | ** $p\leq 0.01$ | * $p\leq 0.05$ vs. Fibroblasts cardíacs) i (C) el test 2way ANOVA, que indica que les diferències degudes al tipus de fibroblast i les degudes al tractament amb rotenona són significatives (** $p\leq 0.001$) i a més, hi ha interacció significativa entre les dues variables. Rot: Rotenona.

5. Anàlisi de la biogènesi i dinàmica mitocondrial

Degut a la major capacitat respiratòria i l'elevada expressió dels complexos II a V de la cadena respiratòria als fibroblasts cardíacs, tot i el manteniment aparent de l'expressió d'altres proteïnes mitocondrials i el CoQ, vam voler analitzar si això es trobava associat a una major abundància de mitocondris. Primer vam analitzar l'expressió de diverses proteïnes mitocondrials no relacionades amb la fosforilació oxidativa, com la Dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD), un enzim que es localitza a la matriu mitocondrial, i la Porina (VDAC1), que es troba a la membrana mitocondrial externa. Tal i com es mostra a la Figura 18A-B, no vam trobar diferències evidents en l'expressió de proteïnes mitocondrials de membrana ni de matriu com la DLD i la VDAC1. Tampoc vam trobar canvis en l'expressió de les endonucleases mitocondrials Endog i Exog (dades no mostrades). A més, vam analitzar si hi havia diferències en l'àrea cel·lular i en la massa mitocondrial als diferents fibroblasts. Les dades indicaven que, en cultiu, els fibroblasts cardíacs tenen una àrea cel·lular més gran ($168 \pm 69 \mu\text{m}^2$) que els fibroblasts pulmonars ($135 \pm 52 \mu\text{m}^2$) i els fibroblasts dèrmics ($138 \pm 52 \mu\text{m}^2$) (Figura 18C), però no vam trobar diferències en quant a la massa mitocondrial (Figura 18D).

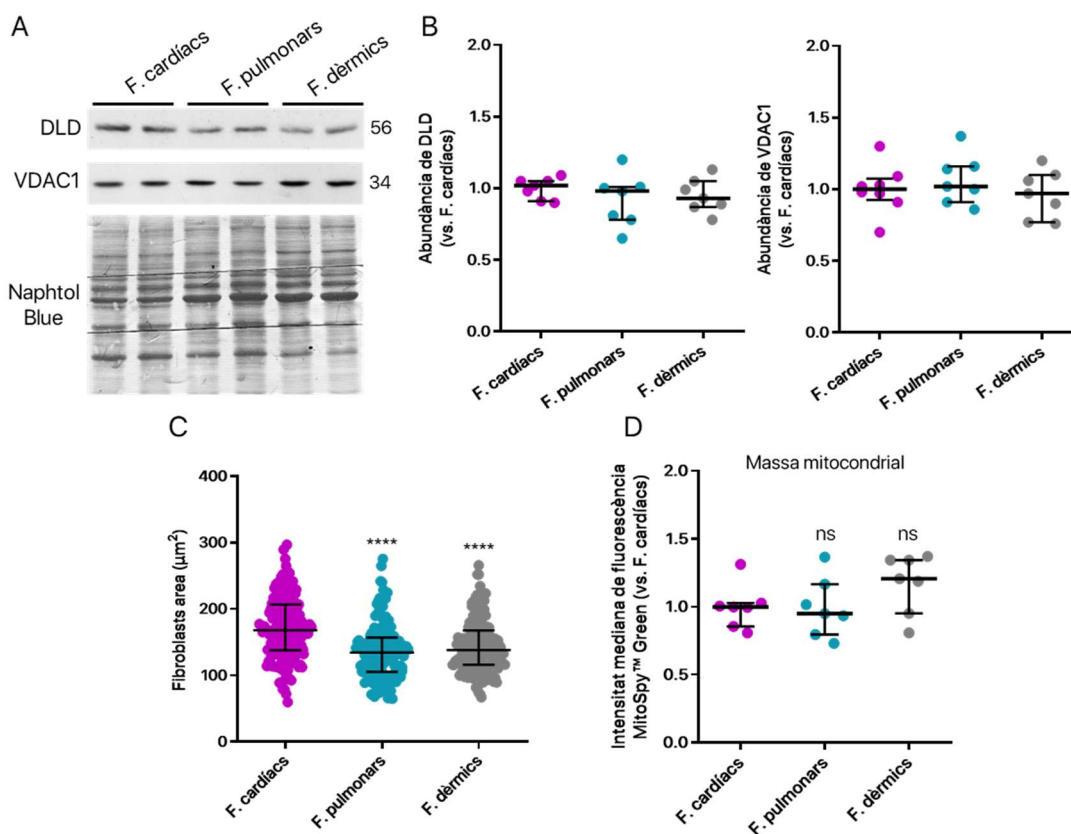


Figura 18. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells similars de proteïnes mitocondrials i tenen la mateixa massa mitocondrial tot i tenir una àrea cel·lular més gran. (A) Anàlisi de l'expressió dels marcadors mitocondrials de matriu, DLD, i de membrana externa, VDAC1, mitjançant Western Blot dels diferents tipus de fibroblasts en condicions basals. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots de DLD i VDAC1. (C) Quantificació de l'àrea (μm^2) dels diferents fibroblasts mitjançant el programa ImageJ (N=150). (D) Quantificació de la massa mitocondrial mitjançant marcatge amb la sonda MitoSpyTM Green FM en condicions basals. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs. En els gràfics s'observa mediana \pm rang interquartil de 7 experiments independents (N=7). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$, * $p \leq 0.05$ vs. Fibroblasts cardíacs).

Com que el consum d'oxigen i la fosforilació oxidativa poden ser regulats també per canvis en l'organització i distribució dels mitocondris que, al seu torn, és controlada per una sèrie de proteïnes promotores de fusió i fissió mitocondrial (revisat a Schrepfer and Scorrano, 2016), a continuació vam analitzar l'expressió d'algunes d'aquestes proteïnes, en concret la Mfn2 i Opa-1 implicades en la fusió mitocondrial, Drp1 crucial en la fissió mitocondrial i Tfam i Pgc1- α , que controlen diversos aspectes de la transcripció de gens implicats en la biogènesi i dinàmica mitocondrial que es descriuen a l'apartat 2.2 de la Introducció. Pel que fa a la dinàmica mitocondrial, vam trobar que els fibroblasts cardíacs expressaven nivells més baixos de Mfn2 mentre que no vam detectar diferències d'expressió d'Opa-1 i Drp1, suggerint una menor capacitat de fusió mitocondrial als fibroblasts cardíacs respecte als altres tipus de fibroblasts estudiats. Pel que fa a la biogènesi mitocondrial, els fibroblasts cardíacs expressaven nivells més baixos de Pgc1- α però no hi havia diferències d'expressió de Tfam entre els diferents fibroblasts (Figura 19).

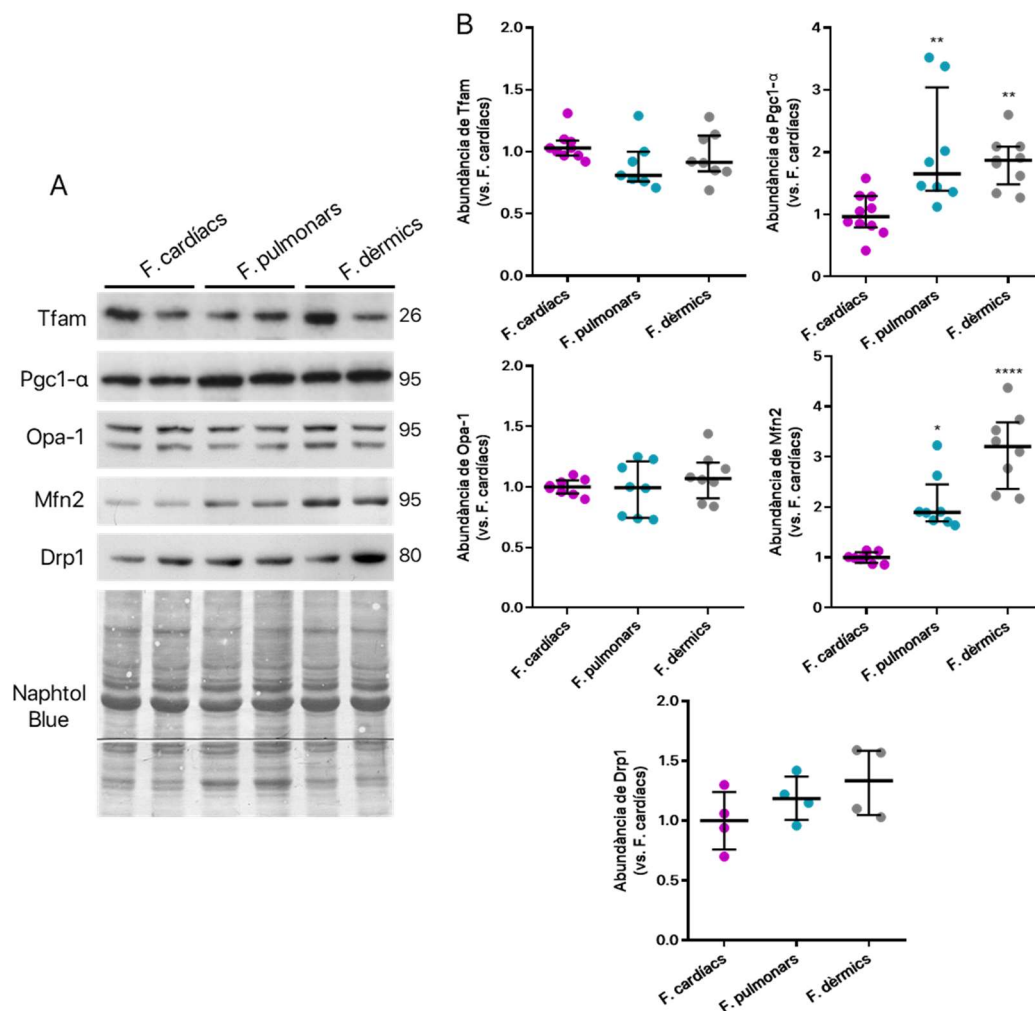


Figura 19. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més baixos de Pgc1- α i Mfn2, i nivells similars de Tfam, Opa-1 i Drp1 que els fibroblasts pulmonars i dèrmics. Expressió de marcadors de dinàmica mitocondrial en condicions basals dels diferents tipus de fibroblasts. (A) Anàlisi de l'expressió Tfam, Pgc1- α , Opa-1, Mfn2 i Drp1 mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue (NB) es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots de Tfam, Pgc1- α , Opa-1, Mfn2 i Drp1. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions basals. En els gràfics s'observa mediana \pm rang interquartil de 4-8 experiments independents (n=4-8). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (****p \leq 0.0001, **p \leq 0.01, *p \leq 0.05 vs. Fibroblasts cardíacs).

Degut a que vam trobar diferències d'expressió en algunes proteïnes clau pel control de la biogènesi i dinàmica mitocondrial, vam voler estimar el nivell de fusió mitocondrial dels diferents tipus de fibroblasts. Per això, vam visualitzar el patró de distribució mitocondrial mitjançant microscòpia de fluorescència i la detecció de l'enzim mitocondrial DLD. La Figura 20 mostra que els fibroblasts cardíacs tenien un patró de distribució mitocondrial més fragmentat que els fibroblasts pulmonars i els fibroblasts dèrmics, que presentaven unes branques mitocondrials més llargues. Això es tradueix en un major nombre de mitocondris aïllats (individuals) en els fibroblasts cardíacs, amb uns valors mitjans de 134 per fibroblasts cardíacs, 90 per fibroblasts pulmonars i 107 per fibroblasts dèrmics.

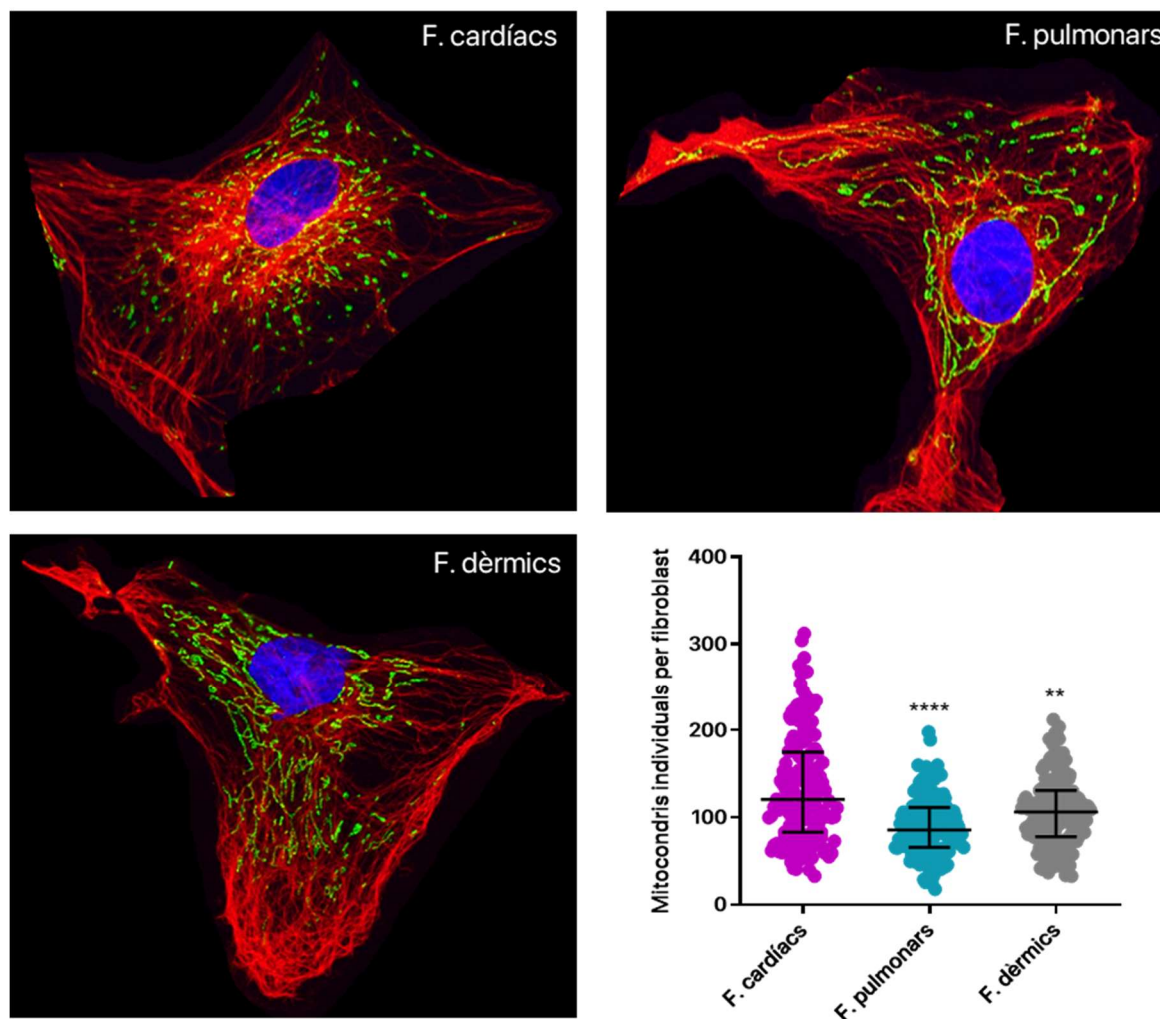


Figura 20. Els fibroblasts cardíacs tenen més mitocondris aïllats (individuals) amb un patró de distribució mitocondrial més fragmentat. Anàlisi de la distribució mitocondrial dels diferents tipus de fibroblasts en condicions basals marcats mitjançant immunofluorescència amb DLD (matriu mitocondrial, verd), α -tubulina (vermell) i Hoechst (nuclis, blau), i quantificació del nombre de mitocondris aïllats (individuals) dels diferents fibroblasts mitjançant el programa ImageJ amb el macro MiNa2. En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de 150 fibroblasts de cada tipus de 3 experiments independents (N=3). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (*** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.01$ vs. Fibroblasts cardíacs).

Les nostres dades mostren que, en relació a altres tipus de fibroblasts, els fibroblasts cardíacs tenen un contingut mitocondrial similar, però aquest es troba organitzat de forma diferent amb una major proporció de mitocondris no connectats en xarxa. En acord amb una massa mitocondrial similar però organitzada de forma diferent, els fibroblasts cardíacs tenen expressió similar a altres fibroblasts

de moltes proteïnes mitocondrials no relacionades amb la cadena respiratòria, major expressió dels complexos II a V i menor expressió de Pgc1- α i Mfn2. Tot això mostra l'existència d'una adaptació particular del sistema mitocondrial que podria anar més enllà del control respiratori i afectar la seva relació amb el reticle endoplasmàtic ja que, per exemple, Mfn2 s'ha implicat en la interacció del mitocondri amb el reticle (Naon et al., 2016). Per això vam decidir estudiar l'existència de possibles diferències en la resposta a estrès de reticle endoplasmàtic (ER).

6. Anàlisi de la resposta dels fibroblasts a l'estrès de reticle

A més de contribuir a la fusió entre mitocondris, la Mfn2 participa en nombroses unions amb altres orgànuls, com l'ER, els lisosomes i els peroxisomes entre altres. Concretament, les unions mitocondri-ER són eixos importants pel tràfic de lípids, la dinàmica mitocondrial, la senyalització de Ca^{2+} , l'estrès d'ER i l'apoptosi (Gordaliza-Alaguero et al., 2019). Tenint en compte això, i la baixa expressió de Mfn2 als fibroblasts cardíacs, ens vam preguntar si els fibroblasts cardíacs responien de manera diferent a l'estrès de reticle en comparació als altres fibroblasts. Per tant, vam tractar els diferents fibroblasts en condicions basals durant un període de fins a 48h amb dues molècules utilitzades per induir estrès de reticle (Muñoz et al., 2013), la Tunicamicina (Tun, 5 μ M) que inhibeix la glicosilació de proteïnes, i la Thapsigargina (Thap, 2,5 μ M) que inhibeix l'ATPasa de Ca^{2+} del reticle endoplasmàtic, i després vam analitzar la supervivència. El resultat va ser que la inducció d'estrès de reticle només provocava un 15% de mort en els fibroblasts cardíacs, comparat amb el 40% als fibroblasts pulmonars i el 50% als fibroblasts dèrmics (Figura 21).

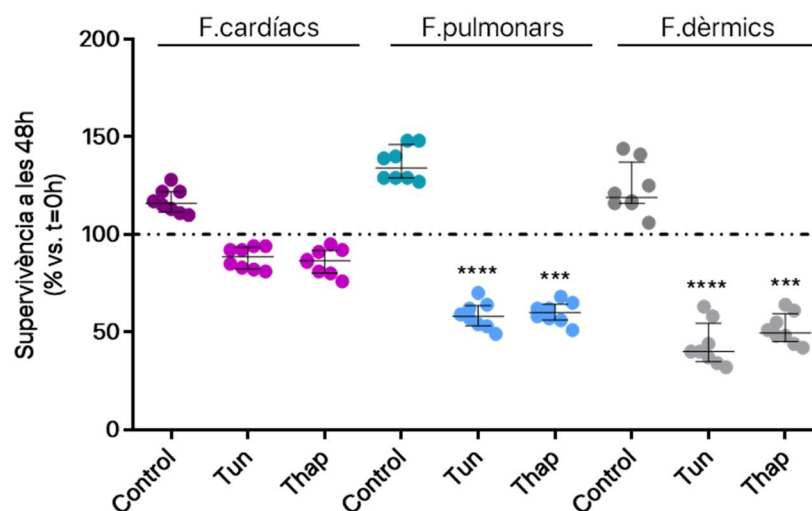


Figura 21. Els fibroblasts cardíacs són més resistents a la inducció de mort per estrès de reticle amb Tunicamicina i Thapsigargina respecte als altres fibroblasts. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 48h en condicions basals (\pm Tun 5 μ M/Thap 2,5 μ M). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment d'afegir la Tun/Thap (t=0h). En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de 8 experiments independents (N=8). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$ vs. Control de cada tipus de fibroblast).

Aquests resultats ens van portar a determinar l'expressió d'algunes proteïnes implicades en la resposta a l'estrès de reticle, com la xaperona de reticle α BIP, i els components de la via iniciada per PERK: p-eIF2 α , ATF4 i GADD153/CHOP, a més de la Caspasa-3 total i processada com a indicador d'apoptosi i Bcl-2 per la seva expressió diferencial en els fibroblasts cardíacs i la seva proposada implicació en el control de la mort cel·lular per estrès de reticle (McCullough et al., 2001). L'anàlisi de l'expressió (Figura 22) i l'estudi densitomètric (Figura 23) dels gens relacionats amb la via d'estrès de reticle van mostrar que els fibroblasts cardíacs induïen l'expressió d' α BIP, p-eIF2 α i ATF4 de forma similar a la resta, però l'efecte sobre LC3 era menor, així com el processament (activació) de Caspasa-3, el què estava d'acord amb una major mortalitat dels fibroblasts pulmonars i dèrmics. De forma interessant, tot i que l'expressió de Bcl-2 disminuïa de forma semblant a tots els fibroblasts, els fibroblasts cardíacs aconseguïen mantenir uns nivells més alts durant la fase d'estrès, gràcies a la major expressió en condicions basals.

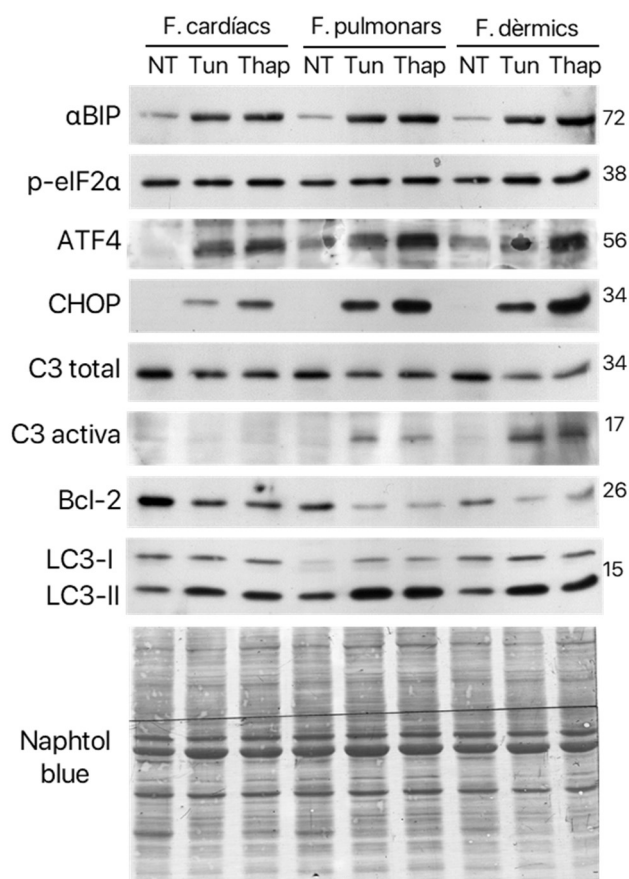


Figura 22. El tractament amb els inductors d'estrès de reticle Tunicamicina i Thapsigargina induïen canvis similars a la via PERK als diferents fibroblasts en quant a α BIP, p-eIF2 α i ATF4, però no en l'activació de Caspasa-3 i LC3. Anàlisi de l'expressió d' α BIP, p-eIF2 α , ATF4, CHOP, Caspasa-3, Bcl-2 i LC3 dels diferents fibroblasts en condicions basals \pm Tun/Thap mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. La imatge és representativa de 3 experiments independents amb resultats similars (N=3). NT: No tractat; Tun: Tunicamicina 5 μ M; Thap: Thapsigargina 2,5 μ M, 48h.

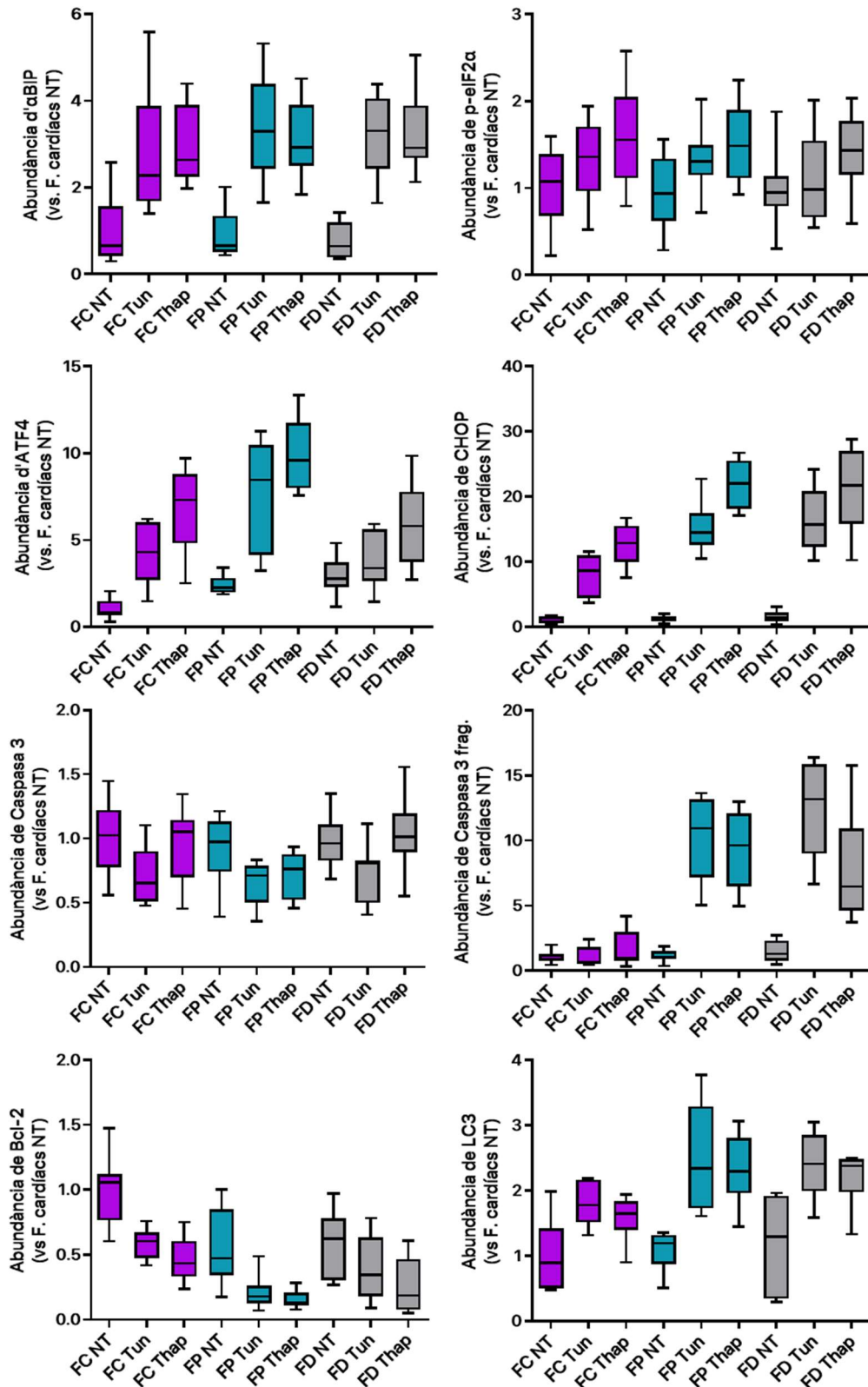


Figura 23. El tractament amb els inductors d'estrès de reticle Tunicamicina i Thapsigargina indueixen canvis similars a la via PERK als diferents fibroblasts en quant a α BIP, p-eIF2 α i ATF4, però no en l'activació de Caspasa-3 i LC3. Estudi densitomètric de la detecció d' α BIP, p-eIF2 α , ATF4, CHOP, Caspasa-3, Bcl-2 i LC3. Els valors representen canvis relacionats amb la mitja del valor dels fibroblasts cardíacs sense tractament. En els gràfics s'observa mediana \pm rang interquartil de 3 experiments independents (N=3). FC: Fibroblasts cardíacs; FP: Fibroblasts pulmonars; FD: Fibroblasts dèrmics; NT: No tractat; Tun: Tunicamicina 5 μ M; Thap: Thapsigargina 2,5 μ M, 48h.

A rel d'aquests resultats, vam voler analitzar si Bcl-2 conferia resistència als fibroblasts cardíacs en front a l'estrès de reticle. Per això, vam silenciar l'expressió de *Bcl2* utilitzant vectors lentivirals i vam analitzar la supervivència en condicions normals i després de 48 hores de tractament amb Thapsigargina. Vam poder observar que la repressió del gen *Bcl2* genera una disminució en la proliferació/viabilitat dels fibroblasts cardíacs, com es mostra a l'inici de l'apartat de resultats, i també va incrementar la mort durant l'estrès de reticle, arribant als valors de mort similars als observats en fibroblasts pulmonars i dèrmics, assolint unes diferències estadísticament significatives (Figura 24).

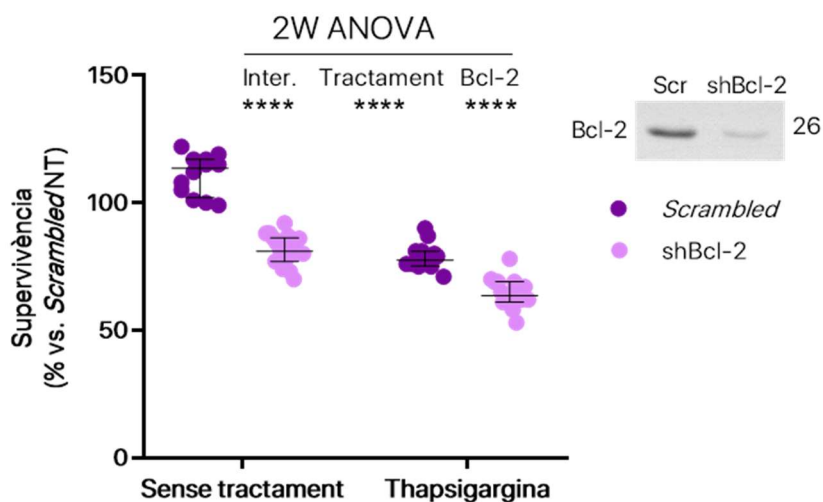


Figura 24. El silenciament de *Bcl2* als fibroblasts cardíacs redueix la seva supervivència tant en condicions control com en presència de l'inductor d'estrès de reticle Thapsigargina. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 72h post-transducció en condicions control i amb Thapsigargina (48h). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment d'afegir el tractament (t=0h). En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 6 experiments independents per duplicat (N=6). El silenciament de l'expressió de Bcl-2 sempre es confirma per Western Blot. L'anàlisi estadístic per 2W ANOVA indica que les diferències degudes a l'expressió de Bcl-2 i les degudes al tractament són significatives (**** $p \leq 0.0001$) i a més, hi ha interacció significativa entre les dues variables. Scr: *Scrambled*.

A continuació, vam realitzar l'anàlisi de l'expressió dels principals transductors de la via PERK a temps més curts (2, 4, 6, 12 i 24h), per tal d'esbrinar si la menor expressió de CHOP als fibroblasts cardíacs era deguda a una menor inducció d'estrès en aquest òrganul. La comparació de la resposta a la Thapsigargina dels fibroblasts cardíacs i dels dèrmics mostra que aquesta va induir nivells similars d'expressió d' α BIP, p-eIF2 α , ATF4 i CHOP a temps curts en tots dos tipus de fibroblasts (Figura 25). Els resultats mostraven també que Caspasa-3 és processada (activada) als fibroblasts de pell a les 6 hores de tractament, a l'hora que hi havia un increment en l'abundància de LC3 més marcat en aquestes cèl·lules, suggerint que l'autofàgia també reacciona de forma diferent al tractament amb Thapsigargina als fibroblasts cardíacs. Així doncs, aquests resultats demostren que, a temps curts amb Thapsigargina, els fibroblasts cardíacs tenen una inducció similar de la via PERK als fibroblasts dèrmics.

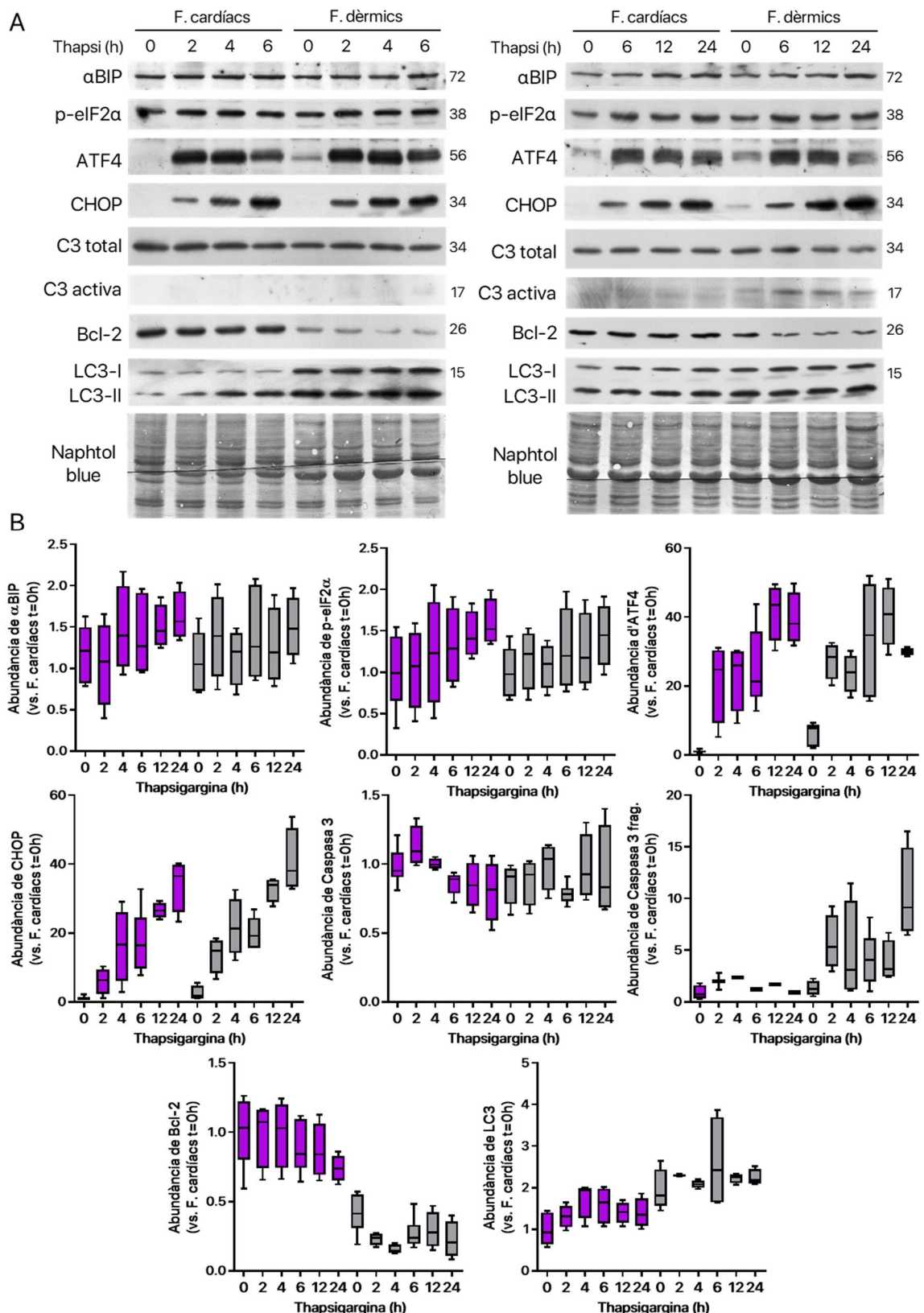


Figura 25. La Thapsigargina a temps curts indueix de manera similar la via PERK als fibroblasts cardíacs i als dèrmics, però no en la inducció de Caspasa-3, Bcl-2 i LC3. (A) Anàlisi de l'expressió d' α BIP, p-eIF2 α , ATF4, CHOP, Caspasa-3, Bcl-2 i LC3 dels fibroblasts cardíacs i dèrmics \pm Thapsigargina a 2h, 4h, 6h, 12h i 24h mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. La imatge és representativa de 3 experiments independents amb resultats similars (N=3). (B) Estudi densitomètric de la detecció de proteïnes de la via PERK, Bcl-2, Caspasa-3 i LC3. Les dades es normalitzen dividint per la mitja dels fibroblasts cardíacs sense tractar. En els gràfics s'observa mediana \pm rang interquartil de 3 experiments independents. Thapsigargina 2,5 μ M 2h, 4h, 6h, 12h i 24h.

7. Anàlisi de vies de senyalització que participen en la supervivència

Els resultats presentats fins aquí mostren l'existència d'un comportament diferencial dels fibroblasts cardíacs en relació a altres tipus de fibroblasts, tant a nivell funcional (major resistència a la mort per isquèmia, major capacitat respiratòria, millor control de ROS, més resistència a estrès de reticle), com d'organització d'òrgànuls (xarxa mitocondrial més fragmentada), com també a nivell d'expressió gènica (major expressió de proteïnes anti-apoptòtiques, més abundància de complexos de la cadena respiratòria i enzims antioxidants, i menys abundància de proteïnes relacionades amb la fusió mitocondrial). Per tant, vam voler esbrinar la possible existència de diferències en les vies de senyalització cel·lular que governen la supervivència i la resposta a estímuls estressants per tal d'identificar un possible eix central de regulació responsable de tots els canvis observats als fibroblasts cardíacs.

7.1 Anàlisi de la via RISK

Vam iniciar l'estudi de les vies de senyalització als fibroblasts cardíacs analitzant l'expressió i fosforilació (activació) en condicions normals i en isquèmia de la proteïna kinasa Akt/PKB que, com es descriu a l'apartat 3.5.1 de la introducció, és un dels principals components reguladors de funcions biològiques que controlen supervivència cel·lular, proliferació i metabolisme. La Figura 26 mostra que els nivells basals tant d'expressió com de fosforilació de la Ser⁴⁷³ (activadora) d'Akt són similars a tots tres tipus de fibroblasts. A més, durant el transcurs de la isquèmia experimental, vam detectar una davallada important tant de l'expressió com de la fosforilació d'Akt a tots els tipus de fibroblasts. El mateix patró es podia observar en els nivells d'expressió i fosforilació, en aquest cas inactivadora, de la Glucogen Sintasa Kinasa-3 (GSK-3 β), una de les principals dianes d'Akt. Això no correlacionava amb la major supervivència dels fibroblasts cardíacs.

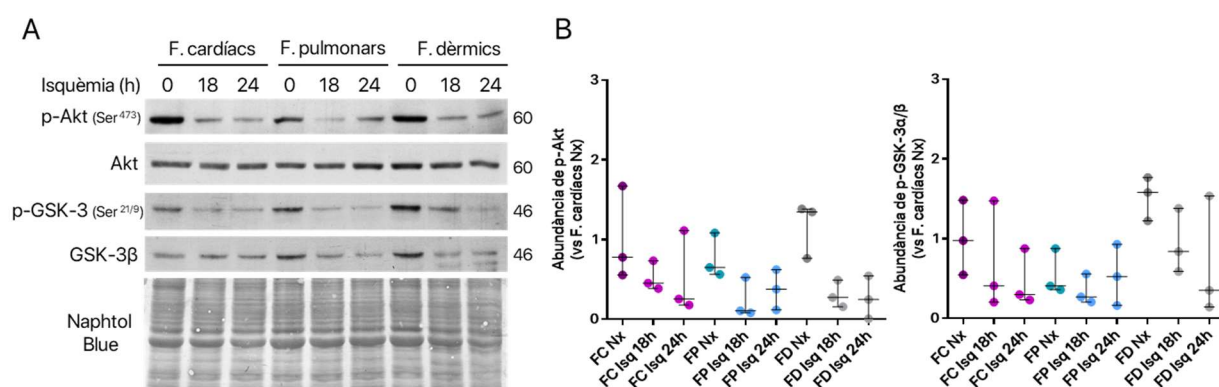


Figura 26. El nivell d'expressió i activació de la via de senyalització regulada per Akt és similar als tres tipus de fibroblasts. (A) Anàlisi de l'expressió i fosforilació d'Akt i el seu substrat GSK-3 a fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i d'isquèmia mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots de p-Akt i p-GSK-3 α/β . Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia. En els gràfics s'observa mediana \pm rang interquartil de 3 experiments independents (N=3). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (No significatiu vs. F. cardíacs Nx). FC: F. cardíacs; FP: F. pulmonars; FD: F. dèrmics; Nx: Normòxia; Isq: Isquèmia.

7.2 Anàlisi de la via Nrf2

El factor de transcripció Nrf2 té un paper fonamental en el manteniment de l'homeòstasi redox cel·lular, regulant gens implicats en la resposta antioxidant, la inflamació i l'autofàgia, entre altres (Liu et al., 2019). A més, s'havia suggerit que Nrf2 pot controlar l'expressió de Bcl-2 (Niture and Jaiswal, 2012). Tenint en compte els resultats anteriors sobre els nivells de ROS i l'expressió d'enzims neutralitzadors dels ROS, vam decidir analitzar la possible implicació de la via Nrf2 en la supervivència dels fibroblasts cardíacs. Per això, primer vam analitzar els nivells d'expressió de *Nrf2* a nivell de transcrit (ARNm) en condicions basals i la seva capacitat per regular l'expressió de Bcl-2 als fibroblasts cardíacs. Tal i com es mostra a la Figura 27, els fibroblasts cardíacs tenien nivells similars d'expressió de *Nrf2* que els altres tipus de fibroblasts en condicions basals. A més, la repressió del gen Nrf2 utilitzant diversos vectors per induir interferència d'ARN no va generar una resposta homogènia sobre l'expressió de Bcl-2. Per tant, no sembla que la via Nrf2 estigui implicada en la supervivència dels fibroblasts cardíacs ni en el control de l'expressió de Bcl-2 en aquestes cèl·lules.

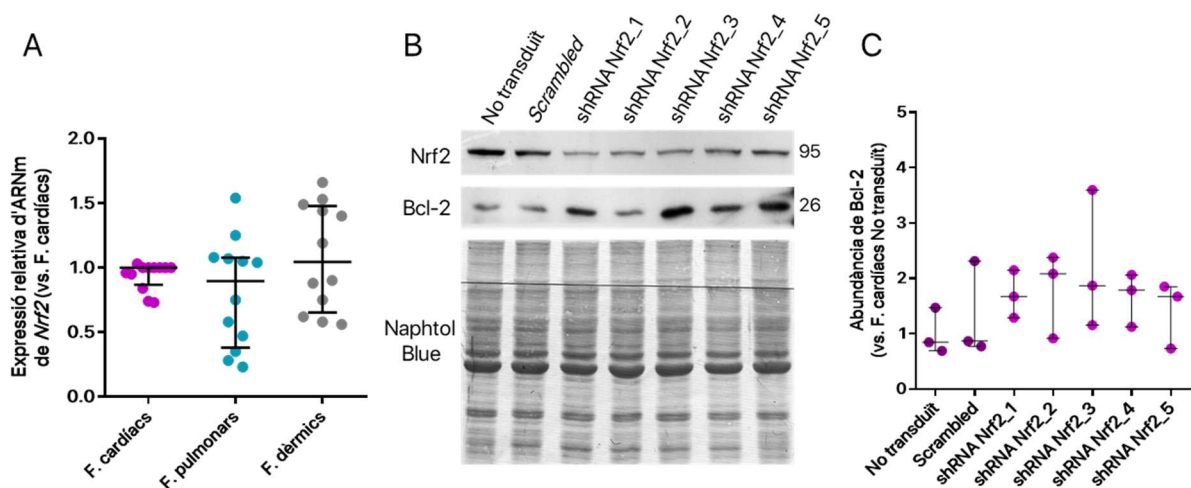


Figura 27. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells similars de transcrit (ARNm) de *Nrf2* als altres tipus de fibroblasts i *Nrf2* no regula l'expressió de Bcl-2. (A) Abundància relativa de transcrit de *Nrf2* als fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics en condicions basals. En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 12 experiments independents (N=12). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (no significatiu vs. Fibroblasts cardíacs). (B) Western Blot que mostra els efectes del silenciament gènic de *Nrf2* per transducció lentiviral d'un plàsmid *Scrambled* (control) i 5 shRNAs específics de *Nrf2* diferents en l'expressió de *Nrf2* i de Bcl-2 a fibroblasts cardíacs. (C) Anàlisi densitomètrica de Bcl-2 (N=3). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (No significatiu vs. No transduït). Scr: *Scrambled*.

7.2 Anàlisi de la via HIF1

El factor 1 induïble per hipòxia (HIF1) és un factor de transcripció que activa l'expressió de multiplicitat de gens durant la hipòxia generant respostes d'adaptació a la manca d'oxigen, com s'ha descrit a l'apartat 3.5.3 de la Introducció. La subunitat HIF1 α és normalment degradada per ubiquïtinització, però és estabilitzada a baixes pressions d'oxigen permetent la seva activitat inductora de la

transcripció. Per això vam voler analitzar l'expressió de HIF1 α en condicions de normòxia i durant la isquèmia, amb un anticòs validat amb el ratolí *knock out* segons indicava el proveïdor. Els resultats mostren que hi havia tendència a l'acumulació de HIF1 α en isquèmia, més clara a les 24 hores, i en especial, als fibroblasts cardíacs, però sense observar-se cap diferència rellevant entre els diferents tipus de fibroblasts (Figura 28).

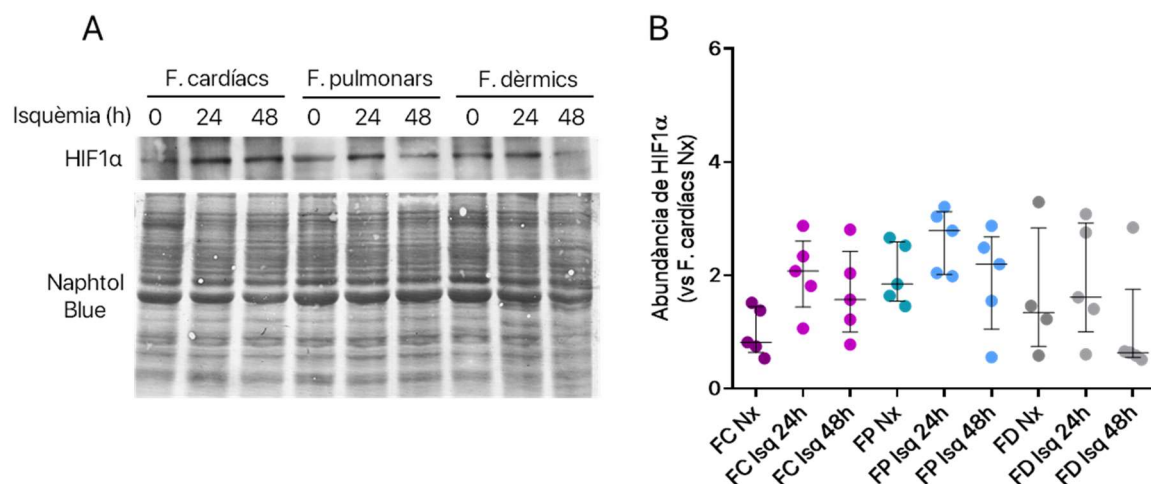


Figura 28. El factor de transcripció induïble per hipòxia HIF1 α mostra tendència a acumular-se durant la isquèmia, sense diferències entre els tres tipus de fibroblasts. (A) Western Blot de HIF1 α en condicions de normòxia i d'isquèmia (24h i 48h) en els diferents tipus de fibroblasts. (B) Anàlisi densitomètrica de HIF1 α . Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia. En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 5 experiments independents (N=5). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (No significatiu vs. F. cardíacs Nx). FC: F. cardíacs; FP: F. pulmonars; FD: F. dèrmics. Nx: Normòxia; Isq: Isquèmia.

7.2 Anàlisi de la via cGAS-STING

Recentment s'ha descrit la implicació de la via cGAS-STING en processos cel·lulars activats per estrès mitocondrial, en particular estrès oxidatiu i amb trets similars als desencadenats per l'entrada d'ADN forani (com per exemple, ADN viral), que impliquen canvis en la distribució de l'ADN mitocondrial (Riley and Tait, 2020). L'activació d'aquesta via promou la transcripció de gens estimulats per interferó (ISGs), entre els que destaca *Isg15*, implicada en el procés d'ISGilació, com es descriu a l'apartat 3.6.2 de la introducció, generant una situació pro-inflamatòria. Per això vam decidir analitzar l'expressió d'*Isg15* a nivell de transcrit (ARNm) als tres tipus de fibroblasts en condicions basals. Com es mostra a la Figura 29, els fibroblasts cardíacs van presentar nivells més elevats de transcrit d'*Isg15* en condicions basals en comparació als fibroblasts pulmonars i dèrmics, suggerint una major activació de la via d'interferó.

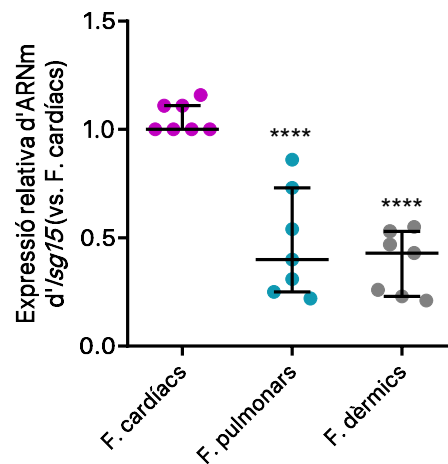


Figura 29. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells més elevats de transcrit (ARNm) d'Isq15 que els altres tipus de fibroblasts. Abundància relativa de transcrit d'Isq15 en els fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics en condicions basals. En el gràfic s'observa mediana±rang interquartil de 7 experiments independents (N=7). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**** $p \leq 0.0001$ vs. Fibroblasts cardíacs).

7.3 Anàlisi de la via NF- κ B

La via NF- κ B és activada, entre d'altres, per estrès cel·lular, citocines i ROS i regula multitud de funcions, entre les quals destaca la supervivència cel·lular, activant gens que codifiquen per citocines inflammatòries, així com proteïnes proliferatives i anti-apoptòtiques, entre d'altres. NF- κ B ha sigut focus d'atenció en l'àmbit de la recerca en patologies cardíques, doncs sembla tenir un paper clau en la lesió miocàrdica en isquèmia i reperfusió, l'apoptosi i la insuficiència cardíaca, associat a la seva activació després d'una lesió aguda de miocardi. Aquest rol ha fet que sigui proposat com a diana terapèutica per prevenir la mort cel·lular (Dhingra et al., 2019). Per exercir la seva funció en l'activació de l'expressió dels gens diana, els estímuls inductors promouen l'entrada de p65/RelA a nucli, on exercirà la seva funció de regulador de la transcripció, com es descriu a l'apartat 3.6.1 de la Introducció. Tenint en compte els elevats nivells de ROS i la major supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions d'isquèmia en comparació als altres tipus de fibroblasts, així com l'elevada expressió d'Isq15 i que s'ha descrit que STING també activa el complex quinasa IKK de la via NF- κ B (Motwani et al., 2019), vam decidir analitzar la possibilitat de que la via NF- κ B estigui més activada als fibroblasts cardíacs, mitjançant l'anàlisi de l'expressió de p65 en fraccions nuclears i totals en condicions de normòxia i d'isquèmia experimental. Tal i com es mostra a la Figura 30, els fibroblasts cardíacs tenien nivells més elevats de p65 al nucli, tant en condicions de normòxia com d'isquèmia, mentre que el contingut total era similar al dels altres tipus de fibroblasts.

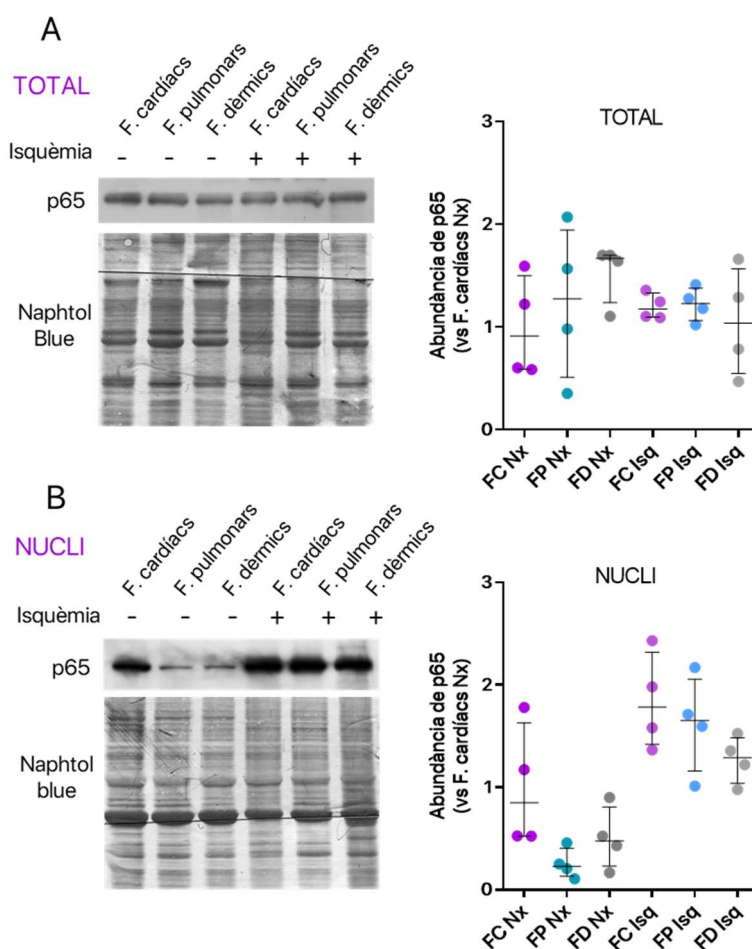


Figura 30. Els fibroblasts cardíacs tenen tendència a presentar nivells més elevats de p65 al nucli tant en condicions de normòxia com d'isquèmia. Es mostren Western Blots de p65 en extractes totals (A) i en la fracció nuclear (B) de fibroblasts cardíacs, pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i d'isquèmia (24h). El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. A la dreta es mostren els anàlisis densitomètrics de p65. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i en els gràfics s'observen la mediana±rang interquartil de 4 experiments independents (N=4). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (No significatiu vs. F. cardíacs Nx). Nx: Normòxia; Isq: Isquèmia.

NF- κ B té una gran variabilitat de funcions i es deu a la seva interacció amb altres factors de transcripció i proteïnes de senyalització, com Stat3 i Nrf2, factors reguladors de l'interferó (IRFs), PI3K-Akt, entre altres. En concret, NF- κ B i Stat3 controlen nombrosos processos fisiològics i s'activen ràpidament en resposta a diversos estímuls i estressos (Grivennikov and Karin, 2010; Taniguchi and Karin, 2018).

7.4 Anàlisi de la via SAFE

La relació i cooperació de la via NF- κ B i de Stat3 (Lee et al., 2009), ens va portar a analitzar la possible implicació de la via de Stat3 en la supervivència. A més, tal i com s'ha explicat en la introducció (apartat 3.5.1), la via SAFE és una via que s'activa durant la isquèmia i la isquèmia/reperfusió al cor. Concretament, s'ha suggerit que Stat3 està relacionat amb el control de la cadena de transport electrònic i la producció d'ATP i a més, augmenta l'expressió del gen antiapoptòtic Bcl-2 (Haga et al., 2003).

7.4.1 Caracterització de l'expressió basal

Donat els resultats que havíem obtingut, vam voler analitzar l'expressió de Stat3 i la seva fosforilació a la Tyr⁷⁰⁵ (pStat3) als tres tipus de fibroblasts. Com s'observa en la Figura 31A, els resultats van mostrar que els fibroblasts cardíacs en condicions basals expressen nivells més elevats de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵) que els altres tipus de fibroblasts amb una ràtio pStat3/Stat3 total més elevada (Figura 31B).

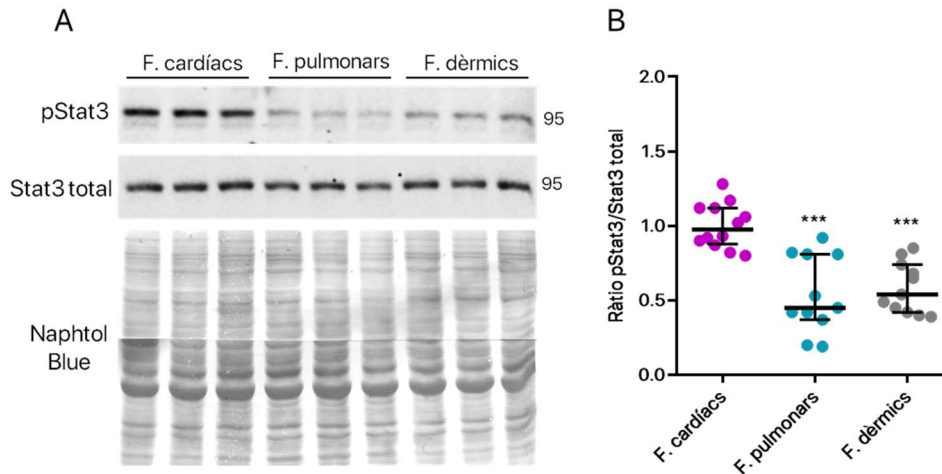


Figura 31. Els fibroblasts cardíacs expressen nivells més elevats de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵) que els altres fibroblasts. Expressió de pStat3 i Stat3 total en condicions basals en tres mostres independents dels diferents tipus de fibroblasts. (A) Anàlisi de l'expressió de pStat3 i Stat3 total mitjançant Western Blot dels diferents tipus de fibroblasts en condicions basals. El Naphtol blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Ràtio pStat3/Stat3 total. Les dades es normalitzen dividint per la mitja dels fibroblasts cardíacs en condicions basals. En els gràfics s'observa mediana ± rang interquartil de 12 experiments independents (N=12). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (***) p ≤ 0.001 vs. Fibroblasts cardíacs).

7.4.2 Efecte de la inhibició de pStat3

Degut a que vam detectar una elevada abundància de pStat3 als fibroblasts cardíacs en condicions basals i tenint en compte que Stat3 s'ha relacionat amb la respiració cel·lular (Wegrzyn et al., 2009) i la supervivència cel·lular, per exemple per sobre-activació en molts tipus de càncer, però també en la resposta del miocardi a la isquèmia com s'ha revisat a la Introducció, vam decidir determinar el potencial rol de Stat3 en la major supervivència durant la isquèmia als fibroblasts cardíacs. Per això, vam provocar la inhibició de Stat3 mitjançant el flavonolignà Silibinina (SBN), un inhibidor específic de Stat3 que impedeix la seva fosforilació en Tyr⁷⁰⁵ tant induïda com constitutiva i que a més, interfereix en la seva unió amb l'ADN (Verdura et al., 2018). Primer, vam caracteritzar la capacitat de la SBN per reduir la fosforilació de Stat3 als fibroblasts cardíacs. Per això, vam analitzar l'efecte de la SBN en l'expressió de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵) i Stat3 total a diferents dosis (25, 50, 75 i 100 μM) i temps d'incubació (12 i 24 hores). A la Figura 32 es mostra que la dosi de 100 μM va resultar en la major reducció en l'expressió de pStat3 i Stat3 total (Figura 32A), mentre que, a la mateixa dosi, s'assolia el màxim efecte a les 24 hores (Figura 32B).

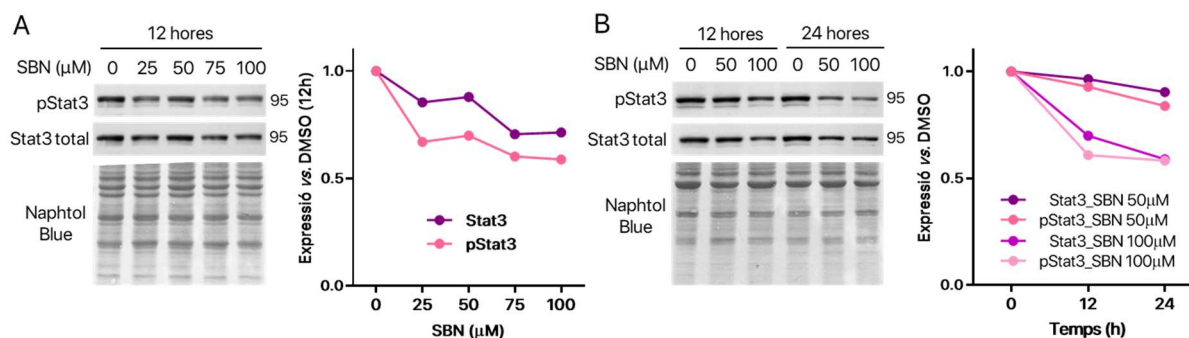


Figura 32. La Silibinina (SBN) induïx una disminució de l'expressió de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵) i Stat3 total de forma dependent de la dosi i el temps d'incubació. Es mostren Western Blots de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵) i Stat3 total de fibroblasts cardíacs tractats amb SBN en diferents dosis a 12 hores (A), i en dosis de 50μM i 100μM a 12 i 24 hores. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. A la dreta es mostren els anàlisi densitomètrics de pStat3 i Stat3 total. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs sense tractar.

A continuació, vam determinar la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i d'isquèmia tractats amb SBN (50 i 100 μM) durant 24h, i en paral·lel vam analitzar la viabilitat dels fibroblasts pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i d'isquèmia per tal de tenir un punt de referència de mort cel·lular. Les dades mostren que, de forma dependent de la dosi, la SBN disminuïa al voltant d'un 20% la supervivència dels fibroblasts cardíacs tant en condicions de normòxia com d'isquèmia experimental, arribant a nivells de mort cel·lular similars als dels fibroblasts pulmonars i dèrmics en condicions d'isquèmia experimental (Figura 33).

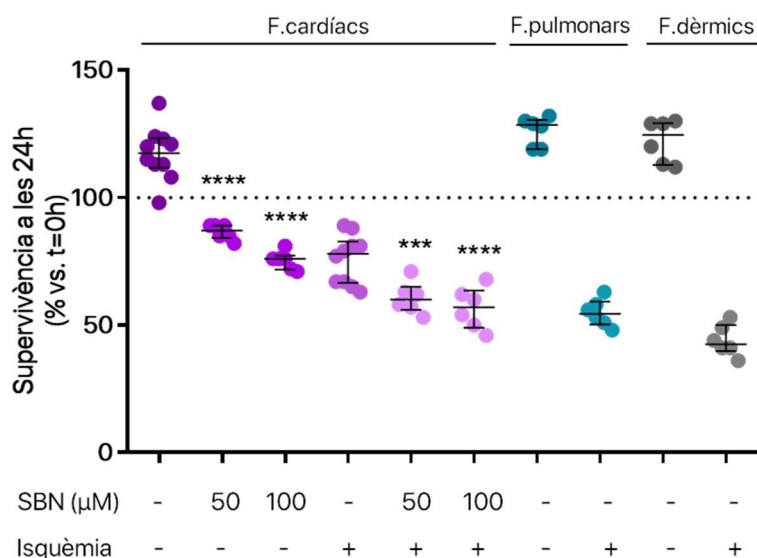


Figura 33. El bloqueig específic de la fosforilació de Stat3 amb la SBN afecta la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i d'isquèmia experimental. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 24h en condicions de normòxia i d'isquèmia (\pm SBN, 50/100 μM). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment d'afegir la Silibinina (t=0h). En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de 6 experiments independents (N=6). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunnett (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ vs. No tractament en cada condició en F. cardíacs).

La reducció en la supervivència observada als fibroblasts cardíacs per inhibició de Stat3 amb SBN ens va portar a voler caracteritzar amb més detall els aspectes bioquímics i moleculars subjacents. El primer que vam fer va ser analitzar els efectes de la SBN en l'expressió de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵), Stat3 total i altres proteïnes amb expressió diferent entre els fibroblasts cardíacs i els altres fibroblasts estudiats, per esbrinar si la seva expressió estava influenciada per Stat3. Com es mostra a la Figura 34, la SBN va induir una caiguda en l'abundància de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵), mentre que la quantitat total de Stat3 no va canviar de forma significativa. Això va anar acompanyat d'una reducció important en l'abundància de Catalasa, del complex II de la cadena respiratòria i de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-XL però no en la quantitat de MnSOD ni de Citocrom C. A més, en contra del què s'havia descrit en l'àmbit de la resposta cardíaca a la isquèmia, on s'ha establert el dogma que Stat3 activat indueix l'expressió de Bcl-2, els nostres resultats indiquen que no sembla que sigui així (Hattori et al., 2001; Lecour, 2009).

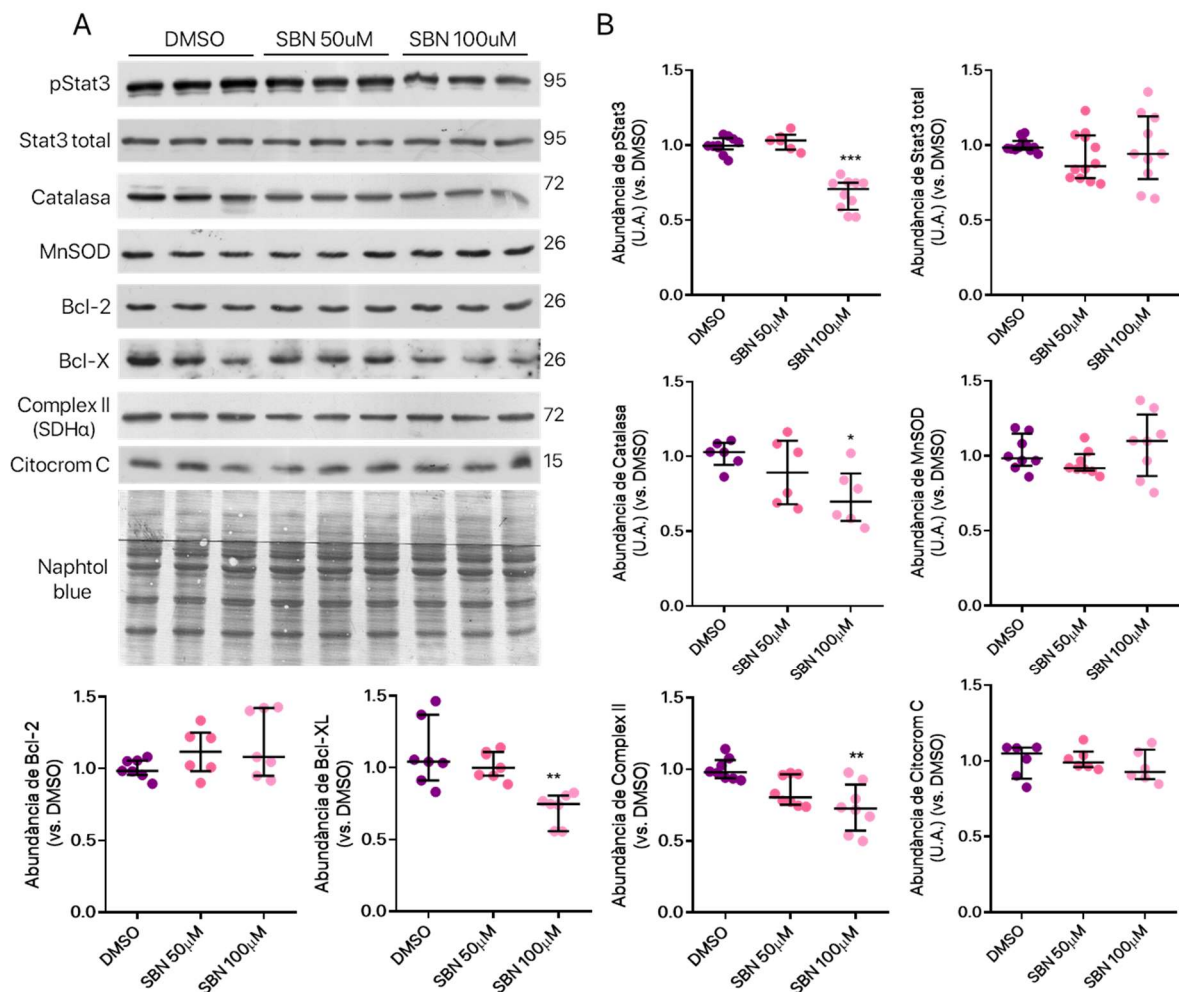


Figura 34. El tractament dels fibroblasts cardíacs amb l'inhibidor específic de Stat3, Silibina (SBN), induïx una disminució en l'abundància del propi Stat3 i de proteïnes relacionades amb la respiració cel·lular i alguns enzims implicats en la neutralització de ROS. (A) Anàlisi de l'expressió de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵), Stat3 total, Catalasa, MnSOD, Bcl-2, Bcl-XL, Complex II i Citocrom C en mostres independents dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO, SBN 50µM i SBN 100µM mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO. En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil de 6–8 mostres independents (N=6–8). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (**p<0.01, *p<0.05 vs DMSO).

Degut a la davallada en l'expressió del Complex II en presència de SBN, a la major respiració dels fibroblasts cardíacs, a l'elevada expressió de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵) en aquestes cèl·lules, i a que estava descrit que Stat3 podia estar influenciant l'activitat de la cadena respiratòria (Wegrzyn et al., 2009), vam decidir analitzar el consum d'oxigen en fibroblasts cardíacs tractats amb SBN. Els resultats presentats a la Figura 35 mostren que el tractament amb SBN 100 μ M durant 24 hores no va afectar substancialment ni el consum d'oxigen basal (respiració de rutina), ni el lligat a l'oxidació d'ATP, ni la reserva respiratòria. Tampoc vam observar canvis en fibroblasts tractats durant 48 hores.

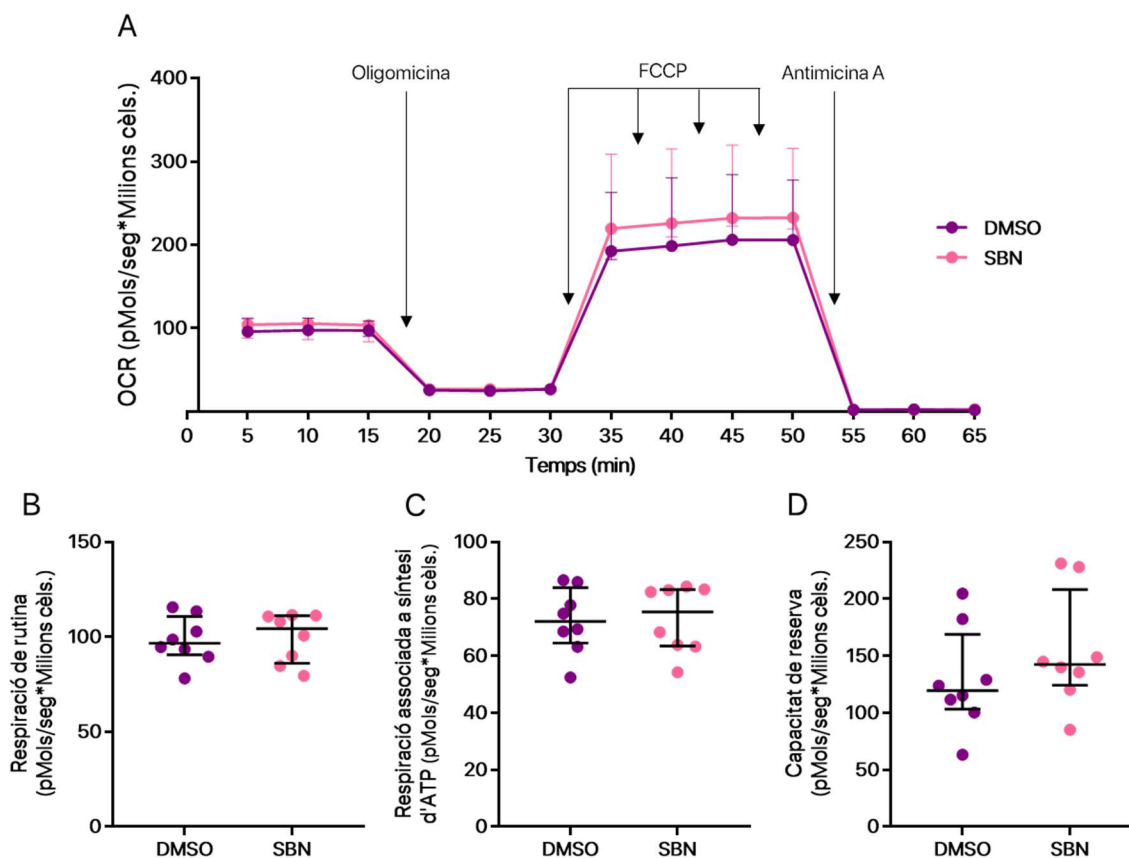


Figura 35. Els fibroblasts cardíacs tractats durant 24 hores amb l'inhibidor específic de Stat3, SBN, no mostren canvis significatius en el consum d'oxigen. (A) Anàlisi de la respirometria dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO (control) i SBN (100 μ M durant 24 hores). (B-D) Gràfics comparatius entre els fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO i SBN. Les dades mostren la quantificació del consum d'oxigen (OCR) expressat com pMols O₂/segon *milió de cèl·lules, mediana \pm rang interquartil de 4 experiments independents per duplicat N=4. S'aplica el test estadístic Mann-Whitney (No significatiu vs. F. cardíacs DMSO).

Tot i no haver un efecte de la SBN en la respiració mitocondrial, vam decidir analitzar els nivells de ROS dels fibroblasts cardíacs tractats amb SBN 100 μ M durant 24 hores en condicions de normòxia degut a la davallada d'expressió de la Catalasa. La Figura 36 mostra que els fibroblasts cardíacs tractats amb la SBN no van augmentar els nivells de ROS respecte al fibroblasts tractats amb DMSO ni en condicions de normòxia, ni en condicions d'isquèmia experimental.

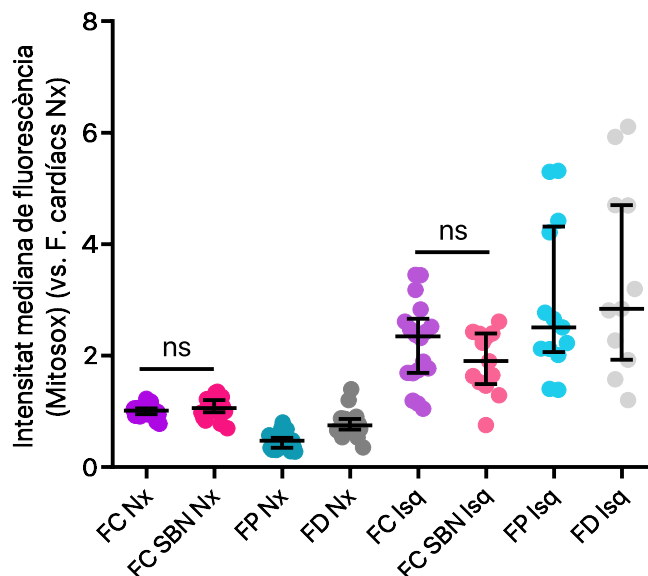


Figura 36. La SBN no indueix un increment dels nivells de ROS mitocondrials als fibroblasts cardíacs. Determinació de la producció de ROS mitjançant marcatge amb la sonda MitoSOX™ en condicions de normòxia i d'isquèmia dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO i SBN (100µM) durant 24 hores i dels fibroblasts pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i d'isquèmia. Degut a oscil·lacions interexperimentals de la senyal, les dades es normalitzen dividint per la mitja dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO. En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil de 6 experiments independents per duplicat (N=6). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunnett (No significatiu (ns) vs. No tractament en cada condició en F. cardíacs). Nx: Normòxia; Isq: Isquèmia; FC: Fibroblasts cardíacs; FP: Fibroblasts pulmonars; FD: Fibroblasts dèrmics.

La via de transducció de senyal mitjançada pels complexos Jak/Stat és força complexa, com es descriu a l'apartat 3.5.1 de la Introducció. A rel dels nostres resultats negatius, vam realitzar una revisió detallada dels articles originals demostrant els efectes de Stat3 en paràmetres del nostre interès com l'expressió de Bcl-2, dels complexos de la cadena respiratòria i de MnSOD, així com la relació entre Stat3 i la taxa de consum d'oxigen. Això ens va permetre veure que tots els articles fonamentaven les seves conclusions a partir de resultats obtinguts en models de sobre-expressió de Stat3 (Fukada et al., 1996; Haga et al., 2003), utilitzant proteïnes quimera recombinants (Sakai and Kraft, 1997), o sistemes "gene reporter" (Stephanou and Latchman, 2000) o analitzant mitocondris aïllats (Wegrzyn et al., 2009), o bé utilitzant inhibidors no específics de Stat3, sinó dels seus reguladors "upstream", en particular l'inhibidor de Jak2 AG490 (Nielsen et al., 1999; Bhattacharya et al., 2005; Sepúlveda et al., 2007). Per això vam decidir analitzar l'efecte de l'inhibidor de Jak2 AG490 en la supervivència, l'expressió gènica, la respiració mitocondrial i la producció de ROS als fibroblasts cardíacs.

El tractament dels fibroblasts cardíacs amb AG490 a les concentracions de 50 µM i 100µM va induir la reducció en l'abundància de pStat3. A més, va reduir l'expressió de l'enzim antioxidant MnSOD, així com l'expressió de Bcl-2, Bcl-XL, Complex II (SDH) i Citocrom C, com es mostra a la Figura 37. No obstant, no es va veure alterada l'abundància de la Catalasa.

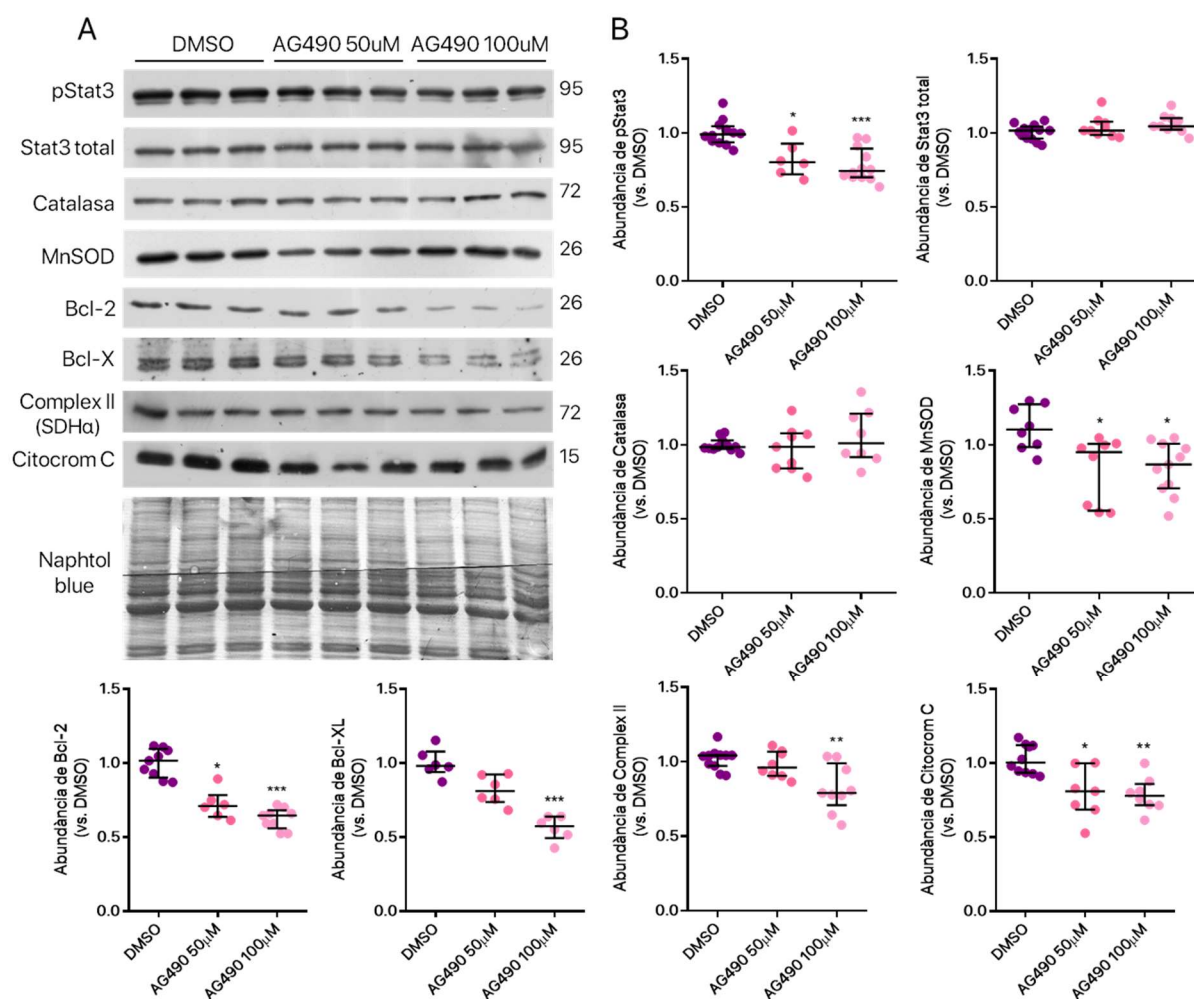


Figura 37. El tractament dels fibroblasts cardíacs amb l'inhibidor específic de Jak2, AG490, induïx una disminució de l'abundància de pStat3 i de proteïnes relacionades amb la respiració cel·lular i alguns enzims implicats en la neutralització de ROS. (A) Anàlisi de l'expressió de pStat3 (Tyr⁷⁰⁵), Stat3 total, Catalasa, MnSOD, Bcl-2, Bcl-XL, Complex II (SDH) i Citocrom C en mostres independents dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO, AG490 50 µM i AG490 100µM mitjançant Western Blot. El Naphtol Blue es va utilitzar com a control de càrrega. (B) Anàlisi densitomètric dels Westerns Blots. Les dades es normalitzen dividint per la mitjana dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO. En els gràfics s'observa mediana±rang interquartil de 6-10 mostres independents (N=6-10). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunn (***) $p \leq 0.001$, (**) $p \leq 0.01$, (*) $p \leq 0.05$ vs DMSO).

Degut a que vam observar que la inhibició de Jak2 afectava un ventall més ample de gens que la inhibició de Stat3, en particular de Bcl-2, vam decidir analitzar la supervivència amb la dosi de 100µM que tenia un efecte més marcat. Com es mostra a la Figura 38, l'inhibidor de Jak2 AG490 a una concentració de 100µM va aturar la proliferació dels fibroblasts i va reduir la supervivència d'aquests en condicions d'isquèmia durant 24h fins els nivells dels fibroblasts pulmonars i dèrmics.

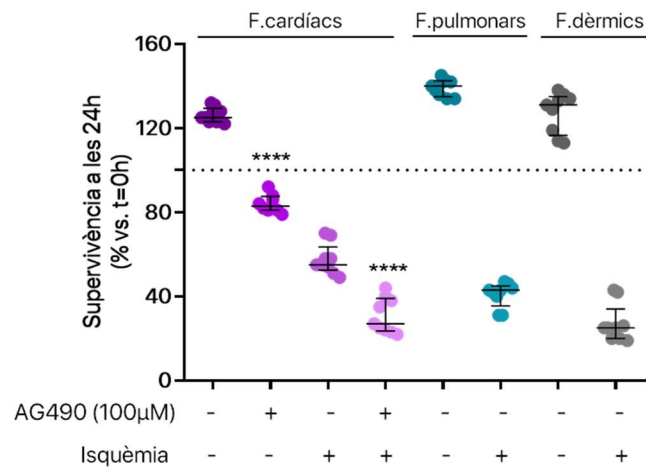


Figura 38. La inhibició de Jak2 amb AG490 afecta la supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions de normòxia i d'isquèmia experimental. Anàlisi de la supervivència mitjançant recomptes de viabilitat amb blau de Tripà a les 24 hores en condicions de normòxia i d'isquèmia (\pm AG490 100 μ M). Les dades estan referenciades al recompte de cèl·lules en el moment d'afegir AG490 (t=0h). En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de 9 experiments independents (N=9). S'aplica el test estadístic Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunnett (**** $p \leq 0.0001$ vs. No tractament en cada condició en F. cardíacs).

Degut als resultats de supervivència i a la davallada en l'expressió del Complex II i Citocrom C en presència d'AG490, vam decidir analitzar el consum d'oxigen en fibroblasts tractats amb AG490. Els resultats presentats a la Figura 39 mostren que el tractament amb AG490 100 μ M durant 24 hores va afectar tant al consum d'oxigen basal (respiració de rutina) (Figura 39B), com al consum d'oxigen associat a la fosforilació d'ADP (Figura 39C) i també a la capacitat de reserva (Figura 39D).

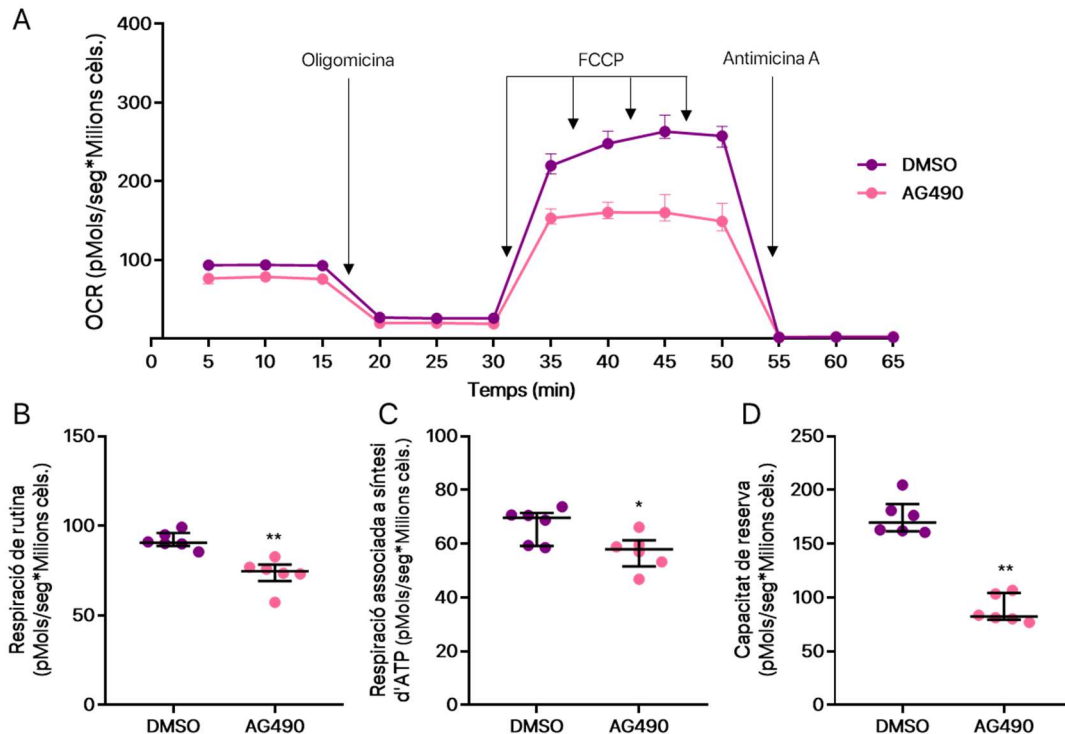


Figura 39. Els fibroblasts cardíacs tractats durant 24 hores amb l'inhibidor específic de Jak2, AG490, mostra canvis significatius dels paràmetres analitzats del consum d'oxigen. (A) Anàlisi de la respirometria dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO (control) i AG490 (100 μ M durant 24 hores). (B-D) Gràfics comparatius entre els fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO i AG490. Les dades mostren la quantificació del consum d'oxigen (OCR) expressat com pMols O_2 /segon*milió de cèl·lules, mediana \pm rang interquartil de 3 experiments independents per duplicat (N=3). S'aplica el test Mann-Whitney (** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ vs. F. cardíacs DMSO).

Degut a l'efecte de l'inhibidor de Jak2 AG490 en la respiració mitocondrial i la disminució de l'expressió de MnSOD, vam decidir analitzar els nivells de ROS en els fibroblasts cardíacs tractats amb AG490 100 μ M durant 24 hores en condicions de normòxia i d'isquèmia. Els resultats de la Figura 40 mostren una tendència a incrementar els nivells de ROS amb AG490 en normòxia, i en condicions d'isquèmia incrementaven significativament fins a valors similars als altres fibroblasts.

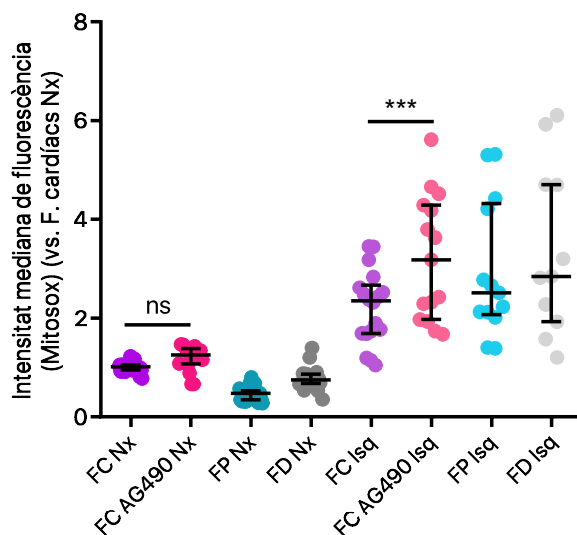


Figura 40. L'inhibidor AG490 indueix un increment dels nivells de ROS mitocondrials als fibroblasts cardíacs. Determinació de la producció de ROS mitjançant marcatge amb la sonda MitoSOX™ en condicions de normòxia i d'isquèmia dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO i AG490 (100 μ M) durant 24 hores i dels fibroblasts pulmonars i dèrmics en condicions de normòxia i d'isquèmia. Degut a oscil·lacions interexperimentals de la senyal, les dades es normalitzen dividint per la mitja dels fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO. En els gràfics s'observa mediana \pm rang interquartil de 7 experiments independents per duplicat (N=7). S'aplica el test Kruskal-Wallis amb un test post-hoc de Dunnett (***) p \leq 0.001 vs. No tractament en cada condició en F. cardíacs).

Finalment, degut als resultats obtinguts amb l'inhibidor AG490, el qual tenia un efecte en la supervivència, expressió de proteïnes implicades en la neutralització dels ROS, els nivells de ROS i la respiració mitocondrial, i el fet que *Isg15* també pot ser activat per la via de Jak/Stat, vam decidir analitzar l'expressió d'*Isg15* a nivell de transcrit (ARNm) als fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO i amb AG490 (100 μ M). Com es mostra a la Figura 41, els fibroblasts cardíacs tractats amb AG490 van presentar una disminució dels nivells de transcrit d'*Isg15* en comparació als tractats amb DMSO.

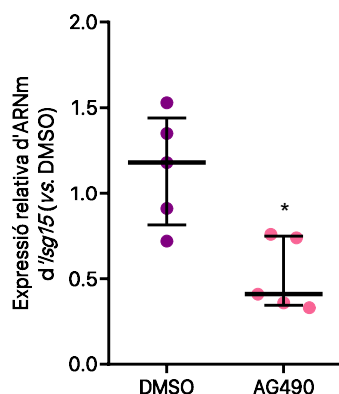


Figura 41. L'inhibidor de Jak2 AG490 produeix una disminució dels nivells de transcrit (ARNm) d'*Isg15* en els fibroblasts cardíacs. Abundància relativa de transcrit d'*Isg15* en els fibroblasts cardíacs tractats amb DMSO i AG490 (100 μ M). En el gràfic s'observa mediana \pm rang interquartil de 5 experiments independents (N=5). S'aplica el test estadístic Mann-Whitney (* p \leq 0.05 vs. DMSO).

 *Discussió*

DISCUSSIÓ

Els fibroblasts cardíacs són objecte d'interès biomèdic degut a les funcions que desenvolupen al cor, tant en condicions normals com patològiques. Aquestes cèl·lules són les principals productores i secretores de la matriu extracel·lular que cohesiona la musculatura conferint-li les propietats mecàniques ideals per transformar la contracció dels cardiomiòcits en el moviment de la paret cardíaca que permet el bombeig de la sang. A més a més, s'estan descobrint noves propietats d'aquests fibroblasts com la capacitat d'intervenir en el procés de sincronització del batec (Gaudesius et al., 2003), i la secreció de factors tròfics potenciant el creixement del cor (Ieda et al., 2009). En condicions patològiques i especialment en situacions de tall del flux sanguini al miocardi (isquèmia), els fibroblasts cardíacs són els responsables de produir i secretar la matriu que generarà la cicatriu fibrosa, impeding la sortida de sang que es podria produir per la mort del miocardi. Tot i que aquest esdeveniment és essencial per sobreviure a l'infart, la deposició de matriu extracel·lular posterior a l'esdeveniment isquèmic pot representar una complicació si s'allarga en el temps o s'activa excessivament. Per això, s'està destinant molt esforç a la identificació de l'origen embrional i el/els tipus cel·lular/s que constitueixen la població de fibroblasts cardíacs (Tallquist and Molkentin, 2017; Fu et al., 2018), a re-avaluar la seva abundància al cor (Pinto et al., 2016), així com a comprendre la regulació de la síntesi i secreció de matriu extracel·lular (Fu et al., 2018), amb la finalitat de desenvolupar eines terapèutiques que permetin regular la resposta fibrosa per tal de millorar la salut dels pacients.

El nostre grup havia trobat que la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2 és molt abundant als fibroblasts cardíacs si es compara amb altres tipus de fibroblasts. Bcl-2 permet mantenir millor la integritat mitocondrial i vam demostrar que és un factor clau per evitar l'apoptosi induïda durant la isquèmia (Mayorga et al., 2004). Tot i l'elevat nombre de publicacions identificant la quantitat, l'origen genètic i l'activitat dels fibroblasts cardíacs, hi ha poca informació sobre els mecanismes implicats en la resistència d'aquestes cèl·lules a la isquèmia i, per això, vam decidir seguir investigant aquest aspecte fonamental de la seva biologia.

La nostra hipòtesi original era que l'autofàgia, un procés relacionat amb el reciclatge d'òrgans i generació d'energia en condicions d'escassetat, en particular al cor (Lavandero et al., 2015), i que s'ha descrit que pot ser regulat per Bcl-2 (Levine et al., 2015), podia ser rellevant per la supervivència dels fibroblasts cardíacs. Els resultats presentats en aquesta memòria mostren que Bcl-2 és important no tant sols per la supervivència durant la isquèmia, sinó també per la proliferació dels fibroblasts cardíacs en condicions normals. L'estudi de l'impacte de l'autofàgia en la viabilitat dels fibroblasts ens va mostrar que aquesta, és important en condicions normals, però no sembla contribuir a la supervivència durant la isquèmia. Tot i això, les dades suggerien major dependència dels fibroblasts cardíacs en l'autofàgia que els fibroblasts dèrmics i pulmonars. L'estudi de les

diferències en l'expressió gènica que vam observar en aquest primer estudi, en particular l'augment de l'expressió de la proteïna Bnip3 en isquèmia i després de bloquejar l'autofàgia, ens va portar a descobrir una sèrie de diferències que caracteritzen als fibroblasts cardíacs com l'elevada producció de ROS i l'elevada capacitat de controlar els seus nivells durant la isquèmia, l'elevada expressió d'enzims antioxidants de ROS (Catalasa, MnSOD, Glutatió peroxidasa), el major consum d'oxigen i major reserva respiratòria, acompanyats d'una major expressió dels complexos II a V de la cadena de transport d'electrons. Així mateix, vam observar una particular organització de la xarxa mitocondrial, amb més mitocondris aïllats que altres tipus de fibroblasts, coincidint amb la menor expressió de Mitofusina 2. A més, vam trobar que els fibroblasts cardíacs són més resistents també a estímuls d'estrès de reticle endoplasmàtic. Finalment, vam estudiar les vies de senyalització implicades, trobant que els fibroblasts cardíacs tenen nivells constitutivament més elevats de Stat3 activat i descobrint la implicació de la via Jak/Stat en la regulació de molts dels factors característics que diferencien els fibroblasts cardíacs d'altres tipus de fibroblasts.

» **Bcl-2 i supervivència**

Per començar, vam voler replicar i aprofundir en les dades originals que només investigaven la regulació de l'apoptosi per l'expressió de Bcl-2 als fibroblasts cardíacs (Mayorga et al., 2004), ja que no disposàvem d'un mètode eficaç per reduir l'expressió de Bcl-2 en aquell moment. En aquest treball hem confirmat la importància de Bcl-2 en la supervivència durant la isquèmia i a més, les dades demostren la seva importància per la proliferació/supervivència dels fibroblasts cardíacs en condicions normals. La implicació de Bcl-2 en la proliferació cel·lular s'havia descrit però en sentit contrari en fibroblasts immortalitzats 3T3, a través d'un mecanisme que augmenta la presència del regulador negatiu de la proliferació p27 (Vairo et al., 2000). Per tant, la necessitat d'expressar Bcl-2 als fibroblasts cardíacs per mantenir una proliferació normal és rellevant i queda per investigar. Una possible raó per la disminució de la proliferació en absència de Bcl-2 podria estar relacionada amb les condicions d'estrès oxidatiu moderat que, com hem vist, es dona en aquest tipus de fibroblasts i que podria frenar la progressió del cicle cel·lular.

Amb l'objectiu d'iniciar l'estudi del procés autofàgic als fibroblasts cardíacs i d'esbrinar la possible influència de Bcl-2, vam analitzar la seva expressió en presència o absència de l'inductor d'autofàgia Rapamicina, que indueix l'autofàgia per inhibició del complex mTOR (Tanemura et al., 2012; Kim et al., 2015). La Rapamicina va induir un augment de l'abundància de LC3-II i també de Bcl-2, suggerint una possible co-regulació.

» **Anàlisi de l'autofàgia als fibroblasts**

Als fibroblasts cardíacs augmentava molt l'abundància de Bnip3 durant la isquèmia, fet associat a una elevada supervivència, mentre que als fibroblasts pulmonars i dèrmics augmentava la caspasa-3 processada (activada), el què ens va fer pensar que Bnip3 podria estar desenvolupant algun paper

protector. Tot i que el seu silenciament va empitjorar la supervivència/proliferació dels fibroblasts en condicions normals, no es va observar cap efecte evident en isquèmia. El nivell incrementat de Bnip3 només als fibroblasts cardíacs podria suggerir la estimulació de mitofàgia durant la isquèmia (Zhang and Ney, 2009). Malgrat això, tant el bloqueig de l'autofàgia per mitjans de regulació de l'expressió de gens clau (*Bnip3* i *Atg7*shRNA), com la inhibició química (amb 3-MA i Cloroquina) van mostrar la rellevància de l'autofàgia en tots els tipus de fibroblasts estudiats en condicions normals, però no durant la isquèmia, resultat que descarta la hipòtesi inicial.

L'augment de l'expressió de *Bnip3* durant la isquèmia malgrat la manca d'evidències d'un rol rellevant en aquesta situació ens va semblar contradictori. *Bnip3* és un gen de la família de Bcl-2 al que se li han atorgat rols oposats o duals al cor, amb treballs suggerint la seva implicació en el procés de mort (Gálvez et al., 2006; Diwan et al., 2007) o bé participant al desenvolupament cardíac (Lampert et al., 2019) i la protecció del miocardi (Moyzis et al., 2015). En condicions basals, Bnip3 era difícil de detectar per Western Blot en extractes de fibroblasts, però vam detectar un augment de la seva abundància tant quan bloquejàvem l'autofàgia com quan induïem isquèmia, especialment als fibroblasts cardíacs. Tot això suggeria que Bnip3 té un reciclat ràpid o vida mitja molt curta de forma que es requereix elevada taxa de síntesi, però és utilitzat (i degradat) de forma immediata als fibroblasts. Per això, en bloquejar l'autofàgia, es va acumular i probablement l'augment observat durant la isquèmia era degut a que l'autofàgia quedava aturada, el què estaria d'acord amb que la inhibició química d'aquest esdeveniment no va modificar la viabilitat en isquèmia. Possiblement, no vam detectar un augment tant marcat de l'abundància de Bnip3 en isquèmia als fibroblasts de pulmó i de pell degut a la caiguda de la seva síntesi en aquestes cèl·lules, que són més sensibles als fàrmacs i tenen una taxa de mortalitat més elevada, a diferència del què succeeix als fibroblasts cardíacs, que mantenen millor la viabilitat en absència d'oxigen.

» Estrès oxidatiu als fibroblasts cardíacs

Degut a que Bnip3 també s'havia proposat com un indicador del nivell d'estrès oxidatiu cel·lular (Kubli et al., 2008), vam voler analitzar possibles diferències en els nivells de ROS als diferents fibroblasts. Les nostres dades van mostrar que els fibroblasts cardíacs produeixen més ROS, però mantenen els nivells de forma més estable durant la isquèmia. Això estava relacionat amb una elevada expressió dels principals enzims antioxidants de ROS i una major abundància de glutatió reduït (GSH), els nivells del qual van caure durant la isquèmia, possiblement perquè era més oxidat, afavorint el manteniment del control dels ROS. El millor control dels ROS durant la isquèmia i especialment durant la reoxigenació, s'ha associat amb una major supervivència al miocardi (Valls-Lacalle et al., 2018). Les diferències trobades en els nivells de ROS ens van fer investigar la respiració cel·lular, com a font més probable de producció d'aquestes molècules.

» Anàlisi de la respiració cel·lular i caracterització de la cadena de transport electrònic

Consum d'oxigen

Cada tipus de fibroblasts va presentar uns nivells diferents de consum d'oxigen, però els fibroblasts cardíacs van mostrar nivells netament superiors de respiració tant de forma basal, com l'associada a la fosforilació de l'ADP, com també l'estimulada per desacoblament del gradient de protons amb FCCP o capacitat respiratòria màxima. Com que les condicions experimentals d'incubació dels cultius implicaven pressions elevades d'oxigen a la cambra de detecció (pO_2 al voltant del 21%), vam voler descartar un possible artefacte degut a la "hiperòxia". Els estudis realitzats a una pO_2 del 3% van confirmar la major capacitat respiratòria dels fibroblasts cardíacs. En particular, vam observar major reserva respiratòria, dada que s'obté restant la respiració basal a la màxima capacitat respiratòria (obtinguda en presència del desacoblador FCCP). Aquesta dada és rellevant ja que una elevada capacitat de reserva respiratòria ha estat relacionada amb major capacitat de supervivència a la isquèmia/reperfusió tant en cardiomiòcits (Pfleger et al., 2015) com en altres tipus cel·lulars (Nickens et al., 2013), tot i que no s'ha pogut vincular un efecte causal. Pfleger et al. van demostrar que la capacitat de reserva respiratòria, que depèn en gran part de l'activitat del Complex II (Succinat deshidrogenasa), necessita de l'oxidació d'àcids grassos i glucosa i està relacionada amb una menor generació de ROS durant la hipòxia, cosa que repliquen les nostres dades als fibroblasts cardíacs. Això podria suggerir que les cèl·lules del cor estan millor preparades que altres tipus cel·lulars pel control dels nivells de ROS. De totes maneres, tenint en compte que la respiració basal no sembla influenciada pel Complex II als fibroblasts, ja que no vam observar disminució en presència de l'inhibidor de la SDH 3NP, queda per determinar si la reserva respiratòria està realment implicada en la millor supervivència o és un fet associat però no implicat en aquesta característica.

Efecte de Bcl-2 sobre la respiració cel·lular

En relació a la possible influència de Bcl-2 sobre l'elevada taxa de respiració dels fibroblasts cardíacs, vam trobar dades prèvies que indicaven que Bcl-2 podria estar regulant directament la funció de la cadena de transport d'electrons (Chen and Pervaiz, 2007; Cherh et al., 2010). Malgrat aquestes dades prèvies, els nostres resultats no van recolzar la intervenció de Bcl-2 en el control de la respiració als fibroblasts cardíacs. La revisió posterior de la bibliografia va revelar diversos aspectes a tenir en compte per interpretar les dades, ja que Chen i col·laboradors mostraven un augment en la taxa de consum d'oxigen de mitocondris aïllats de tumors sobre-expressors de *Bcl2* abans i després del silenciament d'aquest gen i comparant amb tumors no sobre-expressors, models que poden trobar-se molt lluny dels fibroblasts primaris. Per la seva banda, Cherh i col·laboradors establien la relació de Bcl-2 amb el control del consum d'oxigen en presència de la seva inducció per resveratrol i comparant una línia cel·lular normal amb una sobre-expressora de *Bcl2*, el què podria dur a interaccions que no tenen lloc o no són determinants en condicions normals als fibroblasts. En

conclusió, les nostres dades no van permetre establir una relació causal entre els nivells elevats de Bcl-2 i l'elevada capacitat respiratòria als fibroblasts cardíacs tot i que ambdós fets s'han relacionat amb major supervivència i, en alguns models experimentals, han estat relacionats entre ells.

Expressió de complexos de la cadena de transport d'electrons

Tot i que el nivell de consum cel·lular d'oxigen depèn de molts factors incloent factors metabòlics, volum i organització de la xarxa mitocondrial, així com de la quantitat de cadenes respiratòries i organització de supercomplexos, vam decidir caracteritzar el nivell d'expressió de diversos components dels complexos per intentar trobar un fonament molecular a la major respiració dels fibroblasts cardíacs. Les nostres dades van mostrar que els fibroblasts cardíacs tenen un nivell d'expressió més elevat de proteïnes dels Complexos II al V, però un nivell d'expressió similar del Complex I a la resta de fibroblasts estudiats, mantenint també nivells similars de Citocrom C. Per la seva banda, tot i tenir nivells similars de CoQ a la resta de fibroblasts, els fibroblasts cardíacs semblaven tenir menys CoQ reduït, el què estaria d'acord amb una major taxa respiratòria. Les nostres dades suggerien diferent organització de supercomplexos, ja que s'ha demostrat la presència d'un número diferent de complexos formant part dels supercomplexos (Guo et al., 2017). Això podria estar relacionat amb la major capacitat respiratòria dels fibroblasts cardíacs i la diferència observada en els nivells de ROS tant en normòxia com durant la isquèmia, que queda per investigar.

Origen dels ROS als fibroblasts

Tot i que nivells elevats de ROS estan relacionats amb major estrès oxidatiu i la inducció de mort, cada vegada és més clar que canvis subtils en els nivells de ROS estan implicats en la regulació de múltiples aspectes de la biologia cel·lular (Hamanaka and Chandel, 2010) a través del control, entre d'altres, de proteïnes clau en processos com la supervivència (Murata et al., 2003) i la proliferació cel·lular (Byrne et al., 2020). Per això vam decidir identificar l'origen dels ROS als fibroblasts i si aquest era diferent als cardíacs en relació a la resta de fibroblasts estudiats. El senyal detectat amb la sonda específica mitocondrial MitoSOX™, que posteriorment vam validar utilitzant dihidrorhodamina-123 (dades no mostrades en aquest treball), una altra sonda mitocondrial, ens indicava que l'origen dels ROS era mitocondrial. Un possible origen de les diferències trobades en la quantitat de ROS, tant en normòxia com en isquèmia, era el transport revers d'electrons (*reverse electron transfer*, RET) que es dona pel pas d'electrons del Complex III al Complex I a través de retorn de CoQH₂ (Chouchani et al., 2014). Aquesta situació no es dona només en condicions patològiques (com la isquèmia-reoxigenació), sinó que s'ha observat en models fisiològics (Murphy and O'Neill, 2018). Una característica del RET és el seu control per elevats nivells de succinat (Murphy and O'Neill, 2018). Nosaltres vam trobar que els fibroblasts cardíacs tenen més succinat i més potencial de membrana mitocondrial, en acord amb la possible existència de RET, tot i que no es complia la presència d'un nivell elevat de CoQH₂. Tot i això, la rotenona, que impedeix el pas d'electrons del

Complex I al CoQ, va fer augmentar els ROS, suggerint que l'origen d'aquests era al Complex I directament, ja que si es tractés de RET, s'ha descrit que els ROS disminuirien en impedir el pas d'electrons del CoQH₂ al Complex I (Chouchani et al., 2014). La major generació de ROS als fibroblasts cardíacs pel Complex I, tot i ser el complex que s'expressa de forma similar a tots els fibroblasts estudiats, podria estar relacionada amb les diferències en la organització dels supercomplexos o a l'augment de la respiració en aquestes cèl·lules, entre d'altres possibilitats.

» Biogènesi i dinàmica mitocondrial

Degut a l'observació de canvis tan importants en el consum d'oxigen, la generació de ROS a nivell mitocondrial i la diferent expressió de components principals de la cadena de transport d'electrons, vam voler indagar més sobre la biologia mitocondrial als fibroblasts. Les dades van mostrar que aquests canvis funcionals i d'expressió tenen lloc partint d'una quantitat similar de mitocondris, la qual cosa vam validar per l'anàlisi d'expressió de diverses proteïnes mitocondrials i l'estudi per microscòpia confocal de la xarxa mitocondrial als tres tipus de fibroblasts. Els fibroblasts cardíacs van mostrar una xarxa mitocondrial amb més mitocondris menys connectats entre ells, el què s'associava amb una menor expressió del co-activador transcripcional Pgc-1 α , implicat en la biogènesi mitocondrial, la fosforilació oxidativa i alguns aspectes del metabolisme (Wu et al., 1999), i la Mitofusina 2 (Mfn2), implicada en la fusió mitocondrial entre d'altres funcions (De Brito and Scorrano, 2008). La diferent organització de la xarxa mitocondrial s'ha relacionat amb l'adaptació de la cèl·lula a les condicions ambientals (Schrepfer and Scorrano, 2016). La presència de més mitocondris aïllats als fibroblasts cardíacs, possiblement relacionada causalment amb la menor expressió de Mfn2, podria estar en la base d'una millor adaptació a enfrontar-se a estímuls que activin una resposta en cadena involucrant els mitocondris, com la producció de ROS durant la isquèmia o en situacions d'estrès de reticle, i podria influir també en la interacció entre els mitocondris i el reticle endoplasmàtic (Naon et al., 2016).

Aquest perfil de distribució mitocondrial s'ha associat, en un model de cèl·lules *knock out* per *Mfn2*, amb una menor activació d'apoptosi en condicions d'estrès de reticle (Muñoz et al., 2013), fet que repliquen els fibroblasts cardíacs de forma espontània, com vam observar. La detecció de menys Pgc-1 α podria semblar en contradicció amb el manteniment d'un volum mitocondrial similar a la resta de tipus de fibroblasts estudiats, ja que es tracta de un gen cabdal per la mitocondriogènesi. Tot i això, estudis realitzats sobre ratolins deficients en el gen que codifica per Pgc-1 α , *Ppargc1A*, mostren que els ratolins deficients no presenten canvis en el contingut mitocondrial al cor, tot i que sí mostren disminució en l'expressió de diversos gens importants en l'activitat de la cadena respiratòria, l'oxidació de lípids i la síntesi d'ATP (Arany et al., 2005). És interessant que alguns dels complexos més expressats als fibroblasts cardíacs, com el Complex II, no es trobessin regulats per Pgc-1 α (Arany et al., 2005). Tot això podria suggerir que els nivells d'aquest co-activador transcripcional als fibroblasts cardíacs són suficients per mantenir un volum mitocondrial adequat a l'hora que permet

una sèrie de canvis que els adapten de la forma que hem trobat. Alguns d'aquests canvis podrien estar possiblement relacionats amb la menor expressió de *Mfn2*, la regulació de la qual es troba influenciada per *Pgc-1 α* (Soriano et al., 2006).

» Estrès de reticle endoplasmàtic

Com que els fibroblasts cardíacs tenen menor expressió de *Mfn2* i una xarxa mitocondrial més fragmentada que els pulmonars i dèrmics, i tenint en compte que s'havia descrit menor inducció d'apoptosi a cèl·lules deficientes en *Mfn2* (Muñoz et al., 2013), vam voler saber si presentaven una sensibilitat diferent a estímuls d'estrès de reticle endoplasmàtic. Tant la Tunicamicina, que altera el plegament de proteïnes, com la Thapsigargina, que indueix augment de la concentració de Ca^{2+} citoplasmàtic provinent de reticle, totes dues inductores de la "resposta de proteïnes mal plegades" (*unfolded protein response*, UPR), van generar més mort cel·lular i apoptosi als fibroblasts pulmonars i dèrmics que als cardíacs. De forma interessant, tot i la davallada en l'expressió de *Bcl-2* als tres tipus de fibroblasts, els cardíacs van mantenir nivells més alts de *Bcl-2* que els altres fibroblasts, el què probablement conferia més resistència a l'apoptosi, com vam comprovar amb el silenciament de *Bcl2*, confirmant el què s'havia publicat en altres models cel·lulars (McCullough et al., 2001). De fet, McCullough i col·laboradors havien descrit que el factor regulador de la transcripció *Gadd153/CHOP* induïa una disminució de l'expressió de *Bcl2*. No obstant, quan vam analitzar l'expressió d'alguns dels reguladors principals activats durant l'estrès de reticle, vam trobar un augment similar en l'expressió d'*ATF4* i *CHOP* als fibroblasts cardíacs que als altres fibroblasts.

Les vies de senyalització activades per estrès de reticle estan ben caracteritzades. La inducció de la xaperona αBiP al reticle i l'alliberament de la seva unió amb PERK, *ATF6* i *IRE1 α* , promou les cascades de senyalització que s'inicien en aquestes proteïnes. PERK, al seu torn, promou la fosforilació d'*eIF2 α* que indueix l'expressió d'*ATF4* i *CHOP*. Aquests factors de transcripció regulen l'expressió de diferents gens determinant la resposta cel·lular. Les nostres dades indicaven la inducció d'*ATF4* i *CHOP* per Thapsigargina a temps més curts (6 hores) dels necessaris per detectar increment en la fosforilació d'*eIF2 α* a tots els fibroblasts. Revisant el què estava publicat i en particular en relació a l'expressió de *Mfn2*, vam trobar que, com en el nostre cas, la fosforilació d'*eIF2 α* no es correlacionava amb la inducció d'*ATF4* i *CHOP* en cèl·lules deficientes en *Mfn2* (Muñoz et al., 2013). De forma interessant, en les cèl·lules *knock out* per *Mfn2*, com als fibroblasts cardíacs, que de forma natural expressen menys *Mfn2*, no es processava (activava) la Caspasa-3. Les nostres dades suggerien que els nivells inicials d'expressió de *Bcl2* tenen un paper important en la mort cel·lular durant l'estrès de reticle i seria interessant analitzar els seus nivells en altres cèl·lules deficientes en *Mfn2*. A més, tot això suggereix que les vies clàssiques activades per estrès de reticle, en particular el rol d'*eIF2 α* , i la inducció final d'apoptosi, podrien ser modificades en funció d'interaccions mitocondri-reticle d'alguna forma que encara queda per caracteritzar.

Els resultats obtinguts sobre les característiques fisiològiques, d'expressió gènica i d'organització cel·lular van perfilar els fibroblasts cardíacs com un tipus cel·lular especialment dissenyat per presentar elevada resistència a estímuls estressants. A continuació ens vam interessar per esbrinar si existia alguna via de transducció de senyals que governés aquest tret.

» **Rol de les vies d'Akt/GSK-3, HIF1 i Nrf2 en la supervivència dels fibroblasts a la isquèmia**

Inicialment, ens vam centrar en l'estudi d'aquestes vies clàssiques promotores de supervivència. La kinasa Akt/PKB, representa un punt central en vies de supervivència, proliferació i diferenciació i, a més, forma part de la via de protecció cardíaca coneguda com a RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) que inclou també les Mapk Erk1/2 (Valls-Lacalle et al., 2018), i va ser la que vam analitzar primer. Malgrat les expectatives, no vam detectar cap diferència en la fosforilació d'Akt ni en condicions basals ni durant la isquèmia entre els tres tipus de fibroblasts, el que suggeria que Akt no es trobava relacionada, al menys de forma protagonista, amb la major supervivència dels fibroblasts cardíacs.

La via que implica el factor 1 induïble per hipòxia (HIF1) té rellevància en la resposta cel·lular a baixes pO₂ promovent la supervivència cel·lular en aquestes condicions. Corroborant el que es coneixia prèviament, vam detectar un augment de l'abundància de la subunitat Hif-1 α durant la isquèmia, però els nivells eren similars als tres tipus de fibroblasts, pel que vam desestimar seguir investigant aquest gen.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) també és un factor de transcripció l'activitat del qual és induïda en situacions d'estrès oxidatiu. Nrf2 promou l'expressió dels gens diana per unió a un element de resposta antioxidant (ARE) present als promotors. Els gens induïts potencien la neutralització de ROS i la supervivència cel·lular. En particular, s'havia suggerit que Nrf2 pot induir l'expressió de *Bcl2* (Niture and Jaiswal, 2012). Això resultava rellevant ja que els fibroblasts cardíacs presenten nivells constitutivament més elevats de ROS i Bcl-2 que la resta de fibroblasts. Malgrat això, el silenciament de *Nrf2* no va resultar en canvis coherents en l'expressió de Bcl-2. La revisió retrospectiva de les evidències publicades mostrava inducció de *BCL2* en cèl·lules tumorals hepàtiques humanes (HepG2) tractades amb un antioxidant, no en condicions oxidants. Els estudis de regulació de l'expressió gènica en aquell estudi s'havien realitzat utilitzant un model de *gen reporter* (Luciferasa) i observant major unió de *NRF2* al promotor de *BCL2* utilitzant tecnologia d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) en condicions antioxidants. El silenciament de l'expressió de *NRF2* endogen va reduir l'expressió de *BCL2* als hepatomes, en contra dels nostres resultats, tot i que la inducció de *NRF2* i de *BCL2* a la línia HepG2 requeria sempre de la presència d'un antioxidant, condició diferent a la situació d'estrès oxidatiu lleuger observada als fibroblasts cardíacs.

» Estudi de les vies d'inflamació: NF-κB i Isg15

La manca d'evidència sobre la implicació de les vies regulades per Akt, HIF i Nrf2, ens van portar a investigar la via on es troba involucrat el complex de regulació transcripcional NF-κB, que també reacciona front a estímuls com l'estrès oxidatiu potenciant la inflamació, la proliferació i la supervivència cel·lular, sovint en col·laboració amb altres vies de senyalització. Les nostres dades suggerien que els fibroblasts cardíacs tenen més abundància de la subunitat RelA/p65 al nucli tant en normòxia com durant la isquèmia, la qual cosa estaria d'acord amb una major estimulació basal de la via, en consonància amb la major resistència als ROS i a la isquèmia en aquestes cèl·lules. Un possible factor inductor d'aquesta via als fibroblasts cardíacs podria ser els nivells constitutivament elevats de ROS. L'addició de substàncies antioxidants com la N-Acetil-cisteïna als cultius permetria esbrinar si els ROS estan implicats en la major estimulació basal de la via NF-κB en aquestes cèl·lules. Malgrat això, la manca de diferències clares en relació als fibroblasts pulmonars i dèrmics ens va fer seguir analitzant alternatives.

L'estudi de la biologia de la nucleasa mitocondrial EndoG i la seva relació amb la producció de ROS mitocondrials havia portat al nostre grup a investigar l'expressió del gen *Interferon stimulated gene-15 (Isg15)*. L'expressió d'*Isg15* augmenta en situacions d'estrès oxidatiu i nosaltres vam detectar un increment de l'ARNm d'*Isg15* a cèl·lules deficientes en EndoG. L'expressió d'*Isg15* depèn d'interferó (IFN) i pot ser induïda no només en situacions d'estrès oxidatiu sinó també per presència d'ADN al citosol, com per exemple ADN provinent d'infecció viral o sortida d'ADN mitocondrial (Motwani et al., 2019). A més, la via d'IFN està implicada també en l'expressió de TNF-α i, per tant, es troba relacionada amb la via NF-κB, que havíem trobat lleugerament estimulada als fibroblasts cardíacs. Els resultats van mostrar nivells més elevats d'expressió d'*Isg15* als fibroblasts cardíacs suggerint que en aquestes cèl·lules podria estar intervenint la via d'IFN per mantenir, com s'ha descrit al sistema immunitari, nivells elevats de ROS i elevada activitat mitocondrial (Baldanta et al., 2017). Un aspecte interessant d'*Isg15* és que, a més del seu rol d'unió i modificació de proteïnes (ISGilació) (Han et al., 2018), pot ser secretat i actuar com a citocina (Dos Santos and Mansur, 2017), el que permet imaginar una possible via de comunicació entre cardiomiòcits i fibroblasts, possiblement protectora, que pel moment només s'ha estudiat en l'àmbit de la resposta immune i el càncer. Seria interessant comparar els nivells d'interferó en els diferents tipus de fibroblasts tant en condicions basals com durant la isquèmia així com quantificar els nivells de proteïna Isg15 quan hi hagi anticossos específics.

De forma interessant, a més de la regulació creuada entre les vies de IFN i NF-κB, està descrit que hi ha interconnexió entre NF-κB i Stat3 a tumors (Lee et al., 2009) i també que IFN pot actuar sobre l'expressió gènica al nucli per activació de la via regulada per Jak/Stat, en particular, a través de l'activació de Stat3 (Salas et al., 2020). També s'havia descrit que Stat induïx l'expressió d'*Isg15* en un context de resposta anti-viral (Du et al., 2018). La via transductora de senyals Jak/Stat

potenciant la supervivència, entre d'altres aspectes, s'ha estudiat en profunditat en el sistema cardiovascular (Tamareille et al., 2011) i vam creure rellevant analitzar-la.

» **Estudi de la via Jak/Stat**

La interacció de diversos receptors de membrana cel·lular als seus lligands (IFN, interleucines), promou la dimerització i indueix la fosforilació mútua de les proteïnes Jak que s'hi troben associades, activant-les, i també la fosforilació del propi receptor per les Jak activades. Aquests llocs de fosforilació permeten la unió de les proteïnes Stat, que seran fosforilades per les Jak. La fosforilació de Stat indueix el seu alliberament del receptor, unint-se a altres Stat activats, formant dímers o heterodímers, que translocaran a nucli per regular l'expressió de molts gens implicats en la resposta immune, la supervivència i proliferació cel·lular, etc. A més del mecanisme canònic descrit, aquesta via presenta moltes variants de regulació i s'ha descrit una elevada interconnexió amb altres vies de transducció de senyals com la via PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B, etc.

Vam iniciar l'estudi d'aquesta via investigant la fosforilació de la Tyr⁷⁰⁵ (activació) de Stat3 ja que és el membre de la família de Stat que s'ha relacionat amb la inducció de protecció cardíaca amb més freqüència, i com a participant en la via "SAFE" de protecció front la isquèmia-reperfusió (Lecour, 2009). Els resultats van indicar una clara inducció constitutiva de Stat3 als fibroblasts cardíacs en les condicions dels nostres cultius, en relació als pulmonars i dèrmics. La inhibició específica de Stat3 utilitzant el flavonolignà Silibininina (SBN), que és capaç d'impedir la fosforilació basal i induïda (per exemple per interleucines) de la Tyr⁷⁰⁵ i que dificulta la unió de Stat3 a l'ADN i la seva funció com a factor de transcripció (Verdura et al., 2018), va disminuir la proliferació dels fibroblasts cardíacs en condicions normals. A més, la SBN va promoure la mort tant en normòxia com en isquèmia als fibroblasts cardíacs fins a arribar als nivells de mort cel·lular observats als altres dos tipus de fibroblasts. Això va anar acompanyat de la disminució en l'expressió d'algunes proteïnes que es troben expressades de forma més abundant als fibroblasts cardíacs, com la Catalasa i la Succinat deshidrogenasa (Complex II de la cadena respiratòria).

Els nostres resultats havien mostrat que els fibroblasts cardíacs presenten nivells elevats de Bcl-2 i de Stat3 fosforilat i que el silenciament de *Bcl2* i la inhibició específica de Stat3 amb SBN promouen efectes similars en la supervivència d'aquestes cèl·lules tant en condicions normals com durant la isquèmia. A més, semblava establert a la bibliografia que Stat3 actua com a activador transcripcional de *Bcl2* (Fukada et al., 1996; Nielsen et al., 1999; Stephanou and Latchman, 2000; Haga et al., 2003; Bhattacharya et al., 2005; Sepúlveda et al., 2007). Malgrat això, el tractament amb SBN no va alterar l'expressió de *Bcl2* als fibroblasts cardíacs, però sí va disminuir l'expressió de Bcl-XL.

La revisió retrospectiva de la bibliografia ens va mostrar que la relació entre Stat3 i l'expressió de *Bcl2* es fonamentava en models experimentals forçats que els podien estar allunyant de les condicions que tenen lloc als fibroblasts cardíacs. Fukada i col·laboradors havien analitzat l'expressió (ARNm)

de *Bcl2* en cèl·lules transfectades i per tant sobre-expressores d'un dominant negatiu de Stat3 sobre un estat de promoció constitutiva de supervivència per sobre-expressió de gp130. Per la seva banda, Nielsen et al analitzaven l'expressió de Bcl-2 per citometria en cèl·lules tractades amb un inhibidor de Jak2, mostrant també disminució en la fosforilació de Stat3 però sense establir relació causal. Stephanou i col·laboradors van mostrar augment d'expressió de luciferasa acoblada a un fragment del promotor de *Bcl2* quan sobre-expressaven Stat3; Haga et al van observar l'increment de l'abundància de Bcl-2 en ratolins infectats amb un adenovirus que induïa la sobre-expressió d'una forma constitutivament activa de Stat3; Bhattacharya i col·laboradors van utilitzar un inhibidor de Jak2 i la sobre-expressió d'una forma dominant negativa de Stat3 per mostrar la reducció de l'abundància de Bcl-2 en un model on l'expressió de *Bcl2* es trobava incrementada; mentre que Sepúlveda i col·laboradors conclouïen la relació entre Stat3 i l'expressió de *Bcl2* a partir d'estudis utilitzant inhibidors de Jak2. En la nostra opinió, la sobre-expressió de Stat3 ja sigui constitutivament actiu o dominant negatiu podia promoure interaccions amb les proteïnes JAK i altres membres de la família STAT que no es donen necessàriament en condicions naturals, pel què creiem que la relació entre el factor de transcripció Stat3 i l'expressió de *Bcl2* hauria de ser revisada tot i constituir un dogma en l'àmbit de la biologia cel·lular i, especialment, en l'àrea oncològica.

La inducció de mort cel·lular als fibroblasts cardíacs pel tractament amb SBN, en cas que aquesta molècula sigui específica de Stat3 com sembla per l'acurat estudi del grup de J.A. Menéndez (Verdura et al., 2018), i en absència d'efectes sobre l'expressió de *Bcl2*, podria indicar que Stat3 regula l'expressió d'alguna altra proteïna protectora, com podria ser Bcl-XL, que com s'ha mostrat en aquest treball la SBN té efectes sobre la seva expressió. Un altre gen protector que s'ha descrit com a diana de Stat3 als cardiomiòcits és MnSOD (Negoro et al., 2001). Tot i que vam detectar disminució de l'expressió de Catalasa en presència de SBN, les nostres dades no donen suport a una regulació de l'expressió de *MnSOD* per Stat3 als fibroblasts cardíacs. Això podria ser degut a diferències en l'expressió dels membres de la família Stat entre cardiomiòcits i fibroblasts o a que els efectes descrits per Negoro i cols. es van fonamentar en una combinació de sobre-expressions de formes de Stat3 constitutivament activa i dominant negativa a cultius, el què pot alterar les interaccions i els llocs d'unió als promotors i, per tant, els efectes biològics observats.

Els nostres resultats tampoc mostren un efecte regulador de Stat3 sobre la respiració cel·lular, en contra del què estava publicat en altres models (Wegrzyn et al., 2009; Zoueïn et al., 2014; Carbognin et al., 2016). De fet, Wegrzyn i col·laboradors van mostrar per immunoprecipitació que Stat3 es pot trobar associat al Complex I a mitocondris de cor i fetge, i que els mitocondris aïllats de ratolins *knock out* condicional al cor per *Stat3* tenen taxes de consum d'oxigen més baixes que els *wild type*. Tot i això, en la nostra experiència, poden haver diferències relatives de consum d'oxigen quan es contrasten dades comparatives obtingudes de la mesura de complexos aïllats, mitocondris aïllats o cèl·lules senceres. Dades prèvies del nostre grup mostraven que els mitocondris aïllats de ratolí

Endog knock out tenien una taxa de consum d'oxigen menor que els de ratolí *wild type*, mentre que no vam trobar diferències en la respiració en cèl·lules senceres (Blasco et al., 2020). Les possibles raons per la manca d'efecte de Stat3 en la respiració als fibroblasts cardíacs podria ser que encara hi havia prou Stat3 actiu/fosforilat malgrat la presència de SBN, o bé que l'ambient cel·lular estigués aportant regulacions que es perden en estudiar mitocondris aïllats. Per la seva banda, Zouein et al van detectar menor respiració a fibroblasts embrionals *knock out* per *Stat3* en un sistema similar al nostre, però només en el què fa referència a la reserva respiratòria (Resp màxima/FCCP-Resp basal), suggerint que l'ambient i/o el tipus cel·lular (l'específic balanç en l'expressió de diferents Stat) podria modificar notablement l'efecte de Stat3 sobre la respiració cel·lular.

Diversos articles que vinculaven Stat3 amb l'expressió de *Bcl2* fonamentaven les seves conclusions en resultats obtinguts utilitzant AG490, un inhibidor de Jak2 (Sakai and Kraft, 1997; Hattori et al., 2001; Bhattacharya et al., 2005; Sepúlveda et al., 2007). S'ha descrit que Jak2 pot interaccionar tant amb Stat3 com amb la resta de membres Stat en funció del receptor al què es trobi associat i a la resta de proteïnes Jak que s'hi trobin vinculades al mateix complex iniciador (Salas et al., 2020). Per tant, vam decidir provar els efectes d'aquest inhibidor. El cultiu de fibroblasts cardíacs en presència de l'inhibidor de Jak2 va mostrar disminució de la supervivència en condicions normals i en isquèmia, així com disminució de la taxa de respiració (tant basal, com associada a síntesi d'ATP, com la capacitat de reserva respiratòria), fins a nivells similars als normals de la resta de fibroblasts. A més, la inhibició de Jak2 també va reduir l'abundància de Bcl-2, Bcl-XL, MnSOD, així com una lleugera disminució del Complex II (SDH), i inclús els nivells de transcrit d'*sg15* fins a nivells similars a la resta de fibroblasts. També, els nivells de ROS van incrementar en condicions basals i en isquèmia amb l'inhibidor. Tot això suggeria que la via Jak/Stat es troba implicada de forma determinant en conferir als fibroblasts cardíacs les característiques moleculars i biològiques que els fan especialment resistents en relació a altres tipus cel·lulars i que, probablement, a més de Stat3, hi ha altres membres de la família de Stat contribuint a la regulació de gens implicats en la supervivència i biologia d'aquestes cèl·lules. La possible vinculació, en especial de Stat5, que s'ha descrit també com a membre regulador de la supervivència al miocardi, i dels factors inductors constitutius de la via, com per exemple l'interferó, serà de gran ajuda per acabar de comprendre la resistència dels fibroblasts cardíacs a la isquèmia i altres tipus d'estrès cel·lular.

» Limitacions del present treball i perspectives

Tot i que el treball realitzat aporta informació fins ara desconeguda sobre la biologia dels fibroblasts cardíacs i la senyalització que la regula, hi ha diverses limitacions a l'hora d'extrapol·lar la rellevància biomèdica dels nostres resultats. Les principals limitacions són, per una banda es tracta d'un model de rosegador i per altra banda es tracta de cèl·lules obtingudes d'animals neonatals i no adults, a més els nostres estudis s'han realitzat fora del teixit original. La utilització de cèl·lules neonatals és deguda a la dificultat tècnica per la obtenció de fibroblasts cardíacs de rosegador adult i el seu manteniment en cultiu el temps suficient per fer els estudis que es presenten a la memòria. La validació d'alguns aspectes en models adults, idealment en fibroblasts cardíacs humans, com ara l'anàlisi de l'expressió de Bcl-2, la producció i manteniment dels nivells de ROS, així com la capacitat respiratòria i el rol de la via Jak/Stat serien de gran utilitat per confirmar o descartar diverses de les potencials dianes terapèutiques descobertes en aquest treball. També seria interessant provar en models experimentals *in vivo* l'eficàcia terapèutica d'alterar algun d'aquests aspectes específicament als fibroblasts cardíacs en models d'isquèmia/reperfusió, hipertròfia cardíaca i, inclús, infecció del miocardi. Així mateix, veiem potencial rellevància a aprofundir en els mecanismes implicats en la observada resistència dels fibroblasts cardíacs a l'estrès de reticle, que només hem caracteritzat de forma superficial, i esbrinar les seves possibles implicacions en quant al metabolisme del calci intracel·lular, que es troba relacionat no només amb la conducció de l'estímul de contracció, sinó també amb la secreció de matriu extracel·lular i la mort del miocardi.

 Conclusions

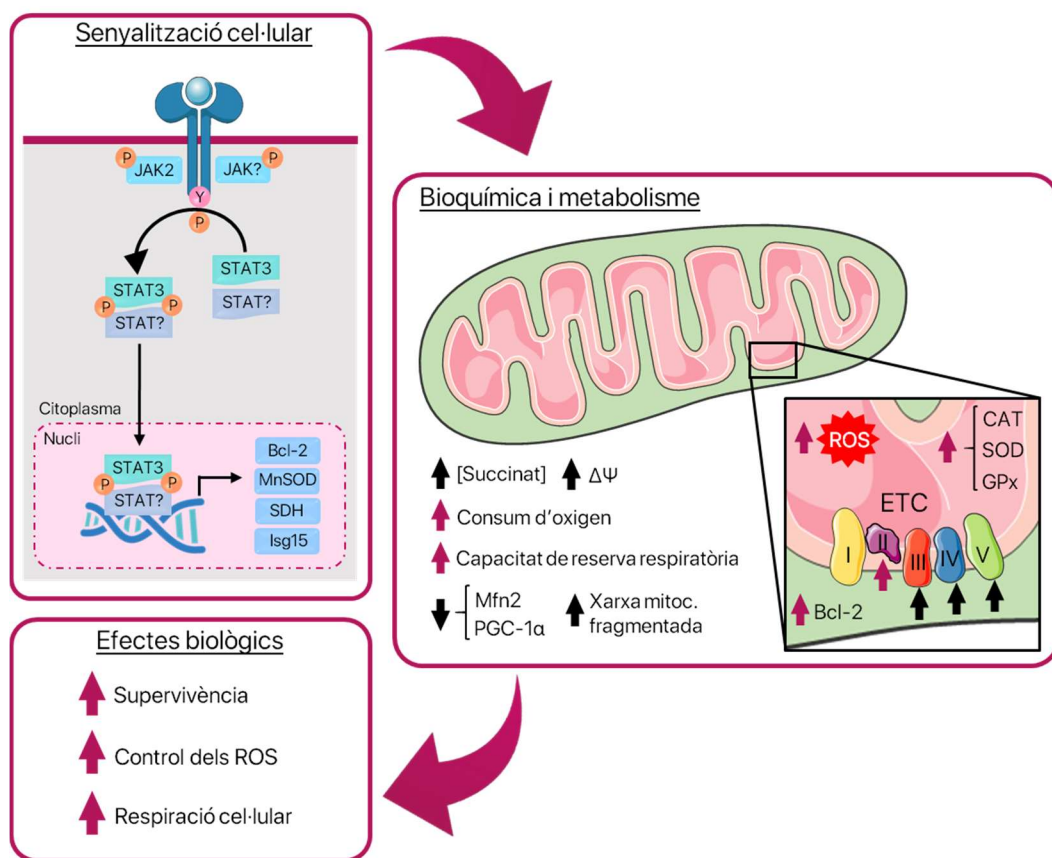
CONCLUSIONS


1. Bcl-2 és important per la proliferació dels fibroblasts cardíacs neonatals de rata en condicions normals i per la seva supervivència durant la isquèmia i l'estrès de reticle endoplasmàtic, evitant l'activació de caspases executores.
2. L'autofàgia és important per mantenir les taxes de proliferació i supervivència dels fibroblasts en condicions normals però no intervé en la supervivència durant la isquèmia.
3. Els fibroblasts cardíacs tenen nivells basals d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) més elevats que els fibroblasts pulmonars i dèrmics, que semblen provenir de la fuga d'electrons a nivell del Complex I de la cadena de transport d'electrons, però mantenen millor els nivells de ROS durant la isquèmia. Això està relacionat amb major expressió d'enzims antioxidants i més abundància de glutatió reduït als fibroblasts cardíacs.
4. La taxa de consum d'oxigen és específica de cada tipus de fibroblasts però els fibroblasts cardíacs presenten nivells de respiració més alts i capacitat de reserva respiratòria més elevada, tant a una pressió parcial d'oxigen del 21% com del 3% i això s'associa amb elevat potencial de membrana mitocondrial, major expressió dels Complexos II a V de la cadena de transport electrònic amb un nombre similar de mitocondris i una xarxa mitocondrial més fragmentada que la resta de fibroblasts.
5. Els fibroblasts cardíacs sobreviuen millor que els pulmonars i els dèrmics a estímuls que indueixen estrès de reticle endoplasmàtic de forma dependent de Bcl-2 i impeding l'activació de Caspasa-3 tot i activar de forma similar les vies canòniques d'estrès de reticle.
6. L'avantatge de supervivència dels fibroblasts cardíacs en relació als pulmonars i dèrmics no sembla associada a diferències en les vies de senyalització dependent de la Ser/Thr quinasa Akt/PKB ni de Nrf2 que, en aquestes cèl·lules, no determina l'expressió de Bcl-2. En canvi, es detecten nivells més abundants de RelA/p65 al nucli dels fibroblasts cardíacs tant en condicions basals com durant la isquèmia, suggerint major activació de la via mitjançada pel complex NF- κ B i associat amb major expressió d'*Isg15*, gen relacionat amb la inflamació dependent d'interferó.

7. Els fibroblasts cardíacs presenten nivells elevats d'activació de Stat3, la seva inhibició redueix la supervivència i l'expressió d'alguns dels gens sobre-expressats en aquestes cèl·lules sense afectar l'expressió de Bcl-2, la respiració ni els nivells de ROS; mentre que la inhibició de Jak2 reverteix la majoria de característiques d'expressió gènica i funcionament analitzades, disminuint la supervivència dels fibroblasts cardíacs, la respiració i els nivells de Bcl-2, així com l'expressió de gens antioxidants i de la cadena de transport electrònic fins a nivells similars a altres fibroblasts, suggerint la rellevància de la via Jak/Stat en aquestes cèl·lules.

Conclusió integrativa:

Els fibroblasts cardíacs presenten una sèrie de característiques associades a una major adaptació a condicions d'estrès cel·lular que altres tipus de fibroblasts, entre les què es troben major supervivència a isquèmia i estrès de reticle, major capacitat respiratòria i millor control dels nivells de radicals lliures d'oxigen. Aquestes funcions estan relacionades amb una major expressió de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2, major expressió dels complexos II a V de la cadena de transport electrònica, una xarxa mitocondrial més fragmentada i major expressió d'enzims antioxidants que altres fibroblasts. Aquest conjunt de característiques funcionals i moleculars es troben regulades en part per la via de transducció de senyals que implica a Jak2 i Stat3.



 Bibliografica

BIBLIOGRAFIA

- Abeyrathna, P., and Su, Y. (2015). The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul. Pharmacol.* 74, 38–48. doi:10.1016/j.vph.2015.05.008.
- Acin-Perez, R., and Enriquez, J. A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 444–450. doi:10.1016/j.bbabi.2013.12.009.
- Alavian, K. N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., et al. (2011). Bcl-x L regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1 FO ATP synthase. *Nat. Cell Biol.* 13, 1224–1233. doi:10.1038/ncb2330.
- Albert, M., Bécares, M., Falqui, M., Fernández-Lozano, C., and Guerra, S. (2018). ISG15, a Small Molecule with Huge Implications: Regulation of Mitochondrial Homeostasis. *Viruses* 10. doi:10.3390/v10110629.
- Anderson, R. H., Razavi, R., and Taylor, A. M. (2004). Cardiac anatomy revisited. *J. Anat.* 205, 159–177. doi:10.1111/j.0021-8782.2004.00330.x.
- Antunes, F., and Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* 475, 121–126. doi:10.1016/S0014-5793(00)01638-0.
- Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., et al. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 1, 259–271. doi:10.1016/j.cmet.2005.03.002.
- Bahi, N., Zhang, J., Llovera, M., Ballester, M., Comella, J. X., and Sanchis, D. (2006). 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, 22943–22952. doi:10.1074/jbc.M601025200.
- Balamurugan, K. (2016). HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int. J. Cancer* 138, 1058–1066. doi:10.1002/ijc.29519.
- Baldanta, S., Fernández-Escobar, M., Acín-Perez, R., Albert, M., Camafeita, E., Jorge, I., et al. (2017). ISG15 governs mitochondrial function in macrophages following vaccinia virus infection. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1006651.
- Bhattacharya, S., Ray, R. M., and Johnson, L. R. (2005). STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and C-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem. J.* 392, 335–344. doi:10.1042/BJ20050465.
- Blasco, N., Beà, A., Barés, G., Girón, C., Navaridas, R., Irazoki, A., et al. (2020). Involvement of the mitochondrial nuclease EndoG in the regulation of cell proliferation through the control of reactive oxygen species. *Redox Biol.* 37. doi:10.1016/j.redox.2020.101736.

- Blasco, N., Cámara, Y., Núñez, E., Beà, A., Barés, G., Forné, C., et al. (2018). Cardiomyocyte hypertrophy induced by Endonuclease G deficiency requires reactive oxygen radicals accumulation and is inhibitable by the micropeptide humanin. *Redox Biol.* 16, 146–156. doi:10.1016/j.redox.2018.02.021.
- Brooks, M. J., and Andrews, D. T. (2013). Molecular mechanisms of ischemic conditioning: Translation into patient outcomes. *Future Cardiol.* doi:10.2217/fca.13.30.
- Byrne, D. P., Shrestha, S., Galler, M., Cao, M., Daly, L. A., Campbell, A. E., et al. (2020). Aurora A regulation by reversible cysteine oxidation reveals evolutionarily conserved redox control of Ser/Thr protein kinase activity. *Sci. Signal.* 13, 1–22. doi:10.1126/scisignal.aax2713.
- Camelliti, P., Borg, T. K., and Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 65, 40–51. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.020.
- Campos-Silva, C., Reyes-Torres, I., Rivera, M., Meza-Torres, C., Hernández-Camacho, J. D., Rodríguez-Bies, E., et al. (2017). Regulation of the expression of coenzyme Q-synthesis complex during ageing. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 52, 307–312. doi:10.1016/j.regg.2017.03.003.
- Carbognin, E., Betto, R. M., Soriano, M. E., Smith, A. G., and Martello, G. (2016). Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J.* 35, 618–634. doi:10.15252/embj.201592629.
- Cardona, M., López, J. A., Serafín, A., Rongvaux, A., Inserte, J., García-Dorado, D., et al. (2015). Executioner Caspase-3 and 7 Deficiency Reduces Myocyte Number in the Developing Mouse Heart. *PLoS One* 10, e0131411. doi:10.1371/journal.pone.0131411.
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. El, Matejuk, A., Grillon, C., and Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1239–1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
- Chaban, Y., Boekema, E. J., and Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 418–426. doi:10.1016/j.bbabi.2013.10.004.
- Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z. J. (2016). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* 17, 1142–1149. doi:10.1038/ni.3558.
- Chen, Y., and Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* 124, 161–170. doi:10.1242/jcs.064576.
- Chen, Z. X., and Pervaiz, S. (2007). Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell Death Differ.* 14, 1617–1627. doi:10.1038/sj.cdd.4402165.

- Cherh, I., Low, C., and Chen, Z. X. (2010). Bcl-2 Modulates Resveratrol-Induced ROS Production. *Antioxidants Redox Signal*. 13. doi:10.1089/ars.2009.3050.
- Chonghaile, T. N., Gupta, S., John, M., Szegezdi, E., Logue, S. E., and Samali, A. (2015). BCL-2 modulates the unfolded protein response by enhancing splicing of X-box binding protein-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.100.
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., et al. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431–435. doi:10.1038/nature13909.
- Cleland, M. M., Norris, K. L., Karbowski, M., Wang, C., Suen, D. F., Jiao, S., et al. (2011). Bcl-2 family interaction with the mitochondrial morphogenesis machinery. *Cell Death Differ.* 18, 235–247. doi:10.1038/cdd.2010.89.
- Connolly, N. M. C., Theurey, P., Adam-Vizi, V., Bazan, N. G., Bernardi, P., Bolaños, J. P., et al. (2018). *Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases*. Springer US doi:10.1038/s41418-017-0020-4.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592. doi:10.1002/cbin.11137.
- Davidson, S. M., Adameová, A., Barile, L., Cabrera-Fuentes, H. A., Lazou, A., Pagliaro, P., et al. (2020). Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. *J. Cell. Mol. Med.*, 1–12. doi:10.1111/jcmm.15127.
- De Brito, O. M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2: A mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxidants Redox Signal*. 10, 621–633. doi:10.1089/ars.2007.1934.
- Deb, A., and Ubil, E. (2014). Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 47–55. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.017.
- Del Re, D. P., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q., and Kitsis, R. N. (2019). Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease. *Physiol. Rev.* 99, 1765–1817. doi:10.1152/physrev.00022.2018.
- Delles, C., Miller, W. H., and Dominiczak, A. F. (2008). Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Antioxid. Redox Signal*. 10, 1061–77. doi:10.1089/ars.2007.2008.
- Dengler, V. L., Galbraith, M. D., and Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 1–15. doi:10.3109/10409238.2013.838205.
- Dhingra, R., Guberman, M., Rabinovich-Nikitin, I., Gerstein, J., Margulets, V., Gang, H., et al. (2019). Impaired NF- κ B signalling underlies cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* doi:10.1093/cvr/cvz240.

- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., and Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi:10.1155/2016/1245049.
- Dikic, I., and Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/s41580-018-0003-4.
- Dini, F. L., Guarini, G., Ballo, P., Carluccio, E., Maiello, M., Capozza, P., et al. (2013). 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.* 14, 214–220. doi:10.2459/JCM.0b013e32834ae7fe.
- Diwan, A., Krenz, M., Syed, F. M., Wansapura, J., Ren, X., Koesters, A. G., et al. (2007). Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 2825–2833. doi:10.1172/JCI32490.
- Dorn, G. W. (2019). Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annu. Rev. Physiol.* 81, 1–17. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114358.
- Dos Santos, P. F., and Mansur, D. S. (2017). Beyond ISGylation: Functions of Free Intracellular and Extracellular ISG15. *J. Interf. Cytokine Res.* 37, 246–253. doi:10.1089/jir.2016.0103.
- Du, Y., Duan, T., Feng, Y., Liu, Q., Lin, M., Cui, J., et al. (2018). LRRC25 inhibits type I IFN signaling by targeting ISG15-associated RIG-I for autophagic degradation. *EMBO J.* 37, 351–366. doi:10.15252/embj.201796781.
- Fivenson, E. M., Lautrup, S., Sun, N., Scheibye-Knudsen, M., Stevnsner, T., Nilsen, H., et al. (2017). Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem. Int.* 109, 202–209. doi:10.1016/j.neuint.2017.02.007.
- Florea, B. I., Meaney, C., Junginger, H. E., and Borchard, G. (2002). Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci* 4, E12. doi:10.1208/ps040312.
- Foo, R. S., Mani, K., and Kitsis, R. N. (2005). Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 115, 565–571. doi:10.1172/JCI200524569.
- Fu, X., Blaxall, B. C., and Molkentin, J. D. (2018). Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest* 128, 2127–2143. doi:10.1172/JCI98215.
- Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., et al. (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: Involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449–460. doi:10.1016/S1074-7613(00)80501-4.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 1583–1606. doi:10.1089/ars.2011.3999.

- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., et al. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 34, 856–880. doi:10.15252/embj.201490784.
- Galluzzi, L., Yamazaki, T., and Kroemer, G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 731–745. doi:10.1038/s41580-018-0068-0.
- Gálvez, A. S., Brunskill, E. W., Marreez, Y., Benner, B. J., Regula, K. M., Kirschenbaum, L. A., et al. (2006). Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress. *J. Biol. Chem.* 281, 1442–1448. doi:10.1074/jbc.M509056200.
- Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S. P., and Rohr, S. (2003). Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ. Res.* 93, 421–428. doi:10.1161/01.RES.0000089258.40661.0C.
- Gkikas, I., Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2018). The role of mitophagy in innate immunity. *Front. Immunol.* 9, 1–15. doi:10.3389/fimmu.2018.01283.
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., and Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 583–596. doi:10.1007/BF02111656.
- Gordaliza-Alaguero, I., Cantó, C., and Zorzano, A. (2019). Metabolic implications of organelle–mitochondria communication. *EMBO Rep.* 20, 1–27. doi:10.15252/embr.201947928.
- Gordon, J. W., Shaw, J. A., and Kirshenbaum, L. A. (2011). Multiple facets of NF- κ B in the heart: To be or not to NF- κ B. *Circ. Res.* 108, 1122–1132. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226928.
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., et al. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2. doi:10.1038/nrdp.2016.80.
- Grivennikov, S. I., and Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.005.
- Gross, A., and Katz, S. G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ.* 24, 1348–1358. doi:10.1038/cdd.2017.22.
- Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., and Yang, M. (2017). Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell* 170, 1247–1257.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.07.050.
- Gutteridge, J. M. C., and Halliwell, B. (2000). Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136–147. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x.
- Gutteridge, J. M. C., and Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561–564. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.071.

- Hadebe, N., Cour, M., and Lecour, S. (2018). The SAFE pathway for cardioprotection: is this a promising target? *Basic Res. Cardiol.* 113, 9. doi:10.1007/s00395-018-0670-5.
- Haga, S., Terui, K., Zhang, H. Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., et al. (2003). Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 112, 989–998. doi:10.1172/JCI200317970.
- Hall, G., Hasday, J. D., and Rogers, T. B. (2006). Regulating the regulator: NF- κ B signaling in heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 580–591. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.006.
- Hamanaka, R. B., and Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* 35, 505–513. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.002.
- Han, H. G., Moon, H. W., and Jeon, Y. J. (2018). ISG15 in cancer: Beyond ubiquitin-like protein. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2018.09.007.
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., and Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 579–593. doi:10.1038/s41580-018-0033-y.
- Hattori, R., Maulik, N., Otani, H., Zhu, L., Cordis, G., Engelman, R. M., et al. (2001). Role of STAT3 in Ischemic Preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1929–1936. doi:10.1006/jmcc.2001.1456.
- Hetz, C. (2006). Proapoptotic BAX and BAK Modulate the Unfolded Protein Response by a Direct Interaction with IRE1. *Science.* 312, 572–576. doi:10.1126/science.1123480.
- Hetz, C., and Papa, F. R. (2018). The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* 69, 169–181. doi:10.1016/j.molcel.2017.06.017.
- Humeres, C., and Frangogiannis, N. G. (2019). Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic to Transl. Sci.* 4, 449–467. doi:10.1016/j.jacbts.2019.02.006.
- Hwang, M. S., Rohlena, J., Dong, L. F., Neuzil, J., and Grimm, S. (2014). Powerhouse down: Complex II dissociation in the respiratory chain. *Mitochondrion* 19, 20–28. doi:10.1016/j.mito.2014.06.001.
- Ichim, G., and Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* 16, 539–548. doi:10.1038/nrc.2016.58.
- Ieda, M., Tsuchihashi, T., Ivey, K. N., Ross, R. S., Hong, T. T., Shaw, R. M., et al. (2009). Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through β 1 Integrin Signaling. *Dev. Cell* 16, 233–244. doi:10.1016/j.devcel.2008.12.007.
- Ighodaro, O. M., and Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54, 287–293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.

- Inserte, J., Cardona, M., Poncelas-Nozal, M., Hernando, V., Vilarrosa, Ú., Aluja, D., et al. (2016). 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, 1–10. doi:10.1007/s00395-016-0537-6.
- Ivey, M. J., and Tallquist, M. D. (2016). Defining the cardiac fibroblast. *Circ. J.* 80, 2269–2276. doi:10.1253/circj.CJ-16-1003.
- Jang, S., and Javadov, S. (2018). Elucidating the contribution of ETC complexes I and II to the respirasome formation in cardiac mitochondria. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-36040-9.
- Kalakech, H., Hibert, P., Prunier-Mirebeau, D., Tamareille, S., Letournel, F., Macchi, L., et al. (2014). Risk and safe signaling pathway involvement in apolipoprotein a-i-induced cardioprotection. *PLoS One* 9, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0107950.
- Karbowski, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443, 658–662. doi:10.1038/nature05111.
- Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472. doi:10.1038/nrm4024.
- Kim, J., Gupta, R., Blanco, L. P., Yang, S., Shteinifer-Kuzmine, A., Wang, K., et al. (2019). VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease. *Science.* 366, 1531–1536. doi:10.1126/science.aav4011.
- Kim, K. H., and Lee, M. S. (2014). Autophagy - A key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 322–337. doi:10.1038/nrendo.2014.35.
- Kim, Y. C., Guan, K., Kim, Y. C., and Guan, K. (2015). mTOR : a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* 125, 25–32. doi:10.1172/JCI73939.such.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., and Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.* 37, 8471–8486. doi:10.1007/s13277-016-5035-9.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11. doi:10.1038/sj.cdd.4401724.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell* 40, 280–293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023.
- Kubli, D. A., Quinsay, M. N., Huang, C., Lee, Y., and Gustafsson, Å. B. (2008). Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 295, 2025–2031. doi:10.1152/ajpheart.00552.2008.

- Lagouge, M., and Larsson, N. G. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J. Intern. Med.* 273, 529–543. doi:10.1111/joim.12055.
- Lampert, M. A., Orogo, A. M., Najor, R. H., Hammerling, B. C., Leon, L. J., Wang, B. J., et al. (2019). BNIP3L/NIX and FUNDC1-mediated mitophagy is required for mitochondrial network remodeling during cardiac progenitor cell differentiation. *Autophagy* 15, 1182–1198. doi:10.1080/15548627.2019.1580095.
- Larosa, V., and Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci. Rep.* 38, 1–14. doi:10.1042/BSR20171492.
- Lavandero, S., Rothermel, B. A., Hill, J. A., Lavandero, S., Chiong, M., Rothermel, B. A., et al. (2015). Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest.* 125, 55–64. doi:https://doi.org/10.1172/JCI73943.
- Lecour, S. (2009). Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 32–40. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.019.
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J. H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., et al. (2009). Persistently Activated Stat3 Maintains Constitutive NF- κ B Activity in Tumors. *Cancer Cell* 15, 283–293. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.015.
- Levine, B., Liu, R., Dong, X., and Zhong, Q. (2015). Beclin orthologs: Integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. *Trends Cell Biol.* 25, 533–544. doi:10.1016/j.tcb.2015.05.004.
- Levine, B., Sinha, S., and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*. doi:10.4161/auto.6260.
- Li, P. A., Hou, X., and Hao, S. (2017). Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 95, 2025–2029. doi:10.1002/jnr.24042.
- Liesa, M., Palacín, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 799–845. doi:10.1152/physrev.00030.2008.
- Liu, L., Locascio, L. M., and Doré, S. (2019). Critical Role of Nrf2 in Experimental Ischemic Stroke. *Front. Pharmacol.* 10. doi:10.3389/fphar.2019.00153.
- Lobo-Jarne, T., and Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76, 179–190. doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.021.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.

- Martelli, A. M., Paganelli, F., Chiarini, F., Evangelisti, C., and McCubrey, J. A. (2020). The unfolded protein response: A novel therapeutic target in acute leukemias. *Cancers (Basel)*. 12. doi:10.3390/cancers12020333.
- Martínez-Reyes, I., and Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* 11, 102. doi:10.1038/s41467-019-13668-3.
- Mayorga, M., Bahi, N., Ballester, M., Comella, J. X., and Sanchis, D. (2004). Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 34882–34889. doi:10.1074/jbc.M404616200.
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L.-O., Aw, T.-Y., and Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259. doi:10.1128/mcb.21.4.1249-1259.2001.
- Meier, J. A., Hyun, M., Cantwell, M., Raza, A., Mertens, C., Raje, V., et al. (2017). Stress-induced dynamic regulation of mitochondrial STAT3 and its association with cyclophilin D reduce mitochondrial ROS production. *Sci. Signal.* 10. doi:10.1126/scisignal.aag2588.
- Mick, D. U., Fox, T. D., and Rehling, P. (2011). Inventory control: Cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 14–20. doi:10.1038/nrm3029.
- Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., et al. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 167, 457–470.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.08.064.
- Motwani, M., Pesiridis, S., and Fitzgerald, K. A. (2019). DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 20, 657–674. doi:10.1038/s41576-019-0151-1.
- Moyzis, A. G., Sadoshima, J., and Gustafsson, Å. B. (2015). Mending a broken heart: The role of mitophagy in cardioprotection. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 308, H183–H192. doi:10.1152/ajpheart.00708.2014.
- Moyzis, A., and Gustafsson, Å. B. (2019). Multiple recycling routes: Canonical vs. non-canonical mitophagy in the heart. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1865, 797–809. doi:10.1016/j.bbadis.2018.09.034.
- Muñoz, J. P., Ivanova, S., Sánchez-Wandelmer, J., Martínez-Cristóbal, P., Noguera, E., Sancho, A., et al. (2013). Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J.* 32, 2348–2361. doi:10.1038/emboj.2013.168.
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., and Kondo, T. (2003). Glutaredoxin Exerts an Antiapoptotic Effect by Regulating the Redox State of Akt. *J. Biol. Chem.* 278, 50226–50233. doi:10.1074/jbc.M310171200.

- Murphy, M. P., and O'Neill, L. A. J. (2018). Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. *Cell* 174, 780–784. doi:10.1016/j.cell.2018.07.030.
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., et al. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 11249–11254. doi:10.1073/pnas.1606786113.
- Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M. I., Eizirik, D. L., et al. (2001). Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation*. doi:10.1161/hc3401.095947.
- Nickens, K. P., Wikstrom, J. D., Shirihai, O. S., Patierno, S. R., and Ceryak, S. (2013). A bioenergetic profile of non-transformed fibroblasts uncovers a link between death-resistance and enhanced spare respiratory capacity. *Mitochondrion* 13, 662–667. doi:10.1016/j.mito.2013.09.005.
- Nielsen, M., Kæstel, C. G., Eriksen, K. W., Woetmann, A., Stokkedal, T., Kaltoft, K., et al. (1999). Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia* 13, 735–738. doi:10.1038/sj.leu.2401415.
- Niture, S. K., and Jaiswal, A. K. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 9873–9886. doi:10.1074/jbc.M111.312694.
- Ortiz-Prado, E., Dunn, J. F., Vasconez, J., Castillo, D., and Viscor, G. (2019). Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *Am. J. Blood Res.* 9, 1–14.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., and Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723. doi:10.1016/j.beem.2012.05.003.
- Otera, H., and Mihara, K. (2011). Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J. Biochem.* 149, 241–251. doi:10.1093/jb/mvr002.
- Palikaras, K., Lionaki, E., and Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 20, 1013–1022. doi:10.1038/s41556-018-0176-2.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., et al. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy at Dallas. 122, 927–939. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002.
- Perciavalle, R. M., Stewart, D. P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat. Cell Biol.* 14, 575–583. doi:10.1038/ncb2488.

- Perng, Y. C., and Lenschow, D. J. (2018). ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 423–439. doi:10.1038/s41579-018-0020-5.
- Pfanner, N., Warscheid, B., and Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 267–284. doi:10.1038/s41580-018-0092-0.
- Pfleger, J., He, M., and Abdellatif, M. (2015). Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* 6, 1–14. doi:10.1038/cddis.2015.202.
- Picca, A., Mankowski, R. T., Burman, J. L., Donisi, L., Kim, J. S., Marzetti, E., et al. (2018). Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 543–554. doi:10.1038/s41569-018-0059-z.
- Piek, A., de Boer, R. A., and Silljé, H. H. W. (2016). The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 21, 199–211. doi:10.1007/s10741-016-9536-9.
- Pinto, A. R., Ilinykh, A., Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., D'antoni, M. L., Debuque, R., et al. (2016). Revisiting cardiac cellular composition. *Circ. Res.* 118, 400–409. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.
- Puente, B. N., Kimura, W., Muralidhar, S. A., Moon, J., Amatruda, J. F., Phelps, K. L., et al. (2014). The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157, 565–579. doi:10.1016/j.cell.2014.03.032.
- Putinski, C., Abdul-Ghani, M., Stiles, R., Brunette, S., Dick, S. A., Fernando, P., et al. (2013). Intrinsic-mediated caspase activation is essential for cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110. doi:10.1073/pnas.1315587110.
- Ranjan, P., Kumari, R., and Verma, S. K. (2019). Cardiac Fibroblasts and Cardiac Fibrosis: Precise Role of Exosomes. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 1–12. doi:10.3389/fcell.2019.00318.
- Ravanan, P., Srikumar, I. F., and Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci.* 188, 53–67. doi:10.1016/j.lfs.2017.08.029.
- Riley, J. S., and Tait, S. W. (2020). Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Rep.*, e49799. doi:10.15252/embr.201949799.
- Rizzi, E., Guimaraes, D. A., Ceron, C. S., Prado, C. M., Pinheiro, L. C., Martins-Oliveira, A., et al. (2014). 1-Adrenergic blockers exert antioxidant effects, reduce matrix metalloproteinase activity, and improve renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Free Radic. Biol. Med.* 73, 308–317. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.024.
- Robb, E. L., Hall, A. R., Prime, T. A., Eaton, S., Szibor, M., Viscomi, C., et al. (2018). Control of mitochondrial superoxide production by reverse electron transport at complex I. *J. Biol. Chem.* 293, 9869–9879. doi:10.1074/jbc.RA118.003647.

- Rongvaux, A., Jackson, R., Harman, C. C. D., Li, T., West, A. P., De Zoete, M. R., et al. (2014). Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 159, 1563–1577. doi:10.1016/j.cell.2014.11.037.
- Sakai, I., and Kraft, A. S. (1997). The kinase domain of Jak2 mediates induction of Bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 272, 12350–12358. doi:10.1074/jbc.272.19.12350.
- Salas, A., Hernandez-Rocha, C., Duijvestein, M., Faubion, W., McGovern, D., Vermeire, S., et al. (2020). JAK–STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 323–337. doi:10.1038/s41575-020-0273-0.
- Schrepfer, E., and Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol. Cell* 61, 683–694. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.022.
- Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., and Sanz, A. (2017). Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease. *Front. Physiol.* 8, 1–7. doi:10.3389/fphys.2017.00428.
- Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D., and Sadoshima, J. (2018). The Role of Autophagy in the Heart. *Annu. Rev. Physiol.* 80, 1–26. doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121427.
- Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 167–171. doi:10.1016/S0955-0674(00)00194-0.
- Semenza, G. L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009.
- Sepúlveda, P., Encabo, A., Carbonell-Uberos, F., and Miñana, M. D. (2007). BCL-2 expression is mainly regulated by JAK/STAT3 pathway in human CD34+ hematopoietic cells [1]. *Cell Death Differ.* 14, 378–380. doi:10.1038/sj.cdd.4402007.
- Signes, A., and Fernandez-Vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays Biochem.* 62, 255–270. doi:10.1042/EBC20170098.
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M., and Zhang, Q. (2017). Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J. Cell. Physiol.* doi:10.1002/jcp.25785.
- Soriano, F. X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D. C., Palacín, M., and Zorzano, A. (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , estrogen-related receptor- α , and mitofusin 2. *Diabetes* 55, 1783–1791. doi:10.2337/db05-0509.
- Sprenger, H.-G., and Langer, T. (2019). The Good and the Bad of Mitochondrial Breakups. *Trends Cell Biol.* 29, 888–900. doi:10.1016/j.tcb.2019.08.003.

- Stefely, J. A., and Pagliarini, D. J. (2017). Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 42, 824–843. doi:10.1016/j.tibs.2017.06.008.
- Stephanou, A., and Latchman, D. S. (2000). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Cell Death Differ.*, 329–330. doi:10.1080/08977190500178745.
- Tait, S. W. G., and Green, D. R. (2012). Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci.* 125, 807–815. doi:10.1242/jcs.099234.
- Tallquist, M. D., and Molkentin, J. D. (2017). Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 484–491. doi:10.1038/nrcardio.2017.57.
- Tamareille, S., Mateus, V., Ghaboura, N., Jeanneteau, J., Croué, A., Henrion, D., et al. (2011). RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 106, 1329–1339. doi:10.1007/s00395-011-0210-z.
- Tanemura, M., Ohmura, Y., Deguchi, T., MacHida, T., Tsukamoto, R., Wada, H., et al. (2012). Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am. J. Transplant.* 12, 102–114. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03771.x.
- Taniguchi, K., and Karin, M. (2018). NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 309–324. doi:10.1038/nri.2017.142.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-Mcdermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242. doi:10.1038/nature11986.
- Tas, S. W., Maracle, C. X., Balogh, E., and Szekanecz, Z. (2016). Targeting of proangiogenic signalling pathways in chronic inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 111–122. doi:10.1038/nrrheum.2015.164.
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., and Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 62, 341–360. doi:10.1042/EBC20170104.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants Redox Signal.* 29, 1727–1745. doi:10.1089/ars.2017.7342.
- Uittenbogaard, M., and Chiaramello, A. (2014). Mitochondrial Biogenesis: A Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5574–5593. doi:10.2174/1381612820666140305224906.
- Vairo, G., Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., DeCaprio, J. A., Ewen, M. E., et al. (2000). Bcl-2 Retards Cell Cycle Entry through p27Kip1, pRB Relative p130, and Altered E2F Regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4745–4753. doi:10.1128/mcb.20.13.4745-4753.2000.

- Valen, G., Yan, Z. Q., and Hansson, G. K. (2001). Nuclear factor kappa-B and the heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 307–314. doi:10.1016/S0735-1097(01)01377-8.
- Valls-Lacalle, L., Barba, I., Miró-Casas, E., Ruiz-Meana, M., Rodríguez-Sinovas, A., and García-Dorado, D. (2018). Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size. *Sci. Rep.* 8, 1–10. doi:10.1038/s41598-018-20866.
- Verdura, S., Cuyàs, E., Llorach-Parés, L., Pérez-Sánchez, A., Micol, V., Nonell-Canals, A., et al. (2018). Silibinin is a direct inhibitor of STAT3. *Food Chem. Toxicol.* 116, 161–172. doi:10.1016/j.fct.2018.04.028.
- Wang, M., and Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 14, 581–597. doi:10.1038/nrc3800.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928. doi:10.1083/jcb.201708007.
- Wang, Y., and Hekimi, S. (2016). Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol.* 26, 367–378. doi:10.1016/j.tcb.2015.12.007.
- Weber, K. T., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Ahokas, R. A., and Gerling, I. C. (2013). Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat. Rev. Cardiol.* 10, 15–26. doi:10.1038/nrcardio.2012.158.
- Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y. J., Sepuri, N. B. V., Zhang, Q., Koeck, T., et al. (2009). Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science.* 323, 793–797. doi:10.1126/science.1164551.
- West, A. P., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M. C., Pineda, C. M., Lang, S. M., et al. (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 520, 553–557. doi:10.1038/nature14156.
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., and Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex i. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1857, 902–914. doi:10.1016/j.bbabi.2016.02.013.
- Wittrup, A., and Lieberman, J. (2015). Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* 16, 543–552. doi:10.1038/nrg3978.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* doi:10.1016/S0092-8674(00)80611-X.
- Wulf, D. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 88, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.

- Xin, M., Olson, E. N., and Bassel-duby, R. (2013). Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 529–541. doi:10.1038/nrm3619.Mending.
- Yan, Duanmu, Zeng, Liu, and Song (2019). Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells* 8, 379.
- Zemirli, N., Morel, E., and Molino, D. (2018). Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–19. doi:10.3390/ijms19020564.
- Zhang, G., Wang, X., Gillette, T. G., Deng, Y., and Wang, Z. V (2019). Unfolded Protein Response as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 19, 1902–1917. doi:10.2174/1568026619666190521093049.
- Zhang, J., and Ney, P. A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 16, 939–946. doi:10.1038/cdd.2009.16.
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., and Yu, Z. Bin (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* 44, 3–15. doi:10.3892/ijmm.2019.4188.
- Zouein, F. A., Duhé, R. J., Arany, I., Shirey, K., Hosler, J. P., Liu, H., et al. (2014). Loss of STAT3 in mouse embryonic fibroblasts reveals its Janus-like actions on mitochondrial function and cell viability. *Cytokine* 66, 7–16. doi:10.1016/j.cyto.2013.12.006.