



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel de las cardiocinas FGF21 y Metrnl en la hipertrofia cardíaca

Celia Rupérez Gonzalo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

The background of the cover is a grayscale microscopic image of cells, overlaid with vibrant red and orange staining. The staining highlights specific cellular components, possibly nuclei or membranes, creating a high-contrast, textured appearance. The overall aesthetic is scientific and modern.

Papel de las cardiocinas FGF21 y Metrnl en la hipertrofia cardíaca

*Celia Rupérez Gonzalo
Tesis Doctoral
2020*



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Papel de las cardiocinas FGF21 y Metrnl en la hipertrofia cardíaca

Celia Rupérez Gonzalo

2020

Grupo de Cardiología Molecular

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular
Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

Papel de las cardiocinas FGF21 y Metrnl en la hipertrofia cardíaca

Memoria presentada por

Celia Rupérez Gonzalo

para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Firma de los directores

Dr. Francesc Villarroya Gombau

Dra. Anna Planavila Porta

Barcelona, 2020

Sinopsis

Cardiokines are proteins produced and secreted by the heart, that have an important role in the correct maintenance of its function. In the present work, a new role for FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) has been described. Also, we prove that Metrnl (Meteorin-like) is a novel cardiokine with relevant cardioprotective functions.

Our group first reported that FGF21 is responsible for cardioprotective mechanisms against hypertrophy development and oxidative stress. FGF21 is a secretable protein with a well-known role in glucose homeostasis regulation, ketogenesis and thermogenic activation, though the potential FGF21 protection against obesity effects in the heart remained unknown to the date. Therefore, in the present work we first describe how FGF21 deficiency causes excessive myocardial accumulation of lipidic vessels, leading to hypertrophy and cardiac dysfunction. FGF21 protective actions against lipotoxicity are mediated by autophagy (and lipophagy) increased activity, due directly to FGF21 signaling pathway activation.

Metrnl is a protein secreted by the adipose tissue and the skeletal muscle, that increases energy expenditure and decreases inflammation. Although Metrnl is highly expressed in the cardiac muscle, as far as we know there are no reports regarding its cardiac function. Here we first characterized Metrnl as a new cardiokine, produced and secreted mostly by cardiomyocytes. Metrnl expression is increased in response to a wide range of cardiac stress conditions, and it has autocrine effects in the cardiomyocytes as well, where Metrnl increases PGC1 α expression, a transcriptional co-activator with extensively reported anti-hypertrophic properties. Metrnl absence induces cardiac alterations, that include an anomalous hypertrophy pattern where the interventricular septum thickness is increased, more fibrosis and changes in the activation profile of cardiac immune cells. Metrnl expression recovery is enough to correct those alterations and to protect against cardiac hypertrophy. Finally, Metrnl potential as a cardiac pathology biomarker has been evaluated within a large cohort of patients with heart failure. We concluded that Metrnl is a strong prognostic biomarker of survival in these patients.

As a summary, the present work contributes to a better understanding of the roles of the cardiokines FGF21 and Metrnl, and its relevance for the maintenance of the cardiac function.

Contenido

La presente tesis doctoral, que lleva por título **Papel de las cardiocinas FGF21 y Metrnl en la hipertrofia cardíaca**, se estructura según la normativa vigente en lo referente al formato de tesis clásica, establecida por la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, y consta de los siguientes apartados:

Sinopsis

Índice

Listado de abreviaturas

Listado de figuras y tablas

Introducción

Objetivos

Materiales y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Bibliografía

Apéndice

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral fueron publicados parte de los resultados obtenidos. La siguiente publicación se encuentra adjunta como **Apéndice**:

Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy. International Journal of Cardiology, 2018

Índice

SINOPSIS	5
CONTENIDO	9
ÍNDICE	13
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	19
LISTADO DE ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	31
La hipertrofia cardíaca	33
Tipos de hipertrofia cardíaca	35
Estímulos desencadenantes	38
Receptores de estrés biomecánico	39
Moléculas señalizadoras	41
Efectos de la hipertrofia cardíaca	42
Aumento del tamaño cardíaco	42
Expresión de genes fetales	44
Aumento de la síntesis proteica	46
Alteraciones metabólicas	46
Inflamación	50
Estrés oxidativo	52
Fibrosis	54
Marcadores de hipertrofia cardíaca	55
Cardiocinas	57
Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)	60
FGF21 en corazón	63
FGF21 en metabolismo	65
Meteorin-like (Metrnl)	67
Metrnl en el músculo esquelético	69
Metrnl en el tejido adiposo	70
Metrnl en el sistema inmune	73
Autofagia	75
Tipos de autofagia	76
Mecanismos	77
Regulación de la autofagia	79
mTOR	79
AMPK y GSK-3 β	80
Estrés oxidativo	80
Mecanismos transcripcionales	80

Estudio de la autofagia	81
Autofagia e hipertrofia cardíaca	82
Autofagia y patologías cardíacas asociadas con la obesidad	85
OBJETIVOS	89
MATERIALES Y MÉTODOS	93
Estudios en animales y cultivos celulares	95
Modelos animales	95
Colonia Fgf21-/-	95
Colonia PPAR α -/-	95
Colonia Metrnl-/-	95
Intervenciones en animales	96
Inducción de la hipertrofia cardíaca	96
Inducción de hipertensión	96
Vectores víricos adeno-asociados (AAV)	96
Medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca	97
Ecocardiografías	97
Análisis histológicos e inmunohistoquímicas	98
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	99
Cultivos primarios de cardiomiocitos	99
Cultivos de cardiomiocitos de rata	99
Cultivos de fibroblastos cardíacos de rata	100
Cultivos de cardiomiocitos de ratón	100
Tratamiento de las células cardíacas en cultivo	101
Transducción génica mediante adenovirus (Ad)	101
Medición de la oxidación de ácidos grasos	101
Determinación de la actividad de la aconitasa y del complejo IV	102
Determinación de malondialdehído (MDA)	102
Extracción de proteínas y detección por Western Blot	102
Aislamiento de ARNm y RT-qPCR	103
Análisis de metabolitos en plasma y fosforilación de proteínas	104
Estadística	104
Estudios en humanos	105
Biopsias cardíacas	105
Análisis histológicos	105
Muestras de plasma	106
Población del estudio	106

Seguimiento y resultados	106
Estadística	107
RESULTADOS	109
Parte 1: Estudios acerca de FGF21	109
Parte 2: Estudios acerca de Metrnl	129
DISCUSIÓN	163
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	179
APÉNDICE	207
Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy	

Figuras y tablas

Figura 1	Esquema de las alteraciones que conducen al desarrollo de la hipertrofia patológica y a la remodelación cardíaca	37
Figura 2	Principales vías de señalización involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca	39
Figura 3	Representación esquemática del tipo de hipertrofia según la geometría que adquieren los cardiomiocitos	43
Figura 4	Cambios metabólicos durante la hipertrofia patológica y la insuficiencia cardíaca	48
Figura 5	Superfamilia de los factores de crecimiento fibroblásticos	61
Figura 6	Señalización de FGF21 en las células cardíacas	64
Figura 7	Mecanismos de acción de la proteína Metrnl sobre la regulación del metabolismo energético global	72
Figura 8	Regulación de las vías de la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA)	77
Figura 9	Sistema cardíaco de FGF21 y su receptor durante la obesidad	111
Figura 10	Niveles cardíacos del co-receptor de FGF21 durante la obesidad	112
Figura 11	Niveles de expresión de ARNm de FGF21 y β -klotho en NCMs tras el tratamiento con ácidos grasos	113
Figura 12	Efectos de la dieta rica en grasas sobre la hipertrofia cardíaca en ratones deficientes en FGF21	116
Figura 13	Efectos de la dieta rica en grasas sobre la fibrosis cardíaca en ratones deficientes en FGF21	117
Figura 14	Efectos sobre el estrés oxidativo de la dieta rica en grasas en ratones wt y deficientes en FGF21	118
Figura 15	Niveles cardíacos de expresión de ARNm de los marcadores de estrés oxidativo Ucp3, Cat, Sod2, Gpx1 y Prdx5 en ratones wt y deficientes en FGF21	119
Figura 16	Niveles cardíacos de la proteína UCP3 en ratones wt y deficientes en FGF21 alimentados con una dieta estándar o con una dieta rica en grasas durante 16 semanas	120
Figura 17	Acumulación cardíaca de lípidos en corazones de ratones deficientes en FGF21: efectos de la dieta HF	121
Figura 18	Efectos sobre el metabolismo de los ácidos grasos de la dieta rica en grasas en ratones wt y deficientes en FGF21	122
Figura 19	FGF21 está involucrada en la regulación de la autofagia cardíaca <i>in vivo</i>	124
Figura 20	Actividad mitocondrial y estado de la mitofagia en ratones wt y deficientes en FGF21 alimentados con dieta HF durante 16 semanas	125
Figura 21	FGF21 regula la autofagia a nivel transcripcional en cardiomiocitos	126

Figura 22	FGF21 regula la actividad autofágica en cardiomiocitos	127
Figura 23	Estructura subcelular del corazón en animales wt y Fgf21 ^{-/-} alimentados con una dieta HF durante 16 semanas	128
Figura 24	Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en diversos tejidos	131
Figura 25	Niveles de expresión de Metrnl en distintas situaciones de estrés cardíaco	132
Figura 26	Niveles de expresión de Metrnl en células cardíacas	133
Figura 27	El factor de transcripción PPAR α regula la expresión de Metrnl en corazón	135
Figura 28	Contribución de diversos tejidos al aumento de los niveles circulantes de Metrnl tras la inducción experimental de hipertrofia cardíaca	136
Figura 29	Área de la sección transversal de los cardiomiocitos de animales wt y Metrnl ^{-/-} control y tratados con ISO durante 7 días	140
Figura 30	Niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia Nppa y Acta1 en ratones wt y Metrnl ^{-/-} control y tratados con ISO durante 7 días	141
Figura 31	Determinación de la fibrosis en secciones histológicas de corazón de ratones wt y Metrnl ^{-/-} en condiciones control o tratados 7 días con ISO	142
Figura 32	Secciones histológicas de diversos tejidos procedentes de ratones inyectados con AAV9-CMV-eGFP	144
Figura 33	La recuperación de la expresión cardíaca de Metrnl mediante el vector AAV9-Metrnl protege frente al desarrollo de la hipertrofia	145
Figura 34	Niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia Nppa y Acta1 en ratones Metrnl ^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null y AAV9-Metrnl	147
Figura 35	Determinación de la fibrosis en secciones histológicas de corazón procedentes de ratones Metrnl ^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null y AAV9-Metrnl	148
Figura 36	Niveles cardíacos de expresión del ARNm de Pkd4, Cpt1b, Acadm y Ppargc1a en ratones Metrnl ^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null y AAV9-Metrnl	150
Figura 37	Niveles cardíacos de expresión del ARNm de marcadores de inflamación en ratones Metrnl ^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null y AAV9-Metrnl	152
Figura 38	Niveles cardíacos de expresión del ARNm de Pkd4, Cpt1b, Acadm y Ppargc1a en ratones wt y Metrnl ^{-/-} en condiciones control o tratados 7 días con ISO	153
Figura 39	Niveles cardíacos de expresión del ARNm de marcadores de inflamación ratones wt y Metrnl ^{-/-} en condiciones control o tratados 7 días con ISO	153
Figura 40	Efectos de Metrnl sobre la hipertrofia en cardiomiocitos en cultivo	154

Figura 41	Efectos de la sobreexpresión de Metrnl sobre la hipertrofia en cardiomiocitos en cultivo	155
Figura 42	Efectos de Metrnl sobre la fibrosis cardíaca en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos en cultivo	156
Figura 43	Efectos autocrinos de Metrnl sobre los cardiomiocitos	157
Figura 44	Metrnl activa las vías de CREB y p38-MAPK en cardiomiocitos	158
Figura 45	Niveles de expresión del ARNm de PGC1 α en cardiomiocitos en cultivo tratados con Metrnl	159
Tabla 1	Comparación general entre las características de la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica	35
Tabla 2	Caracterización de los animales wt y Fgf21 $^{-/-}$ tras 16 semanas de dieta HF	115
Tabla 3	Estudio de supervivencia de Cox a partir de datos obtenidos de una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca	137
Tabla 4	Parámetros ecocardiográficos de ratones wt y Metrnl $^{-/-}$ después de 7 días de infusión con isoproterenol	139
Tabla 5	Parámetros ecocardiográficos de ratones Metrnl $^{-/-}$ inyectados con AAV9Null o AAV9Metrnl después de 7 días de infusión con isoproterenol	146

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ACADM	Acil-coA deshidrogenasa de cadena media
ACC	Acetil-coA carboxilasa
ACO	Aconitasa
ACOX	Acil-coA oxidasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
AngII	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético atrial
ARG1	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ATG	Genes relacionados con la autofagia
ATGL	Lipasa adipocitaria de triglicéridos
ATP	Adenosina trifosfato
BNIP3	Proteína de interacción con Bcl2 de 19 kDa3
BNP	Péptido natriurético cerebral
BSA	Albúmina de suero bovino
CAMK	Proteína cinasa dependiente de calmodulina
CD(x)	Clúster de diferenciación (x=diversos números)
CIDEA	Activador de muerte celular
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
COL3A1	Colágeno 3
CPT1b	Carnitina palmitoiltransferasa 1b
CREB	Elemento de unión en respuesta a AMP cíclico
CSA	Área de la sección transversal del eje corto de los cardiomiocitos
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDV	Volumen después de diástole
EF	Fracción de eyección
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERR	Receptores relacionados con estrógenos
ESV	Volumen después de sístole
FABP(x)	Proteína de unión a ácidos grasos (x=diversos números)
FAK	Cinasa de adhesiones focales
FAO	Oxidación de ácidos grasos
FASN	Sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero bovino fetal
FGF(x)	Factor de crecimiento fibroblástico (x=diversos números)
FGFR(x)	Receptor de factores de crecimiento fibroblástico (x=diversos números)
FIP200	Proteína de interacción con la familia FAK de 200kDa
FS	Fracción de acortamiento
FSTL1	Proteína relacionada con folistatina 1
GAPDH	Gliceraldehido-fosfato deshidrogenasa
GDF15	Factor de crecimiento y diferenciación 15
GFP	Proteína verde fluorescente
GLUT(x)	Transportador de glucosa (x=diversos números)
GPCR	Receptor asociado a proteínas G

GPX1	Glutación peroxidasa 1
GSK3β	Cinasa de la glicógeno sintasa 3 β
H&E	Tinción con hematoxilina/eosina
HDAC	Histona deacetilasa
HF	Dieta rica en grasas
HIF1A	Factor inducible por hipoxia 1 α
HR	Frecuencia cardíaca
HSL	Lipasa sensible a hormonas
HW/TL	Peso del corazón/longitud de la tibia
IGF1	Factor de crecimiento insulínico 1
IL(x)	Interleucina (x=diversos números)
INFγ	Interferón γ
IP3	Fosfatidilinositol
ISO	Isoproterenol
IVSd	Grosor del septo interventricular después de diástole
IVSs	Grosor del septo interventricular después de sístole
JAK	Cinasa Janus 2
KLB	β -klotho
LAMP2	Proteína asociada a la membrana lisosomal 2
LC3	Proteína asociada a la cadena ligera de microtúbulos 3
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido
LV	Ventrículo izquierdo
LVIDd	Diámetro interno del ventrículo izquierdo después de diástole
LVIDs	Diámetro interno del ventrículo izquierdo después de sístole
LVPWd	Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo después de diástole
LVPWs	Grosos de la pared posterior del ventrículo izquierdo después de sístole
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCP1	Proteína quimiotáctica de macrófagos 1
Metrn1	Meteorin-like
MMP9	Metaloproteasa 9
mTOR	Diana de rapamicina (en mamíferos)
mTORC(x)	Complejo de mTOR (x=1 o 2)
NCM	Cardiomiocitos neonatales (refiriéndose a cultivo primario)
NCS	Suero bovino neonatal
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas
NPR1	Receptor de péptidos natriuréticos 1
PBS	Tampón fosfato salino
PK4	Piruvato deshidrogenasa cinasa 4
PGC1α	Coactivador 1 α del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PINK1	Cinasa inducida por PTEN 1
PIP3	Fosfatidilinositol-3 fosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKB/AKT	Proteína cinasa B

PKG	Proteína cinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PLIN5	Perilipina 5
PPAR(x)	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (x= α , β o γ)
PRDX5	Peroxiredoxina 5
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
Rab7	Proteína relacionada con Ras 7
RARβ	Receptor de ácido retinoico β
RORα	Receptor huérfano relacionado con RAR α
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Septo interventricular
SERCA2a	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarcoplasmático
SI	Índice de esfericidad
SIRT1	Sirtuina 1
SNARE	Receptores de proteínas de unión a NSF soluble
SOD2	Superóxido dismutasa 2
STAT	Transductores de señal y activadores transcripcionales
STBD1	Proteína con dominio de unión a almidón 1
TAC	Constricción de la aorta transversa
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TFEB	Factor de transcripción EB
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TRPC	Canales receptores de potencial transitorio canónicos
TRβ	Receptor de hormonas tiroideas β
UCP(x)	Proteína desacopladora (x=diversos números)
ULK(x)	Cinasa activadora de la autofagia similar a Unc-51 (x=diversos números)
ULK(x)	Complejo de la cinasa similar a Unc-51 (x=1 o 2)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPS	Proteína de tráfico vacuolar
α/β-MHC	Cadena pesada de la miosina α o β
α-SKA	α actina del músculo esquelético

Introducción

La hipertrofia cardíaca

El corazón es el primer órgano en formarse y ser funcional en los mamíferos. Su función principal es la de bombear la sangre a través del sistema circulatorio, con el objetivo de hacer llegar oxígeno y nutrientes al resto de órganos y devolver el dióxido de carbono de vuelta a los pulmones.

Se trata, por tanto, de un órgano con una función compleja, que ha de ser capaz de mantener la perfusión hacia los órganos periféricos, adaptándose para cubrir las demandas del organismo en cuanto a oxígeno y nutrientes tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés o patología (Nakamura and Sadoshima, 2018).

La hipertrofia cardíaca constituye un mecanismo compensatorio del corazón en respuesta a determinadas condiciones, patológicas o fisiológicas, en las que se requiere un aumento de la carga de trabajo cardíaco. En respuesta a una serie de señales neurohumorales o biomecánicas, el corazón aumenta su tamaño con tal de reducir la tensión ejercida sobre la pared ventricular y mantener la capacidad de bombeo requerida por el organismo en estas circunstancias (Samak et al., 2016).

En el corazón adulto, este crecimiento está provocado por el aumento del tamaño de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos son células altamente diferenciadas, que salen del ciclo celular y pierden casi por completo la capacidad de proliferar poco después del nacimiento (Bergmann et al., 2009; Nakamura and Sadoshima, 2018). Aunque la proliferación de los fibroblastos cardíacos o un recambio mínimo de cardiomiocitos pueden contribuir ligeramente al aumento de la masa cardíaca, tanto el crecimiento normal del corazón durante su desarrollo como el aumento de masa en condiciones de hipertrofia se deben a un aumento del tamaño individual de los cardiomiocitos que lo forman (Maillet et al., 2015).

En proporción, los cardiomiocitos constituyen menos de un tercio del número total de células presentes en el miocardio (Planavila et al., 2017), aunque ocupan aproximadamente un 75% de la masa del corazón adulto (Pinto et al., 2016; Popescu et al., 2006). Estas células se organizan en unidades contráctiles básicas llamadas sarcómeros (Bernardo et al., 2010). Además del aumento del tamaño de los

cardiomiocitos, la hipertrofia cardíaca en respuesta a un estímulo patológico induce otras modificaciones estructurales y funcionales en el corazón, incluyendo por ejemplo un aumento de la síntesis proteica y una mayor organización de los sarcómeros, que puede acabar provocando disfunción contráctil.

Así pues, a pesar de que la hipertrofia cardíaca sea inicialmente una respuesta compensatoria frente a estímulos fisiológicos o patológicos, la hipertrofia provocada por estímulos patológicos suele asociarse con eventos cardiovasculares adversos, como las arritmias o la insuficiencia cardíaca (Nakamura and Sadoshima, 2018). Los mecanismos moleculares responsables de la hipertrofia cardíaca son diferentes dependiendo de si se trata de un proceso fisiológico o patológico (Nakamura and Sadoshima, 2018).

El crecimiento y la remodelación patológica del corazón en respuesta a un infarto de miocardio, al estrés hemodinámico causado por la hipertensión crónica o las cardiomiopatías de origen genético pueden desencadenar una situación de insuficiencia cardíaca en la cual el corazón no es capaz de hacer frente a las demandas energéticas del organismo (Heineke and Molkentin, 2006). En esta situación patológica, el corazón no es capaz de superar el estrés y acaba dilatándose y perdiendo capacidad contráctil (Maillet et al., 2015).

La remodelación cardíaca patológica va acompañada de otras alteraciones, como el desarrollo de fibrosis y la inducción de la respuesta inflamatoria, que empeoran todavía más la función contráctil del corazón al inhibir la conducción de la señal eléctrica (Bowers et al., 2010).

En la actualidad, la insuficiencia cardíaca es una de las principales causas de mortalidad en los países industrializados, con una supervivencia de aproximadamente el 50% durante los 5 años siguientes al diagnóstico (Linseman and Bristow, 2003; Taylor et al., 2017), suponiendo un alto coste tanto a nivel social como a nivel económico.

Tipos de hipertrofia cardíaca

Tal como se ha mencionado, se conocen dos tipos de hipertrofia cardíaca que difieren en el tipo de estímulos que los originan, en los mecanismos o vías de señalización que activan y en las consecuencias que tienen para el funcionamiento del corazón a corto y a largo plazo (Bernardo et al., 2010; Maillet et al., 2015; Shimizu and Minamino, 2016). El equilibrio entre los efectos beneficiosos o perjudiciales de esta adaptación acabará determinando si el corazón desarrolla una hipertrofia fisiológica o patológica. Las características generales de ambos tipos de hipertrofia se encuentran resumidas en la Tabla 1.

CARACTERÍSTICA	HIPERTROFIA PATOLÓGICA	HIPERTROFIA FISIOLÓGICA
ESTÍMULO	Enfermedad Sobrecarga de presión o de volumen Cardiomiopatía	Ejercicio aeróbico Crecimiento postnatal Gestación
MORFOLOGÍA CARDÍACA	Cardiomiocitos más grandes Formación de nuevos sarcómeros Aumento del tamaño del corazón	Cardiomiocitos más grandes Formación de nuevos sarcómeros Aumento del tamaño del corazón
FIBROSIS	Sí	No
APOPTOSIS	Sí	No
PROGRAMA GÉNICO FETAL	Sobreexpresión de genes fetales	Expresión relativamente invariable
FUNCIÓN CONTRÁCTIL	Menor expresión de SERCA2a, cambios en la relación β -MHC/ α - MHC	Normal o mejorada
FUNCIÓN CARDÍACA	Reducida	Normal o mejorada
METABOLISMO	Menor oxidación de ácidos grasos Mayor uso de glucosa/metabolismo anaeróbico	Mayor oxidación de ácidos grasos Mayor uso de glucosa
REVERSIBLE	No	Sí

Tabla 1. Comparación general entre las características de la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica. Adaptada de (Bernardo et al., 2010).

La hipertrofia cardíaca fisiológica se caracteriza por causar un aumento del tamaño cardíaco más moderado (entre un 10-20%). Los cardiomiocitos crecen añadiendo nuevos sarcómeros de manera longitudinal y transversal, de manera equilibrada, lo que permite preservar o incluso incrementar la capacidad contráctil del corazón.

Además, este tipo de hipertrofia no provoca la aparición de fibrosis intersticial y no induce la apoptosis de los cardiomiocitos. Se trata en general de un proceso reversible, inducido por situaciones fisiológicas que requieren una mayor demanda energética, como el ejercicio físico o la gestación (Heineke and Molkentin, 2006; Nakamura and Sadoshima, 2018). El equilibrio entre el crecimiento de los cardiomiocitos, la angiogénesis y la regulación de los niveles de inflamación es necesario para garantizar que la hipertrofia cardíaca sea un mecanismo adaptativo (Schirone et al., 2017).

La hipertrofia cardíaca patológica se caracteriza por el aumento excesivo del tamaño de los ventrículos, acompañado por una remodelación patológica que acaba provocando la disfunción del miocardio, como muestra la Figura 1 (Heineke and Molkentin, 2006; Samak et al., 2016).

La hipertrofia ventricular es un intento del corazón por mejorar su rendimiento de manera acorde a la situación de estrés que está sufriendo. Aunque inicialmente es una respuesta compensatoria, con un crecimiento ventricular concéntrico, en condiciones patológicas esta situación progresa hacia una dilatación de las cámaras ventriculares. Los cardiomiocitos aumentan de tamaño añadiendo sarcómeros longitudinalmente, de manera que las paredes del ventrículo se estrechan, provocando disfunción contráctil y finalmente insuficiencia cardíaca (Samak et al., 2016; Schiattarella and Hill, 2015).

Los estímulos que pueden inducir la hipertrofia cardíaca patológica suelen provocar una reducción en la capacidad contráctil del corazón e incrementar la presión sobre las paredes de los ventrículos. Entre estos estímulos se encuentran la hipertensión crónica, la isquemia con reperfusión, la sobrecarga de presión o volumen, la estenosis aórtica, la regurgitación de la válvula mitral o aórtica, los infartos de miocardio o las cardiomiopatías de origen genético (Cohn et al., 2000). Estas últimas suelen estar provocadas por mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales de los sarcómeros (Nakamura and Sadoshima, 2018). Los trastornos en la acumulación de lípidos también pueden inducir el desarrollo de hipertrofia cardíaca. La diabetes y la obesidad, como se discutirá más adelante, se consideran factores de riesgo para el desarrollo de la hipertrofia (Devereux et al., 2000).

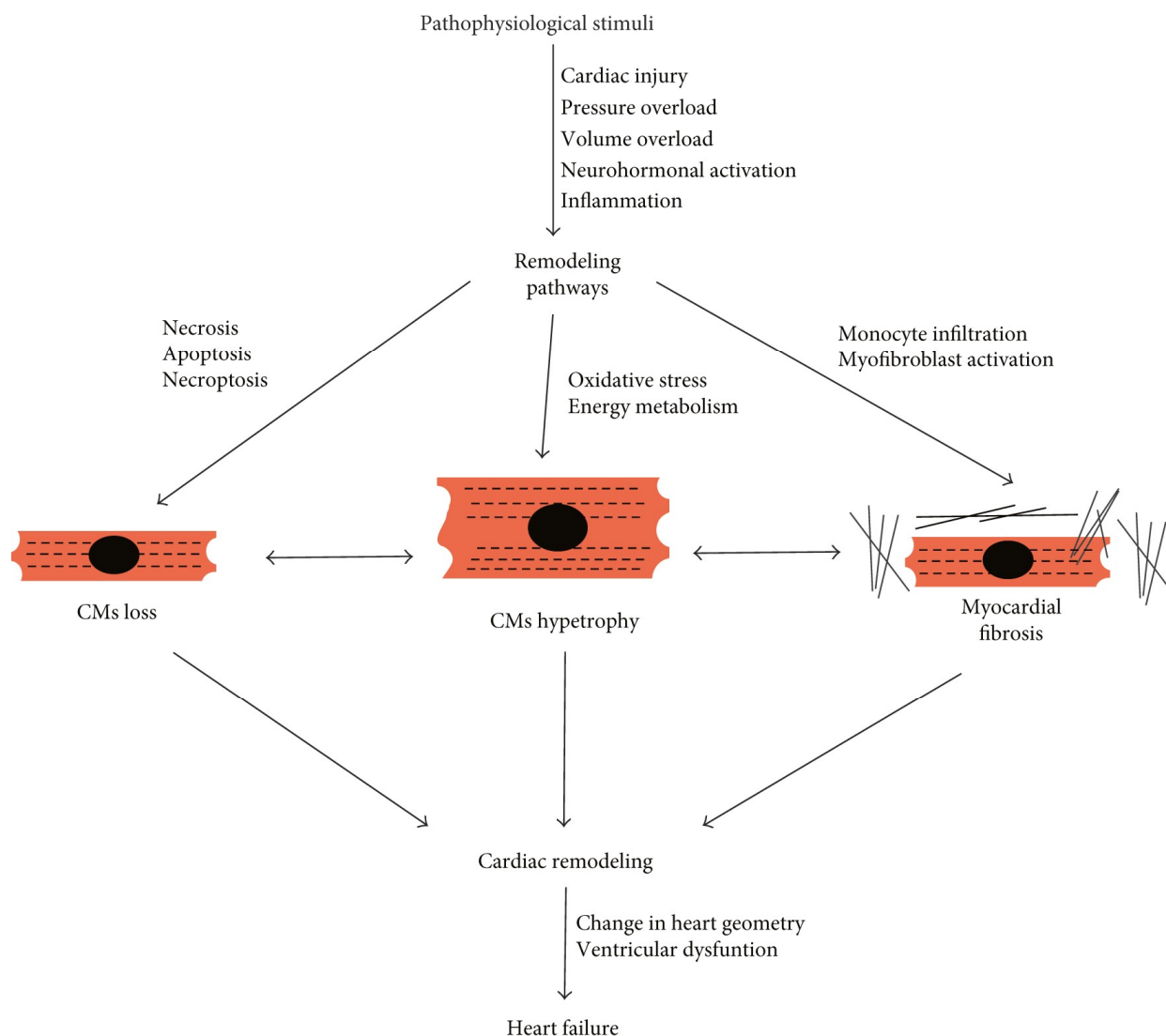


Figura 1. Esquema de las alteraciones que conducen al desarrollo de la hipertrofia patológica y a la remodelación cardíaca. El conjunto de estas modificaciones suele llevar a la insuficiencia cardíaca. Adaptado de (Schirone et al., 2017).

En el caso de la hipertrofia patológica, a parte del aumento de tamaño de los cardiomiocitos se producen una serie de modificaciones en el miocardio que facilitan la progresión hacia la insuficiencia cardíaca. En este caso, hablamos de un proceso de remodelación cardíaca patológica, que incluye todos los eventos moleculares, celulares e intersticiales que fomentan los cambios que se producen en el corazón y que contribuyen a empeorar su funcionamiento. La remodelación cardíaca involucra tanto a los cardiomiocitos como a los otros tipos celulares presentes en el miocardio (Burchfield et al., 2013; Cohn et al., 2000; Schirone et al., 2017). Algunos de los procesos implicados en esta remodelación son la inducción de la expresión del programa génico fetal, la inducción de la apoptosis en los cardiomiocitos (con la consecuente reducción

del número de estas células en el miocardio), la aparición de fibrosis intersticial, la disfunción mitocondrial, la desregulación del Ca^{2+} intracelular, las alteraciones metabólicas, las alteraciones estructurales de los sarcómeros y la inducción de la respuesta inflamatoria (Nakamura and Sadoshima, 2018).

Las alteraciones del metabolismo cardíaco que se dan en estas condiciones someten a los cardiomiocitos a un mayor estrés oxidativo, que desencadena una respuesta inflamatoria y pro-fibrótica. Este ambiente a su vez provoca la muerte y pérdida progresiva de cardiomiocitos en el miocardio (Whelan et al., 2010) y la activación y proliferación excesiva de los fibroblastos cardíacos (Schirone et al., 2017). Durante la hipertrofia y la remodelación patológica, la densidad de capilares en el corazón es insuficiente, lo que favorece la adaptación metabólica hacia un perfil menos oxidativo y la muerte celular progresiva. La expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) disminuye durante la insuficiencia cardíaca (Shiojima et al., 2005). La activación excesiva de la autofagia en estas condiciones induce también la apoptosis de los cardiomiocitos, como se discutirá más adelante.

Todas estas modificaciones conducen a un cambio en la geometría cardíaca global, que pasa de una forma elíptica a una estructura más esférica, aumentando la masa del ventrículo izquierdo y reduciendo la fracción de eyección (Cohn et al., 2000; Ohtani et al., 2012). Esto desemboca en la disfunción progresiva e irreversible del corazón.

Estímulos desencadenantes

Los dos principales tipos de estímulos desencadenantes de la hipertrofia cardíaca son el estrés mecánico y los factores hormonales endocrinos (Nakamura and Sadoshima, 2018; Ritter and Neyses, 2003). Ambos tipos de señales se encuentran al inicio de las vías de señalización intracelulares que conducen al desarrollo de la hipertrofia cardíaca y a las consecuentes alteraciones estructurales y funcionales que provoca en el corazón.

Como se ha mencionado anteriormente, los estímulos iniciales y las vías de señalización intracelular que se activan determinan en gran parte el carácter fisiológico o patológico de la hipertrofia cardíaca. En general estos estímulos suelen confluir en un número

limitado de vías de señalización. La Figura 2 muestra un esquema simplificado de las diferentes vías reguladas en respuesta a distintos factores hormonales o mecánicos que acaban provocando el desarrollo de la hipertrofia cardíaca.

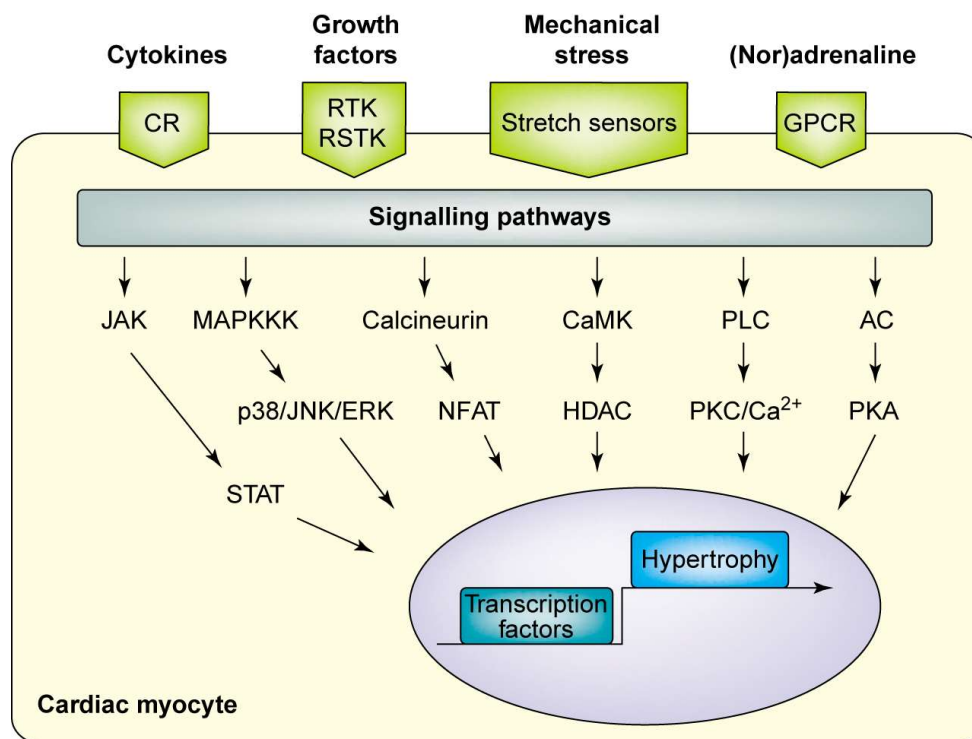


Figura 2. Principales vías de señalización involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Las señales neurohumorales o mecánicas recibidas en la membrana de los cardiomiocitos activan una serie de vías que inducen la transcripción de genes relacionados con el crecimiento y la hipertrofia. Adaptado de (Ritter and Neyses, 2003).

Receptores de estrés biomecánico

Los cardiomiocitos sometidos a condiciones de estrés mecánico o de deformación son capaces de detectar estos cambios mediante un aparato sensorial interno. Los receptores de estrés biomecánico de los cardiomiocitos transmiten estas señales y activan vías de señalización intracelulares en respuesta a los cambios que se producen en la composición de la matriz extracelular, en la rigidez de la misma, o a las alteraciones en la presión o el volumen sanguíneo.

El estrés sobre las paredes del corazón activa una serie de canales iónicos, responsables de la rápida respuesta del corazón frente al estrés agudo. La familia de los canales

receptores de potencial transitorio canónicos (TRPC) está formada por 7 isoformas de canales de cationes no selectivos, expresados en el corazón. Estos canales son sensibles al estrés mecánico y controlan vías de señalización que llevan a la activación de la calcineurina y de NFAT (factor nuclear de células-T activadas), inductores conocidos de hipertrofia cardíaca patológica (Bush et al., 2006; Eder and Molkentin, 2011; Nakamura and Sadoshima, 2018).

Las integrinas son receptores heterodiméricos formados por una subunidad α y una subunidad β , que se encuentran en contacto con la matriz extracelular y son capaces de percibir cambios en la misma (Schirone et al., 2017). Estos mecanosensores detectan estímulos físicos provenientes del exterior de la célula y los transforman en señales bioquímicas, que son transmitidas al interior de la célula mediante la activación de cinasas de adhesiones focales (FAK), GTPasas como Ras o Rho y de la vía de la proteína cinasa B (PKB o Akt) (Heineke and Molkentin, 2006; Ross and Borg, 2001). Mientras que la activación de la proteína Akt a corto plazo induce hipertrofia no patológica, sin perjudicar al funcionamiento del corazón, su activación a largo plazo desemboca en insuficiencia cardíaca (Matsui et al., 2002; Shiojima et al., 2005).

Las proteínas asociadas al disco Z de los sarcómeros también son capaces de detectar el estrés mecánico (Heineke and Molkentin, 2006; Samak et al., 2016).

A parte de la transmisión directa de las señales, el estrés mecánico promueve la secreción de factores humorales, como la angiotensina II y la endotelina-1, que inducen la hipertrofia cardíaca mediante la activación de receptores asociados a proteínas G (GPCR) (Heineke and Molkentin, 2006; Sadoshima and Izumo, 1993; Schirone et al., 2017).

Además, el estrés mecánico puede inducir la activación de vías intracelulares pro-hipertróficas independientemente de las vías mediadas por proteínas estructurales. El estrés mecánico es capaz de activar el receptor de la angiotensina II de tipo 1, que activa la cinasa Janus 2 (JAK2) e induce la activación de proteínas G, promoviendo la activación de la vía de la cinasa regulada por señales extracelulares ERK (Zou et al., 2004).

Moléculas señalizadoras

Los mecanismos neurohumorales que inducen la hipertrofia cardíaca están relacionados con la secreción de hormonas, citocinas y factores de crecimiento que activan receptores situados en la membrana de los cardiomiocitos. Estos ligandos son detectados por una serie de receptores que incluyen receptores asociados a proteínas G (GPCR), receptores con dominios tirosina-cinasa y receptores de citocinas relacionados con gp130 (Heineke and Molkentin, 2006).

Según la señal pro-hipertrófica inicial, se activan distintas vías de señalización intracelular relacionadas con una respuesta hipertrófica fisiológica o patológica. Por ejemplo, los estímulos humorales se pueden clasificar en factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico IGF-1 y el factor de crecimiento transformante TGF β , que activan los receptores tirosina-cinasa relacionados con la inducción de la hipertrofia fisiológica como mecanismo adaptativo, y en moléculas que activan los receptores GPCR, como las catecolaminas, la angiotensina II o la endotelina-1, relacionadas directamente con la inducción de la hipertrofia cardíaca patológica (Nakamura and Sadoshima, 2018).

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) es responsable de muchas de las modificaciones que ocurren durante la remodelación cardíaca e induce la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis, la proliferación de los fibroblastos y la inflamación (Schirone et al., 2017; Sciarretta et al., 2009).

Al unirse a sus receptores GPCR, la angiotensina II y la endotelina-1 inducen la activación de proteínas G como la G $_{\alpha q}$, que activa la PLC e induce la hipertrofia a través de la activación de la vía de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K/Akt) (Sadoshima and Izumo, 1993). El fosfatidilinositol-3 (IP3) producido por la activación de la PLC por parte de la subunidad α de esta proteína G promueve la movilización del Ca $^{2+}$ intracelular desde el retículo hacia el citoplasma, donde activa la calmodulina y la calcineurina (Nakamura and Sadoshima, 2018). Esta cascada de señalización acaba activando la proteína cinasa dependiente de calmodulina CAMKII δ , que promueve la progresión hacia la hipertrofia patológica y la insuficiencia cardíaca (Backs et al., 2009; Ling et al., 2012).

Las catecolaminas son hormonas neuroendocrinas que se unen a los receptores α y β -adrenérgicos, a través de los cuales activan la adenilato ciclasa (AC) y aumentan los niveles citoplasmáticos de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). La consecuente activación de la proteína cinasa A (PKA) provoca la fosforilación de proteínas contráctiles y de proteínas reguladoras de los niveles de Ca^{2+} intracelular, induciendo también un aumento de los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} y el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Nakamura and Sadoshima, 2018). Las alteraciones en los niveles de Ca^{2+} responsables de la remodelación cardíaca afectan también a la capacidad contráctil del corazón, fomentando la progresión hacia la insuficiencia cardíaca (Lehnart et al., 2009).

La estimulación crónica de los receptores α y β -adrenérgicos induce el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica (Nakamura and Sadoshima, 2018). Durante la realización de esta tesis doctoral, se han utilizado varios modelos de inducción de hipertrofia mediante la estimulación de los receptores α -adrenérgicos (fenilefrina) y β -adrenérgicos (isoproterenol).

Efectos de la hipertrofia cardíaca

Aumento del tamaño cardíaco

La inducción de la hipertrofia cardíaca a nivel celular se caracteriza por un aumento individual del tamaño de los cardiomiocitos, acompañado por el correspondiente aumento en la síntesis de proteínas y por la adición de nuevos sarcómeros (Frey et al., 2004; Nakamura and Sadoshima, 2018; Samak et al., 2016).

La hipertrofia de los cardiomiocitos sirve para reducir el estrés de las paredes ventriculares, aumentando el grosor de las mismas (Maillet et al., 2015). Según la geometría que adoptan los cardiomiocitos individuales, el crecimiento hipertrófico se puede clasificar en dos tipos: concéntrico o excéntrico (Frey et al., 2004).

La hipertrofia cardíaca concéntrica se debe a una sobrecarga de presión o a enfermedades valvulares, y se caracteriza por la adición de sarcómeros en paralelo, aumentando así el grosor de los cardiomiocitos individuales y el grosor de las paredes ventriculares (generalmente del ventrículo izquierdo) y del septo interventricular. Este engrosamiento lleva a una reducción de la capacidad del ventrículo izquierdo (Samak et al., 2016).

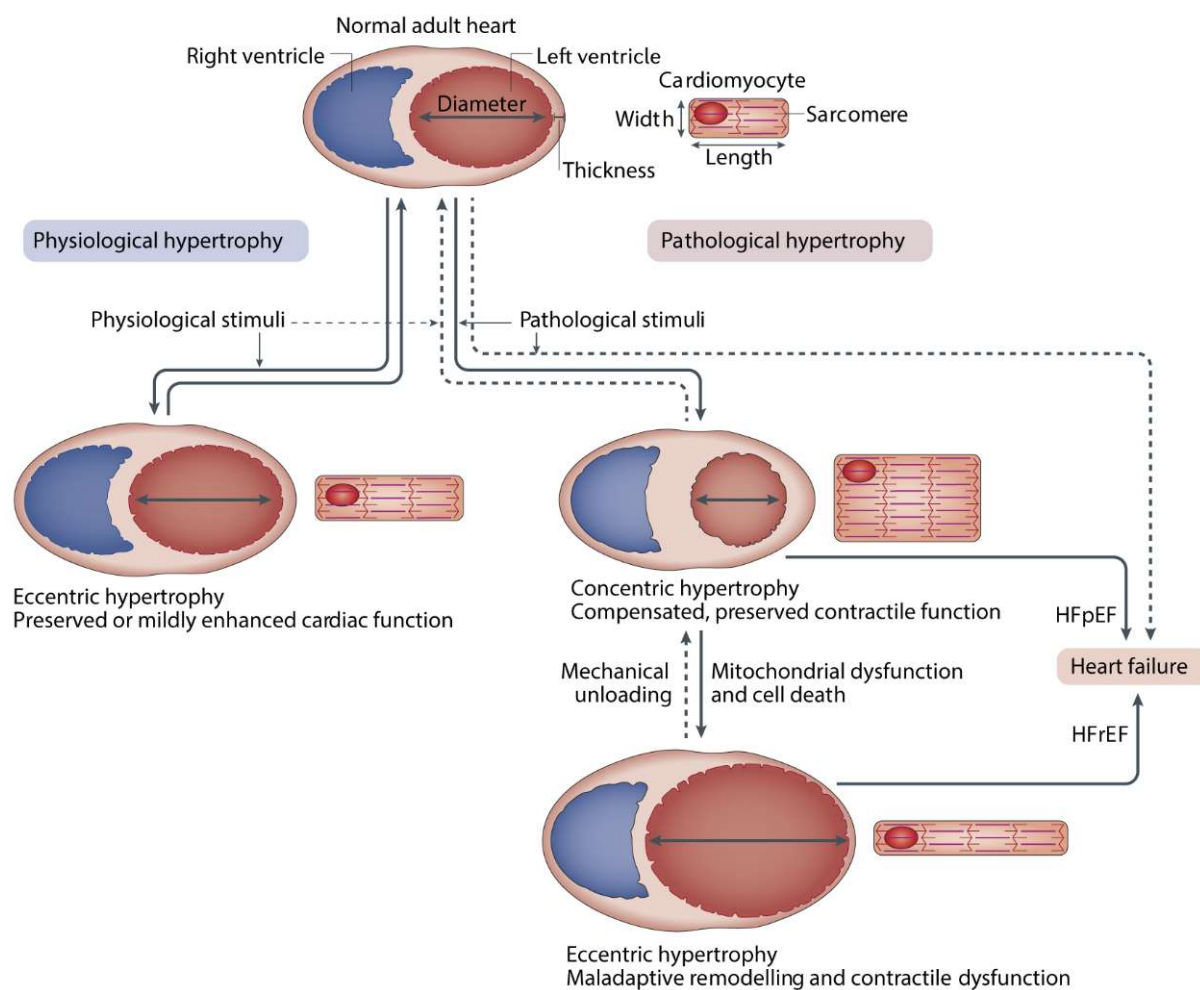


Figura 3. Representación esquemática del tipo de hipertrofia según la geometría que adquieren los cardiomiocitos. En condiciones fisiológicas, el crecimiento equilibrado de los cardiomiocitos da lugar a una hipertrofia excéntrica en la que la función cardíaca se conserva o incluso mejora. En condiciones patológicas, los cardiomiocitos aumentan de tamaño mediante la incorporación de sarcómeros en paralelo, provocando el engrosamiento de las paredes del ventrículo y la reducción del tamaño de la cavidad. Tras la remodelación cardíaca patológica, esta situación puede derivar en una hipertrofia excéntrica patológica con dilatación del ventrículo, disfunción contráctil y finalmente insuficiencia cardíaca. Adaptado de (Nakamura and Sadoshima, 2018).

Con el tiempo, la remodelación cardíaca que se da en estas condiciones acaba provocando la adición de nuevos sarcómeros de manera longitudinal. Esto, combinado con la fibrosis y la apoptosis de cardiomiocitos, lleva a la dilatación del ventrículo izquierdo, generando una remodelación excéntrica patológica del corazón y provocando la pérdida de capacidad contráctil (Harvey and Leinwand, 2011; Nakamura and Sadoshima, 2018). Estos cambios en la geometría cardíaca se encuentran esquematizados en la Figura 3.

En el caso de la hipertrofia cardíaca fisiológica, que se da en situaciones como el ejercicio físico o la gestación, el aumento de tamaño de los cardiomiocitos es equilibrado, añadiendo nuevos sarcómeros tanto en serie como de manera longitudinal. En este caso se trata de una hipertrofia excéntrica no patológica, con un crecimiento equilibrado de la pared del ventrículo y el septo, que aumenta la fuerza contráctil del corazón (Maillet et al., 2015; Nakamura and Sadoshima, 2018).

Expresión de genes fetales

El desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica induce una serie de modificaciones en el patrón de expresión génica de los cardiomiocitos. La re-expresión del llamado programa génico fetal en los cardiomiocitos adultos se considera uno de los principales marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, mientras que en condiciones de hipertrofia fisiológica raramente se encuentra inducido (Nakamura and Sadoshima, 2018; Samak et al., 2016).

En condiciones de hipertrofia, se induce la expresión de moléculas señalizadoras como los péptidos natriuréticos atrial y cerebral (ANP y BNP) y de proteínas estructurales, como la actina α del músculo esquelético (α -SKA, Acta1) y la isoforma β de la cadena pesada de la miosina (β -MHC) en lugar de la α -MHC, que es la isoforma predominante en el corazón adulto (Harvey and Leinwand, 2011; Samak et al., 2016). Además, los cambios metabólicos que se producen en respuesta a la hipertrofia cardíaca van asociados con una serie de alteraciones en los niveles de expresión de genes de diversas vías metabólicas (Taegtmeier et al., 2010), de las que se hablará más adelante. La expresión de algunos genes encargados de la regulación de los depósitos de Ca^{2+}

intracelular también se encuentra alterada en condiciones patológicas (Nakamura and Sadoshima, 2018).

La isoforma fetal de la cadena pesada de la miosina, β -MHC, requiere menos adenosina trifosfato (ATP) para realizar su función, por lo que en condiciones de hipertrofia patológica en las que la oxidación de ácidos grasos se encuentra reducida y el corazón se vuelve metabólicamente menos eficiente, esta isoforma pasa a ser la predominante (Harvey and Leinwand, 2011; Schirone et al., 2017). Sin embargo, la capacidad contráctil de la β -MHC es menor que la de la α -MHC, de manera que los niveles de β -MHC correlacionan inversamente con la capacidad de contracción del corazón, la fracción de acortamiento y la fuerza generada con cada contracción (Herron and McDonald, 2002). La activación del factor pro-hipertrofico NFAT induce esta alteración en las proporciones de α -MHC y β -MHC (Schirone et al., 2017).

La expresión del péptido natriurético atrial (ANP) y del péptido natriurético cerebral (BNP), de los que se hablará en detalle más adelante, se induce en respuesta a estímulos patológicos. Ambas hormonas tienen efectos cardioprotectores y anti-hipertrofos, a través de la activación de la guanilato ciclasa (Nakamura and Sadoshima, 2018; Takimoto et al., 2005). La activación de la proteína cinasa G (PKG) por esta vía tiene efectos anti-hipertrofos mediante la inhibición de la vía de la calcineurina y NFAT y de los canales TRPC (Rainer and Kass, 2016). La delección del receptor de péptidos natriuréticos 1 (NPR1), que es el receptor de ANP, induce una hipertrofia moderada que se transforma en remodelación cardíaca patológica en respuesta al estrés por exceso de presión (Holtwick et al., 2002).

En algunos casos, en condiciones de hipertrofia fisiológica se puede producir un aumento moderado de la expresión de genes fetales, aunque la inducción del programa génico fetal en el corazón se considera en general un marcador de patología (Heineke and Molkentin, 2006; McMullen and Jennings, 2007). En el caso de las cadenas pesadas de la α y β miosina (α -MHC y β -MHC), aunque la β -MHC sea la forma fetal y esté ampliamente aceptado que en procesos de hipertrofia patológica su expresión en roedores está incrementada, algunos estudios demuestran que su inducción depende del tipo de estímulo (Gupta, 2007). La expresión de los péptidos natriuréticos también puede aumentar en respuesta al daño cardíaco agudo para tratar de mitigarlo, dadas sus

capacidades anti-hipertróficas. Aunque los niveles de expresión de genes fetales pueden usarse como marcador de hipertrofia patológica y de remodelación cardíaca, existen otros factores a tener en cuenta.

Aumento de la síntesis proteica

El aumento del tamaño de los cardiomiocitos va acompañado de un aumento de la síntesis proteica, a menudo combinado con una reducción de la degradación de las proteínas ya existentes (Nakamura and Sadoshima, 2018).

La proteína mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) juega un papel importante en la regulación de la respuesta a factores de crecimiento, disponibilidad de nutrientes y metabolismo y crecimiento celular (Saxton and Sabatini, 2017). Su función en el aumento de la síntesis proteica va ligada a la actividad de mTORC1 (complejo de mTOR 1), uno de los complejos de los que forma parte. La actividad de mTORC1 aumenta durante el desarrollo de la hipertrofia fisiológica y patológica, y promueve el aumento de la síntesis proteica en los ribosomas (Sciarretta et al., 2018).

Sin embargo, aunque inicialmente la activación de mTORC1 es adaptativa en respuesta a una sobrecarga de presión u otros estímulos hipertróficos, a largo plazo esta activación limita los mecanismos de control de calidad de las proteínas celulares, mediante la inhibición de la autofagia (Kim et al., 2011; Nakamura and Yoshimori, 2017).

Alteraciones metabólicas

El mantenimiento de la capacidad contráctil y de la función cardíaca en condiciones de hipertrofia depende en gran parte de la adaptación metabólica del corazón para ser capaz de cubrir las crecientes demandas energéticas. La adaptación metabólica del corazón es diferente en una situación de hipertrofia fisiológica o patológica (Strøm et al., 2005). Una mala adaptación metabólica durante la respuesta hipertrófica desencadena la remodelación patológica del corazón y promueve la muerte de los cardiomiocitos (Doenst et al., 2013).

En el caso de la hipertrofia fisiológica, se produce un aumento de la expresión de genes que codifican para transportadores de ácidos grasos, enzimas de vías del metabolismo de lípidos y de la cadena respiratoria, que va acompañado de un aumento de los niveles de oxidación de ácidos grasos y de glucosa (Burrelle et al., 2004; Riehle et al., 2014).

La glucólisis es la principal fuente de energía durante el desarrollo embrionario. Cuando los cardiomiocitos dejan de proliferar, poco después del nacimiento, se produce un cambio metabólico y los ácidos grasos pasan a ser el sustrato principal, con el consecuente aumento de la capacidad oxidativa y de la actividad mitocondrial (Nakamura and Sadoshima, 2018).

De la misma manera que durante la remodelación cardíaca patológica se vuelven a expresar genes fetales, se produce también una reprogramación metabólica. Los cardiomiocitos reducen la producción de ATP a partir de ácidos grasos y aumentan la producción a partir de glucosa mediante la vía de la glucólisis (Neubauer, 2007). En consecuencia, se reduce la expresión de genes relacionados con procesos metabólicos mitocondriales (Aubert et al., 2013). La expresión de las enzimas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos disminuye desde el principio de la hipertrofia cardíaca patológica, y continúa en declive durante todo el proceso de remodelación y de insuficiencia cardíaca (Aubert et al., 2013; Doenst et al., 2013).

La oxidación de la glucosa, tras un pequeño aumento inicial, se mantiene constante durante la hipertrofia, pero finalmente se reduce tras la remodelación patológica (Doenst et al., 2010). Los niveles de expresión del transportador de glucosa GLUT1, que funciona de manera independiente de la insulina, aumentan durante la hipertrofia patológica. En cambio, los niveles de GLUT4, regulado por la insulina, disminuyen. Estos cambios van acompañados por un aumento de la captación de glucosa por parte del corazón y unos mayores niveles de glucólisis, pero no de oxidación de glucosa (Shao and Tian, 2016). Sin embargo, estas alteraciones no son tan consistentes como las observadas en el metabolismo lipídico (Doenst et al., 2013). La Figura 4 ilustra los cambios que tienen lugar durante el desarrollo de la hipertrofia y la posterior insuficiencia cardíaca.

En el corazón, la actividad de los PPAR está regulada por la familia del co-activador PGC1 α (coactivador del receptor activado por el proliferador peroxisómico γ) (Rowe et al., 2010). La expresión PGC1 α aumenta en condiciones de alta demanda energética e hipertrofia fisiológica, como el ejercicio físico (Barger et al., 2000) y disminuye en condiciones patológicas como la isquemia (Duncan and Finck, 2008), la hipertrofia (Arany et al., 2005; Chen et al., 2012) y la insuficiencia cardíaca (Sano et al., 2004).

El co-activador PGC1 α promueve la expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial, la cadena respiratoria, la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo oxidativo de la glucosa (Puigserver and Spiegelman, 2003). Por ejemplo, la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) está regulada directamente por PGC1 α y PPAR α , promoviendo el uso de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos (Hsieh et al., 2008).

La familia de receptores relacionados con estrógenos (ERR) también es diana de PGC1 α . Concretamente, ERR α regula la expresión de enzimas relacionadas con la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos y del propio PPAR α (Ventura-Clapier et al., 2008). Cuando se activan vías pro-inflamatorias, la interacción de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) con PGC1 α provoca la reducción de los niveles de expresión de PDK4 (Álvarez-Guardia et al., 2010).

Los ratones deficientes en PGC1 α desarrollan insuficiencia cardíaca más rápidamente tras la inducción de la hipertrofia cardíaca mediante la constricción de la aorta transversa (Arany et al., 2006). En condiciones basales, el corazón de estos animales tiene menos fuerza y consume más glucosa (Lehman et al., 2008).

La proteína cinasa activada por AMP (AMPK) es uno de los principales sensores del estado energético de las células. Su activación aumenta la biogénesis mitocondrial con el objetivo de aumentar la producción de ATP, e inhibe mTOR, inhibiendo vías de síntesis que requieran un aporte de energía y activando la autofagia (Hardie et al., 2012; Mihaylova and Shaw, 2011). La inhibición de AMPK en el corazón induce hipertrofia cardíaca patológica e insuficiencia cardíaca, mientras que su activación tiene una función protectora en este contexto (Nakamura and Sadoshima, 2018).

En el caso concreto de la hipertrofia cardíaca inducida por la obesidad, el perfil metabólico del corazón es diferente al de otras situaciones de hipertrofia. En estas condiciones, la flexibilidad metabólica se encuentra bloqueada y el corazón se vuelve totalmente dependiente del uso de ácidos grasos como sustrato para la obtención de ATP- Esto dificulta su respuesta en situaciones patológicas, al reducir su capacidad para utilizar la glucosa (Fukushima and Lopaschuk, 2016a; Mazumder et al., 2004). El aumento de la captación de ácidos grasos, debido a los elevados niveles en sangre en la obesidad, va ligado a otras alteraciones como la aparición de resistencia a la insulina y la reducción de la eficiencia cardíaca, junto con la acumulación de metabolitos derivados de lípidos potencialmente tóxicos para los cardiomiocitos.

Por tanto, en lugar de una reducción de la oxidación de ácidos grasos, en la cardiomiopatía asociada con la obesidad y la diabetes se produce un aumento y una dependencia de este tipo de metabolismo, que provoca la acumulación de diacilgliceroles, triacilgliceroles y ceramidas, ya que los altos niveles de oxidación de ácidos grasos exceden a la capacidad de las mitocondrias para metabolizar estos productos intermedios resultantes (Koves et al., 2005).

La lipotoxicidad resultante de esta acumulación provoca la inducción de la apoptosis en los cardiomiocitos, lo cual facilita el desarrollo de la fibrosis y la disfunción cardíaca (Zhou et al., 2000). En los modelos de ratones genéticamente obesos (ob/ob) y diabéticos (db/db), el aumento de la tasa de oxidación de ácidos grasos y las alteraciones en el metabolismo preceden a la reducción de la eficiencia del corazón y a la disfunción contráctil (Buchanan et al., 2005; Mazumder et al., 2004).

Inflamación

Los cardiomiocitos, los fibroblastos cardíacos, las células endoteliales y las células inmunes residentes en el corazón o circulantes producen y secretan una serie de citocinas asociadas con la hipertrofia y el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (Frierler and Mortensen, 2015). Los cardiomiocitos pueden activar un perfil de secreción pro-fibrótico y pro-inflamatorio, del que también son diana ellos mismos. De esta manera,

se establece una red autocrina de señales que favorecen la remodelación cardíaca patológica e inducen la muerte celular (Barouch et al., 2006).

La activación de las vías inflamatorias, como por ejemplo la vía de NF- κ B, es un marcador importante de hipertrofia ventricular. La infiltración de células inmunes, incluyendo macrófagos y linfocitos T, y la alta expresión de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), son también características de la hipertrofia cardíaca patológica (Samak et al., 2016). El tratamiento del proceso inflamatorio es una posible diana para preservar la función cardíaca en condiciones de hipertrofia (Heymans et al., 2009; Velten et al., 2012).

En el corazón se pueden encontrar dos fenotipos distintos de macrófagos: los macrófagos de tipo M1, activados por la vía clásica y con un marcado perfil pro-inflamatorio, y los macrófagos de tipo M2, activados alternativamente y con un perfil anti-inflamatorio (Mosser and Edwards, 2008; Takeda and Manabe, 2011). La depleción de los macrófagos agrava la disfunción cardíaca provocada por la hipertrofia (Takeda and Manabe, 2011).

Los macrófagos de tipo M1 favorecen la progresión de la remodelación cardíaca patológica, liberando citocinas que fomentan un ambiente pro-inflamatorio (Fernández-Velasco et al., 2014; Takeda and Manabe, 2011). La inflamación promueve el reclutamiento e infiltración en el tejido cardíaco de más células inmunes con un perfil similar, que coordinan la respuesta inflamatoria en el miocardio y provocan disfunción endotelial, hipertrofia, fibrosis y muerte celular (Planavila et al., 2017).

En cambio, los macrófagos de tipo M2 tienen una función anti-inflamatoria y estimulan la angiogénesis y otras vías cardioprotectoras (Van Den Akker et al., 2013).

Los niveles circulantes de las citocinas pro-inflamatorias IL6, IL1 y TNF α son más altos en los pacientes con insuficiencia cardíaca (Testa et al., 1996). En roedores, la activación constitutiva de la glicoproteína 130 (gp130), que es parte esencial del receptor de IL6, o directamente la infusión con IL6, inducen hipertrofia cardíaca patológica (Hirota et al., 1995; Meléndez et al., 2010). La delección de IL6 inhibe el desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por la constricción de la aorta transversa (Zhao et al., 2016).

Los cardiomiocitos producen y secretan TNF α en condiciones de estrés. La sobreexpresión específica de TNF α en el corazón provoca hipertrofia e induce la remodelación cardíaca patológica, con infiltración de células inmunes pro-inflamatorias (Kubota et al., 1997). En cambio, la delección de TNF α reduce la hipertrofia inducida por una sobrecarga de presión y la disfunción cardíaca asociada (Sun et al., 2007).

Una de las principales citocinas con funciones anti-inflamatorias es la IL10. Esta citocina inhibe la infiltración de macrófagos en el corazón. Los ratones deficientes en IL10 presentan una hipertrofia exacerbada en respuesta al tratamiento con agonistas β -adrenérgicos y a la constricción de la aorta transversa. En cambio, el tratamiento con IL10 evita la remodelación patológica en respuesta a la constricción de la aorta transversa inhibiendo la vía inflamatoria NF- κ B (Verma et al., 2012).

La contribución de las células endoteliales es clave a la hora de determinar el viraje hacia un ambiente pro-inflamatorio o anti-inflamatorio en el corazón (Schirone et al., 2017). Las células endoteliales secretan IL33 en respuesta a un exceso de presión (Chen et al., 2015) y regulan el crecimiento de los cardiomiocitos de forma paracrina (Tirziu et al., 2010). La infusión con IL33 reduce la hipertrofia inducida por el exceso de presión y el desarrollo de fibrosis mediante la inhibición de la vía NF- κ B (Sanada et al., 2007).

La inflamación crónica en el corazón tiene efectos también sobre el metabolismo, reduciendo el metabolismo mitocondrial, la oxidación de ácidos grasos y los niveles de ATP (Fрати et al., 2017).

Estrés oxidativo

La disfunción mitocondrial que se produce durante la remodelación patológica del corazón tiene efectos adversos sobre la viabilidad celular. Además, provoca la reducción de la síntesis de ATP, la liberación de proteínas pro-apoptóticas y la formación de especies reactivas de oxígeno o ROS (Maulik and Kumar, 2012). La formación de ROS debida al mal funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, en combinación con la reducción de las enzimas antioxidantes en la célula, provocan un aumento del estrés oxidativo en los cardiomiocitos.

Los niveles bajos de ROS mitocondriales actúan como mensajeros intracelulares durante la remodelación cardíaca. Sin embargo, el aumento de los niveles de ROS causa daños en el ADN y las proteínas mitocondriales, y dificulta la transcripción de genes que afectan a la producción energética, contribuyendo así a las alteraciones metabólicas mencionadas anteriormente (Burgoyne et al., 2012).

Las ROS activan un gran número de vías de señalización relacionadas con el crecimiento hipertrófico y la remodelación cardíaca (Kwon et al., 2003; Tanaka et al., 2001). En los cardiomiocitos en cultivo, la hipertrofia cardíaca inducida por angiotensina II, endotelina-1, TNF α o estrés biomecánico va asociada con la producción de ROS (Maulik and Kumar, 2012).

Los efectos de las ROS sobre la remodelación fibrótica del corazón están mediados por sus interacciones con la matriz extracelular y por la modificación postraduccional directa de las metaloproteasas de la matriz (Siwik and Colucci, 2004). Además, las ROS contribuyen a la disfunción contráctil interactuando con canales y transportadores de Ca²⁺ de los cardiomiocitos (Zima and Blatter, 2006) e induciendo la apoptosis (Kwon et al., 2003).

Los antioxidantes son efectivos a la hora de proteger frente al desarrollo de varios tipos de hipertrofia cardíaca. Por ejemplo, en los cardiomiocitos en cultivo, el tratamiento con antioxidantes es capaz de bloquear la hipertrofia inducida por el tratamiento con TNF α , indicando que las ROS juegan un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca debido a la activación de vías pro-inflamatorias como la vía de NF- κ B (Higuchi et al., 2002).

La sobreexpresión de enzimas antioxidantes en ratón tiene efectos beneficiosos sobre el corazón. En un modelo de ratón en el cual se sobreexpresa la catalasa mitocondrial, tanto la fibrosis como la hipertrofia provocadas por el tratamiento con angiotensina II se reducen significativamente, sugiriendo que ambas están mediadas por el aumento de la producción de ROS (Dai et al., 2011). La sobreexpresión de la glutatión peroxidasa o de la peroxiredoxina-3 previene la remodelación cardíaca patológica tras un infarto de miocardio (Matsushima et al., 2006; Shiomi et al., 2004).

Fibrosis

La hipertrofia cardíaca patológica suele ir acompañada por el desarrollo de fibrosis intersticial y perivascular, como resultado de la combinación de la pérdida de cardiomiocitos, la activación de los fibroblastos cardíacos y los efectos de un entorno pro-inflamatorio (Schirone et al., 2017). Los fibroblastos cardíacos constituyen aproximadamente un 15% del total de células en el corazón de los ratones adultos, sin tener en cuenta los cardiomiocitos (Pinto et al., 2016), e interactúan con las células inmunes, las células endoteliales o los cardiomiocitos (Leask, 2015).

Tras sufrir daño cardíaco, la inflamación crónica y la secreción de citocinas inducen diversos cambios que llevan al desarrollo de fibrosis en el miocardio. La IL11 se induce en los fibroblastos en respuesta a la señalización por TGF β 1 y juega un papel crítico en sus efectos. Su sobreexpresión específica en estas células es suficiente para provocar fibrosis y disfunción cardíaca (Schafer et al., 2017).

La acumulación excesiva de las fibras de colágeno de tipo I y de tipo III en la matriz extracelular provoca que el sistema de señalización por estrés mecánico se vea alterado. Además, aumenta la rigidez de los ventrículos, afectando a la función diastólica y a la elasticidad del corazón (Maria et al., 2014), y alterando su conductividad eléctrica, lo que puede provocar arritmias y empeorar su capacidad contráctil (Prabhu and Frangogiannis, 2016). En esta situación se produce también un aumento de la síntesis y de la activación de las metaloproteasas extracelulares (Frangogiannis, 2012).

La familia de los factores de crecimiento fibroblástico FGF, TGF β 1 o IGF-1 son reguladores de la fibrosis cardíaca (Arany et al., 2006; Nakamura and Sadoshima, 2018). La expresión de TGF β 1 aumenta en respuesta a estímulos patológicos, provocando hipertrofia cardíaca y fibrosis. Su señalización a través de la vía SMAD2/SMAD3 contribuye al desarrollo de la fibrosis cardíaca en respuesta a una sobrecarga de presión (Divakaran et al., 2009).

Este ambiente pro-fibrótico induce la activación y la diferenciación de los fibroblastos cardíacos hacia miofibroblastos, que tienen un fenotipo similar al de las células de la musculatura lisa (Wang et al., 2019). Los fibroblastos cardíacos se activan fácilmente en respuesta al daño, en la que inicialmente se trata de una respuesta protectora. Sin

embargo, su diferenciación hacia miofibroblastos corresponde con un perfil patológico, caracterizado por la proliferación y migración excesivas, la expresión de la α -actina del músculo liso (α -SMA) y la secreción de más señales pro-inflamatorias. Además, los miofibroblastos producen proteínas que contribuyen a la remodelación de la matriz extracelular (Travers et al., 2017).

Marcadores de hipertrofia cardíaca

Para determinar el grado de hipertrofia del corazón pueden utilizarse diversos parámetros o sistemas.

El método más directo es determinar el peso de este órgano después de su disección, y luego normalizarlo usando otro parámetro independiente. Aunque clásicamente el más utilizado es el peso corporal, su valor puede fluctuar mucho durante el envejecimiento o dependiendo de las condiciones experimentales (por ejemplo, no sería un buen parámetro para normalizar en un experimento en el que se alimente a un grupo con una dieta rica en grasas). Durante el desarrollo de esta tesis hemos normalizado el peso cardíaco utilizando la longitud de la tibia en mm (HW/TL; Heart Weight/Tibial Length), ya que esta se mantiene constante durante la edad adulta del animal (Yin et al., 1982).

Otro método para determinar los niveles de hipertrofia, y que además aporta información sobre el estado de la función cardíaca en general, es mediante ecocardiografías. Utilizando este sistema es posible obtener datos del grosor de las paredes ventriculares, de la masa del ventrículo izquierdo y del tamaño de la cavidad.

El ventrículo izquierdo es la cámara más sensible a la hipertrofia y la que antes muestra alteraciones en comparación con las aurículas o con el ventrículo derecho. Al ser el corazón el órgano encargado de bombear la sangre a través de la aorta y hacerla llegar tanto al tronco superior como inferior, la sobrecarga de trabajo afecta directamente a su función. Por tanto, el ventrículo izquierdo es el más analizado a la hora de determinar procesos hipertróficos o fibróticos.

El análisis de la expresión de distintos genes aporta información sobre el proceso hipertrófico. Entre los marcadores utilizados se encuentran genes del programa fetal, que en condiciones normales o de hipertrofia fisiológica no se ven afectados, pero que en el caso de la hipertrofia patológica se sobreexpresan. Algunos de estos genes son proteínas contráctiles, como la α -actina del músculo esquelético (α -SKA, Acta1) o las cadenas pesadas α y β de la miosina (α -MHC o Mhy6, β -MHC o Mhy7). Otros son péptidos secretables que se inducen también en respuesta al daño cardíaco, y que desarrollan funciones como cardiocinas, como el péptido natriurético atrial (ANP, Nppa) y el péptido natriurético cerebral (BNP, Nppb).

El metabolismo cardíaco, como se ha visto anteriormente, se ve modificado durante el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. En el caso de la hipertrofia cardíaca patológica, la disminución del uso de los ácidos grasos como sustrato metabólico va acompañada por la reducción de la expresión de genes relacionados con la oxidación de los ácidos grasos. Algunos de los marcadores analizados durante el desarrollo de esta tesis fueron los siguientes:

- La piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (Pdk4). Esta enzima inactiva la piruvato deshidrogenasa, inhibiendo la oxidación de la glucosa y por tanto fomentando la utilización de ácidos grasos.
- La acil-coA deshidrogenasa de cadena media (Acadm), involucrada directamente en la β -oxidación de los ácidos grasos.
- La carnitina palmitoiltransferasa 1b muscular (mCPT1b), que es la enzima limitante para la incorporación de ácidos grasos en las mitocondrias.

Pdk4 y mCPT1b se encuentran reguladas directamente por PPAR α y PGC1 α . La expresión de estos genes y reguladores transcripcionales disminuye en respuesta a la hipertrofia cardíaca.

Además, se analizaron también los niveles de expresión del transportador de glucosa GLUT1 (Slc2a1), ya que en ocasiones su expresión aumenta en condiciones de hipertrofia, al volverse el corazón más dependiente del consumo de glucosa.

Cardiocinas

A parte de su plasticidad para adaptarse a las necesidades metabólicas del organismo, el corazón es capaz de producir y secretar una gran variedad de proteínas, llamadas cardiocinas, capaces de modular la función cardíaca. Estas proteínas ejercen funciones autocrinas, paracrinas y/o endocrinas fundamentales para el correcto mantenimiento de la función cardíaca y pueden actuar sobre varios de los tipos celulares que constituyen el corazón (Planavila et al., 2017). Se trata de proteínas con funciones reguladoras, secretadas en respuesta a cambios en el entorno cardíaco y que están involucradas en la remodelación del miocardio en la respuesta a daño, la respuesta a estrés, el control de la apoptosis de los cardiomiocitos, la activación de los fibroblastos cardíacos, la inflamación o el crecimiento vascular (Glembotski, 2011; Shimano et al., 2012). Además, las cardiocinas con función endocrina pueden regular la síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos en órganos periféricos (Wu et al., 2018).

Aunque algunos autores establecen una división entre el término cardiomiocina (referido a las proteínas producidas y secretadas únicamente por los cardiomiocitos) y el término cardiocina (referido a las proteínas producidas y secretadas por cualquiera de las células presentes en el corazón, incluyendo cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos o células de la musculatura lisa) (Chiba et al., 2018), ambos se usan indistintamente.

El patrón de expresión de las cardiocinas puede variar en respuesta a cambios en el entorno cardíaco. Por ejemplo, el estrés provocado por la isquemia altera las cardiocinas secretadas por el miocardio. Las células dañadas producen moléculas que alteraran los patrones de expresión de proteínas de los cardiomiocitos, induciendo un estado de inflamación en el corazón (Jahng et al., 2016). Los cambios en el repertorio de cardiocinas secretadas juegan un papel crítico en cómo va a responder el corazón frente a una situación de daño o estrés (Planavila et al., 2017).

Teniendo en cuenta que además muchos de estos factores tienen funciones endocrinas y afectan a órganos periféricos, un cambio o una desregulación en el sistema de secreción de las cardiocinas puede tener efectos críticos a nivel sistémico, y no exclusivamente a nivel cardíaco. El hecho de que muchas cardiocinas secretadas en respuesta a condiciones potencialmente patológicas sean además detectables en plasma

hace que su estudio sea muy relevante a la hora de identificar nuevos biomarcadores de patología cardíaca.

El péptido natriurético atrial o ANP fue la primera cardiocina identificada cuando el potencial del corazón como órgano endocrino todavía era desconocido (Sagnella, 2002). Se trata de una hormona producida y secretada por el corazón, con una estructura de anillo formada por 17 aminoácidos en común con otros péptidos natriuréticos (Akashi et al., 2007). El ANP es capaz de regular la presión y el volumen sanguíneo en respuesta al daño cardíaco mediante su acción en tejidos periféricos.

El ANP se produce y almacena en gránulos en los cardiomiocitos de la región atrial en forma de proANP. Su secreción depende del retículo endoplasmático y la hormona se corta durante este proceso para dar lugar a la forma madura (Akashi et al., 2007; Chiba et al., 2018). La expresión y posterior secreción de ANP aumenta notablemente en condiciones patológicas. En condiciones de hipoxia, como las que ocurren tras la isquemia, se estabiliza el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 α (HIF1A), que promueve directamente la transcripción de ANP (Chun et al., 2003). En general, la estimulación con factores pro-hipertroóficos como la endotelina 1, el estrés adrenérgico o el estrés mecánico inducen la secreción de ANP por parte del corazón (Bruneau et al., 1996, 2017; Fukuda et al., 1988).

El péptido natriurético cerebral o BNP fue identificado por primera vez en el cerebro, aunque es producido mayormente por los ventrículos (Porter et al., 1989). Igual que en el caso del ANP, los cardiomiocitos producen el precursor proBNP, que es almacenado en los mismos gránulos y cortado durante su secreción para producir la forma activa y un fragmento inactivo (proBNP N-terminal) (Seilhamer et al., 1989). Los niveles en plasma de BNP correlacionan directamente con la severidad de distintas patologías cardiovasculares (Chiba et al., 2018). En pacientes que previamente hayan sufrido un infarto de miocardio, los niveles de BNP circulantes sirven como predictor de la supervivencia (Fazlinezhad et al., 2011), del grado de hipertrofia del ventrículo izquierdo (Nagaya et al., 1998), del tamaño del área infartada (Ceriani and Giovanella, 2007) o del grado de fibrosis.

Aunque ANP y BNP se secretan conjuntamente, BNP posee una vida media más larga que ANP y resulta más eficiente como biomarcador de patología cardíaca (Akashi et al., 2007).

Los niveles circulantes de ANP y de BNP aumentan significativamente en respuesta al daño cardíaco. A nivel autocrino y paracrino, los péptidos natriuréticos inhiben el crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos (Holtwick et al., 2003), la inflamación (Vellaichamy et al., 2014), la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno (Kapoun et al., 2004; Redondo et al., 1998). Además, facilitan la disponibilidad de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial, aumentando así la eficiencia de la oxidación de ácidos grasos en el corazón (Sarzani et al., 2008a).

A nivel endocrino, los péptidos natriuréticos reducen el tono vascular relajando las células de la musculatura lisa, promoviendo la vasodilatación (Holtwick et al., 2002) y aumentando el índice de filtración glomerular en el riñón (Marin-Grez et al., 1986). De esta manera, los péptidos natriuréticos contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del volumen total de líquido en el organismo. Además, estos péptidos actúan sobre el tejido adiposo inhibiendo la proliferación de los adipocitos (Sarzani et al., 2008b) y modulando la termogénesis mediante el aumento de la expresión de PGC1 α y de la proteína desacopladora 1 (UCP1) (Bordicchia et al., 2012). Por lo tanto, los péptidos natriuréticos también contribuyen a regular el estado metabólico global del organismo.

Desde el descubrimiento de los péptidos natriuréticos y del potencial del corazón como órgano endocrino se han identificado nuevas cardiocinas, como el factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF-15), la miostatina, la proteína relacionada con folistatina 1 (FSTL1) o la IL33, que contribuyen a la regulación de la función cardíaca y que pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales para el corazón. La identificación y la caracterización de nuevas cardiocinas es, por tanto, un nuevo campo de investigación enfocado a tener a una mejor comprensión del funcionamiento cardíaco y al descubrimiento de nuevos potenciales agentes terapéuticos y biomarcadores. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se profundizó en las funciones del factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) en corazón y se identificó y caracterizó por primera vez la función de la proteína Meteorin-like (Metrnl) como una nueva cardiocina.

Factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21)

El FGF21 pertenece a la superfamilia de los factores de crecimiento fibroblásticos, conservadas en un amplio rango de organismos (Ornitz and Itoh, 2001; Powers et al., 1997). Se conocen 22 miembros de la familia, con un dominio central consistente en una secuencia de entre 120 y 130 aminoácidos, altamente conservada evolutivamente (Itoh and Ohta, 2013).

Según su mecanismo de acción, los factores de crecimiento fibroblásticos se pueden clasificar en tres familias, tal como muestra la Figura 5.

- Intracrinicos (FGF11, FGF12, FGF13 y FGF14). Estos FGFs actúan de manera intracelular, independientemente de la presencia de receptores de FGFs. Interactúan con dominios de canales de calcio dependientes de voltaje y también con proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en neuronas (Goldfarb, 2005; Itoh and Ornitz, 2011).
- Paracrinicos, que se dividen a su vez en las subfamilias de FGF1 (FGF2 y FGF5), FGF7 (FGF10 y FGF22), FGF8 (FGF17 y FGF18) y FGF9 (FGF16 y FGF20). Estos FGFs participan en respuestas biológicas de manera extracelular, interaccionando con el heparan-sulfato de la matriz, que a su vez es un cofactor necesario en la activación de los FGFR. Estos receptores de tipo tirosina-cinasa activan diversas vías de señalización, algunas de ellas reguladoras de la formación de órganos durante el desarrollo embrionario (Beenken and Mohammadi, 2009; Hui et al., 2018).
- Endocrinos (FGF15/19, FGF21 y FGF23). Estos FGFs tienen baja afinidad por el heparan-sulfato, característica que les permite ser liberados a la circulación y ejercer funciones endocrinas (Itoh, 2010).

Los receptores FGFR son necesarios para que los FGFs no intracrinicos lleven a cabo sus funciones biológicas. Estos receptores están constituidos por tres dominios extracelulares *immunoglobulin-like* de unión a ligandos y heparan-sulfato, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosina-cinasa (Mohammadi et al., 2005). Se conocen cuatro genes que codifican para los receptores

FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4. A parte, existen dos isoformas, b y c, de los receptores FGFR1, FGFR2 y FGFR3, obtenidas por *splicing* alternativo (Beenken and Mohammadi, 2009; Johnson et al., 1991).

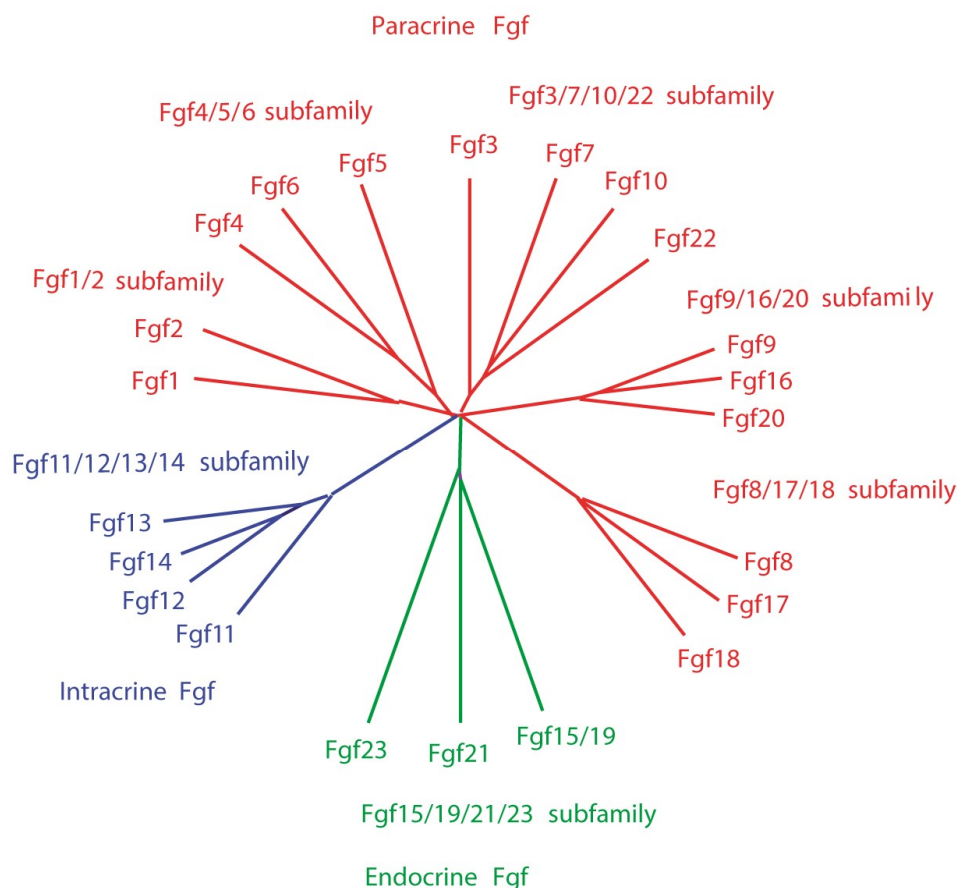


Figura 5. Superfamilia de los factores de crecimiento fibroblásticos. Estos se agrupan en 3 familias según sus mecanismos de acción: intracrinos, paracrinos o endocrinos. FGF21 pertenece a los FGFs endocrinos. Adaptado de (Itoh and Ornitz, 2011).

En el caso de los FGFs paracrinos, su afinidad por el heparan-sulfato no solo los inmoviliza cerca de su lugar de secreción, acotando así su rango de acción, sino que provoca la dimerización de los receptores y su activación, creando un complejo de unión entre los receptores, el heparan-sulfato y el ligando (Beenken and Mohammadi, 2009; Häcker et al., 2005).

Los FGFs endocrinos, que no presentan dicha afinidad, requieren de cofactores de la familia Klotho para que se produzca la unión y activación de su correspondiente receptor.

El FGF21 pertenece a la familia de los FGF endocrinos. Esta hormona, producida principalmente por el hígado (Badman et al., 2007; Hondares et al., 2011; Inagaki et al., 2007), es un potente regulador metabólico implicado en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, la sensibilidad a insulina y los niveles de triglicéridos. En modelos animales, su sobreexpresión protege frente a la obesidad inducida por una dieta rica en grasas. Se sabe que sus efectos sobre la captación de glucosa son independientes de la insulina (Kharitononkov et al., 2005).

En hígado, la expresión de FGF21 está mayormente regulada por PPAR α (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). A parte de PPAR α , otros factores de transcripción como el receptor de ácido retinoico β (RAR β), el receptor huérfano asociado con RAR α (ROR α), el receptor de hormonas tiroideas β (TR β) o el elemento de unión en respuesta a AMP cíclico (CREB) regulan la expresión de esta hormona en respuesta a distintos eventos fisiológicos (Adams et al., 2010; Hondares et al., 2010; Inagaki et al., 2007; Kim et al., 2014; Li et al., 2013; Wang et al., 2010).

Otros órganos, como el tejido adiposo blanco (Muisse et al., 2008), el tejido adiposo marrón (Hondares et al., 2011) o el músculo esquelético (Izumiya et al., 2008) también son productores de FGF21. En el tejido adiposo blanco, la expresión de FGF21 está regulada por PPAR γ (Muisse et al., 2008).

La acción de FGF21 sobre sus tejidos diana requiere la presencia de receptores FGFR, que se expresan de manera más o menos ubicua, y de un co-receptor. FGF21 tiene baja afinidad por los receptores FGFR, de manera que la especificidad de su función viene dada por la presencia en el tejido de su co-receptor, β -Klotho (KLB), necesario para la dimerización y función biológica de los FGFR (Kharitononkov et al., 2008; Kurosu et al., 2007).

El corazón es un tejido productor y diana de las acciones de FGF21 (Planavila et al., 2013). Aunque los niveles cardíacos de expresión génica tanto de FGF21 como del receptor FGFR1 y β -klotho son menores que en otros tejidos, una cantidad significativa de estas proteínas está presente en los cardiomiocitos, donde los efectos de FGF21 protegen frente a la hipertrofia cardíaca (Joki et al., 2015; Planavila et al., 2013), el estrés

oxidativo (Planavila et al., 2015a) y contribuyen al mantenimiento de la función cardíaca.

FGF21 en el corazón

FGF21 actúa como una cardiocina. Su expresión se induce en el corazón en respuesta a situaciones de daño o estrés cardíaco (Brahma et al., 2014; Planavila et al., 2015b), donde protege frente a la hipertrofia y juega un papel importante en la remodelación cardíaca (Joki et al., 2015; Liu et al., 2013), aumenta la oxidación de ácidos grasos y reduce la inflamación (Planavila et al., 2013). Los ratones deficientes en FGF21 presentan un aumento del tamaño relativo del corazón en estado basal y desarrollan signos de cardiodilatación (Planavila et al., 2013).

La principal población de células productoras de FGF21 en el corazón son los cardiomiocitos (Planavila et al., 2013), aunque también se expresa en las células endoteliales microvasculares (Wu et al., 2018). El corazón es sensible tanto a los efectos del FGF21 producido localmente (Planavila et al., 2013) como del FGF21 circulante (Liu et al., 2013; Redondo-Angulo et al., 2017). En condiciones de hipertrofia patológica, los niveles circulantes de FGF21 no se ven afectados, mientras que la secreción de FGF21 por parte del corazón aumenta, activando vías autorreguladoras y protectoras en este contexto de daño cardíaco (Planavila et al., 2013).

A nivel transcripcional, la expresión de FGF21 en el corazón se encuentra regulada por la vía de PPAR α y sirtuina 1 (SIRT1) (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Planavila et al., 2013). En los cardiomiocitos, el tratamiento con FGF21 activa la vía de ERK, considerada la principal vía intracelular responsable de los efectos de FGF21, indicando así una acción directa en este tipo celular (Planavila et al., 2013).

Los efectos inhibidores de FGF21 sobre la hipertrofia cardíaca y la inflamación están asociados con la inducción de PGC1 α , regulada por ERK y CREB (Planavila et al., 2013). La activación de esta vía inhibe la vía de NF- κ B, implicada en la regulación de genes de la respuesta inflamatoria, la apoptosis y el crecimiento celular (Häcker and Karin, 2006). Esta vía es además fundamental para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Kawano et al., 2005). FGF21 también activa la vía de la p38-MAPK, que protege frente a la

inducción de la apoptosis en el corazón provocada por la diabetes (Zhang et al., 2015a). La señalización de FGF21 en el contexto de la hipertrofia cardíaca se encuentra resumida en la Figura 6.

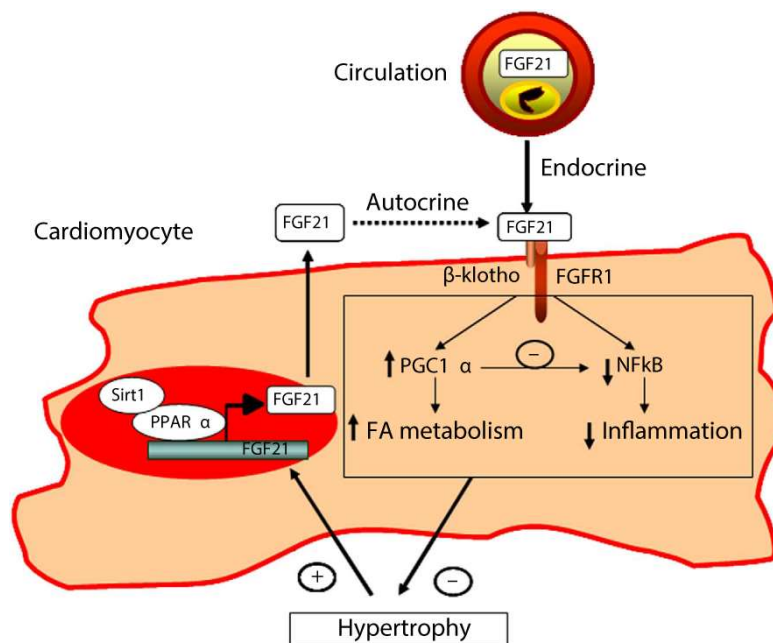


Figura 6. Señalización de FGF21 en las células cardíacas. La proteína FGF21 circulante o producida por los propios cardiomiocitos actúa a través de su receptor, aumentando la expresión de PGC1 α y el metabolismo lipídico e inhibiendo vías pro-inflamatorias, que contribuyen a atenuar la respuesta hipertrófica. En condiciones de hipertrofia, se induce la producción y secreción de FGF21 por parte de los cardiomiocitos. Adaptado de (Planavila et al., 2013a).

FGF21 también modula la respuesta a estrés oxidativo, que contribuye a la progresión de la insuficiencia cardíaca. FGF21 regula la expresión de genes antioxidantes, previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En los ratones deficientes para FGF21, la inducción de genes antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo o la inflamación está significativamente atenuada (Planavila et al., 2015a).

Se ha descrito que, tras sufrir un infarto de miocardio, algunos órganos periféricos como el hígado o el tejido adiposo aumentan la producción de FGF21 (Liu et al., 2012), contribuyendo a aumentar los niveles circulantes y a que FGF21 actúe de manera endocrina inhibiendo la apoptosis en los cardiomiocitos. Este mecanismo atenúa la remodelación patológica del miocardio y reduce el tamaño del área infartada (Liu et al., 2013).

También se ha descrito como los niveles circulantes elevados de FGF21 correlacionan de manera independiente con la hipertensión (Semba et al., 2013). El aumento del FGF21 circulante también se asocia con la incidencia del síndrome metabólico, la diabetes de tipo 2 y otros desórdenes del metabolismo lipídico (Zhang et al., 2008). En individuos con enfermedad coronaria y placas en la arteria carótida también se han detectado niveles circulantes más altos de FGF21 (Chow et al., 2013). En pacientes con diabetes, los niveles de FGF21 circulante correlacionan con un mayor riesgo de sufrir un evento cardiovascular (Ong et al., 2015). Tras sufrir un infarto de miocardio, los niveles de FGF21 aumentan y correlacionan significativamente con los de BNP (Zhang et al., 2015b). FGF21 es, por tanto, un importante biomarcador para enfermedades cardiovasculares.

En el contexto de la obesidad, diversos estudios han descrito el desarrollo de resistencia a los efectos de FGF21, debido a una reducción de la expresión del co-receptor β -klotho (Díaz-Delfín et al., 2012). Esta situación de resistencia a los efectos de FGF21 se ha observado también en el corazón (Patel et al., 2014; Tanajak et al., 2016).

FGF21 en el metabolismo

El desequilibrio energético que ocurre en condiciones de obesidad induce también importantes cambios en el metabolismo del corazón, incluyendo un aumento en la oxidación de ácidos grasos, que puede contribuir al desarrollo de insuficiencia cardíaca (Sakamoto et al., 2000; Stanley et al., 2005). En individuos obesos, la insuficiencia cardíaca se caracteriza por el desarrollo temprano de disfunción ventricular diastólica, el aumento de la masa del ventrículo izquierdo y el posible desarrollo a largo plazo de disfunción ventricular sistólica (Devereux et al., 2000; Zhang and Ren, 2016).

A parte de sus efectos sobre el metabolismo cardíaco, FGF21 es un regulador metabólico clave para la adaptación al ayuno, el control de la glucemia, la sensibilidad a insulina, la inducción de la gluconeogénesis, la cetogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la respuesta termogénica (Badman et al., 2007; Gälman et al., 2008; Hondares et al., 2010; Inagaki et al., 2007; Kharitononkov et al., 2005).

FGF21 aumenta el consumo de glucosa y el gasto energético, mejorando así la sensibilidad a la insulina (Dunbar et al., 2008). En modelos transgénicos de sobreexpresión de FGF21 en ratón, los animales son resistentes tanto al aumento de peso asociado con el envejecimiento como al provocado por una dieta rica en grasas (Kharitononkov et al., 2005). El tratamiento con FGF21 reduce la adiposidad en varios modelos animales de obesidad (Dunbar et al., 2008).

Los efectos protectores de FGF21 frente a la obesidad no son causados por cambios en la ingesta o en la actividad física, sino por un aumento del gasto energético basal (Dunbar et al., 2008; Emanuelli et al., 2014). Las acciones de FGF21 en el tejido adiposo marrón, la diana principal de esta hormona para la regulación del gasto energético, es directa sobre los adipocitos marrones (Hondares et al., 2010). FGF21 promueve la activación del tejido adiposo marrón y además induce programas termogénicos en el tejido adiposo blanco, mediante el proceso conocido como *browning*. Estos mecanismos están mediados por la activación de las vías de ERK1/2 y Akt por parte de FGF21 (Kouhara et al., 1997; Lamothe et al., 2004) y la consecuente inducción de PGC1 α (Emanuelli et al., 2014; Fisher et al., 2012).

A pesar de que FGF21 no se expresa en el sistema nervioso central, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Hsuchou et al., 2007). El cerebro expresa tanto el receptor FGFR1 como el co-receptor β -klotho (Bookout et al., 2014; Tacer et al., 2010). A parte de la activación termogénica por acción directa sobre los adipocitos, FGF21 promueve la activación del sistema simpático a nivel cerebral e induce el programa termogénico de manera indirecta (Douris et al., 2015; Wen et al., 2007).

En humanos, la expresión de FGF21 en el tejido adiposo blanco es negligible (Gallego-Escuredo et al., 2015), siendo el tejido adiposo marrón el único depósito adiposo relevante para la secreción de FGF21 (Hondares et al., 2014). A pesar de que los humanos adultos tienen una menor cantidad de tejido adiposo marrón en comparación con los roedores, la función endocrina de este tejido resulta igualmente relevante a nivel funcional (Villarroya et al., 2013).

Diversos estudios han demostrado como los niveles de FGF21 circulante correlacionan con el índice de masa corporal, los niveles de insulina y la glicemia (Chavez et al., 2009;

Dushay et al., 2010; Gallego-Escuredo et al., 2015; Zhang et al., 2008). Este aumento de los niveles circulantes de FGF21, atribuido a una mayor producción hepática, se ha propuesto como biomarcador predictivo del desarrollo del síndrome metabólico y de la diabetes de tipo 2 (Bobbert et al., 2013; Chen et al., 2011).

También en estudios en humanos se ha descrito la aparición de resistencia a los efectos de FGF21 como una de las numerosas alteraciones endocrinas provocadas por la obesidad. A pesar de los elevados niveles circulantes de esta hormona, el ambiente proinflamatorio en el tejido adiposo, comúnmente asociado con la obesidad, reduce la expresión local de β -klotho, impidiendo así los efectos metabólicos beneficiosos de FGF21 (Gallego-Escuredo et al., 2015).

Meteorin-like (Metrnl)

Llamada así por su homología con la neurotrofina Meteorin (Nishino et al., 2004), Meteorin-like (también conocida como Cometina o Subfatina) es una proteína secretable de aproximadamente 30kDa. Recientemente se han publicado diversos estudios sobre su papel como adipocina y como miocina. De manera análoga a la producción de cardiocinas por parte del corazón, los distintos depósitos de tejido adiposo y el músculo esquelético producen y secretan una serie de proteínas (adipocinas y miocinas, respectivamente) con funciones autocrinas, paracrinas y/o endocrinas. Estas proteínas contribuyen al correcto funcionamiento de dichos órganos y a la regulación de la homeostasis energética del organismo.

El gen de *Metrnl* se encuentra en el cromosoma 11qE2 en ratón y 17q25.3 en humano. Codifica para una proteína de 311 aminoácidos que contiene un péptido señal de 45 aminoácidos en el extremo N-terminal y no tiene ningún dominio transmembrana (Li et al., 2014; Zheng et al., 2016). Las secuencias de *Metrnl* de rata, ratón y humano comparten un 77% de homología. Se han identificado ortólogos de la proteína *Metrnl* en todos los vertebrados, aunque no en invertebrados (Jørgensen et al., 2009; Li et al., 2014; Zheng et al., 2016). La proteína madura, de aproximadamente 30kDa, tiene un potencial sitio de glicosilación en la posición 103 en rata y ratón, aunque no en

humanos, lo que sugiere que esta glicosilación no es indispensable para su el desarrollo de sus funciones (Jørgensen et al., 2012; Zheng et al., 2016).

Meteorin-like comparte un 40% de homología con Meteorin. Estas moléculas conforman una nueva familia de proteínas sin otros miembros conocidos (Jørgensen et al., 2012). A diferencia de Meteorin, que se expresa en progenitores neurales sin diferenciar y en astrocitos, Meteorin-like únicamente se expresa en regiones muy específicas del cerebro durante el desarrollo (Li et al., 2014) y es indetectable en el cerebro adulto. Sin embargo, se ha descrito que el tratamiento con Metrnl promueve el crecimiento de las neuritas de manera similar a Meteorin, y es capaz de regenerar las neuronas sensoriales de oído interno y de mejorar la audición en un modelo de sordera en cobaya (Jørgensen et al., 2012).

Metrnl se expresa en una amplia variedad de tejidos. El músculo esquelético, el corazón y el tejido adiposo subcutáneo son los tejidos donde más abundante es su expresión, seguidos por el tejido adiposo marrón y el riñón. Diferentes estímulos pueden aumentar la expresión de Metrnl por parte de diferentes tejidos. Por ejemplo, la exposición al frío induce su expresión en el tejido adiposo blanco, y el ejercicio induce su expresión en el músculo esquelético (Rao et al., 2014). Pese a su elevada expresión en el corazón, hasta el desarrollo de la presente tesis el papel de Metrnl en el corazón era desconocido.

En humanos se han detectado también altos niveles de expresión en monocitos activados, en la mucosa de los aparatos digestivo y respiratorio, y en la piel (Ushach et al., 2015). La presencia de niveles altos de Metrnl en los tejidos barrera sugiere que esta hormona podría tener un papel relevante para la respuesta inmunológica.

Hasta el momento no se han identificado receptores específicos para Metrnl. Sin embargo, los efectos aditivos al tratar células cerebrales con una combinación de Meteorin y Metrnl sugieren que las dos proteínas de esta familia no comparten un único receptor, aunque ninguno haya sido descubierto todavía (Jørgensen et al., 2012).

Meteorin-like en el músculo esquelético

El músculo esquelético es uno de los tejidos donde es más abundante la expresión de Metrnl. PGC1 α 4 es una nueva isoforma de *splicing* de PGC1 α que promueve la hipertrofia muscular en respuesta al ejercicio físico, regulando la función mitocondrial y el metabolismo oxidativo (Ruas et al., 2012). PGC-1 α 4 también promueve la expresión de una serie de genes, entre ellos IGF-1, miostatina y Metrnl (Rao et al., 2014). Metrnl es, por tanto, una miocina secretada por el músculo esquelético, regulada transcripcionalmente por PGC1 α 4. Se ha observado que el ejercicio físico aumenta la expresión de Metrnl en ratón y en humanos (Eaton et al., 2018) y eleva sus niveles circulantes (Bae, 2018; Rao et al., 2014). Parece ser que la inducción de Metrnl en el músculo esquelético contribuye a los efectos beneficiosos de esta proteína, aumentando el gasto energético basal y reduciendo la inflamación en otros tejidos (Rao et al., 2014).

Por contra, la expresión de Metrnl en el músculo y sus niveles circulantes son más bajos en los ratones alimentados con una dieta rica en grasas. En este modelo de obesidad en ratón, el tratamiento con Metrnl mejora significativamente la inflamación en el músculo esquelético, con la consecuente reducción de la expresión de los marcadores IL6, TNF α y MCP1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) y de la resistencia a la insulina. Estos efectos beneficiosos de Metrnl dependen de AMPK y de PPAR δ en el músculo esquelético, y podrían estar mediados en parte por el aumento de la expresión de PGC1 α , inducido por Metrnl (Jung et al., 2018).

Metrnl también mejora la resistencia a insulina y reduce la inflamación provocada por el tratamiento con palmitato en líneas celulares de músculo, donde aumenta la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos como mCPT1, la acil-coA oxidasa (ACOX) o la proteína de unión a ácidos grasos 3 (FABP3) (Jung et al., 2018).

Por tanto, la proteína Metrnl es una miocina inducida por el ejercicio físico en el músculo esquelético, donde mejora la sensibilidad a la insulina y reduce la inflamación. Además, la Metrnl producida por el músculo se secreta al torrente sanguíneo, actuando de manera endocrina sobre otros tejidos y contribuyendo así a los beneficios del ejercicio físico sobre el organismo.

Meteorin-like en el tejido adiposo

En 2014, se demostró que la secreción de la proteína Metrnl aumentaba significativamente en el tejido adiposo de ratas sometidas a 18 semanas de restricción calórica (Li et al., 2014). El tejido adiposo es un órgano con una gran capacidad para producir y secretar adipocinas, entre ellas Metrnl. En rata, ratón y humanos, el depósito de tejido adiposo donde más alta es la expresión de Metrnl es el tejido adiposo blanco subcutáneo, seguido por otros depósitos de tejido adiposo blanco y por el tejido adiposo marrón o pardo (Li et al., 2014; Zheng et al., 2016).

Metrnl promueve la inducción de genes del programa termogénico, como UCP1 o CIDEA (activador de muerte celular), en el tejido adiposo blanco. Además, el propio tejido adiposo aumenta la expresión y secreción de Metrnl en respuesta a una exposición aguda al frío (4°C) (Rao et al., 2014). Sin embargo, el papel de Metrnl en la inducción termogénica no es directo sobre los adipocitos, sino que está mediado por células del sistema inmune infiltradas en el tejido adiposo blanco. Metrnl induce la producción de IL4 e IL13 por parte de los eosinófilos infiltrados en el tejido adiposo, que a su vez promueven la activación de macrófagos de tipo M2, que son los responsables de la inducción del programa termogénico en adipocitos (Rao et al., 2014).

La expresión de Metrnl en el tejido adiposo blanco también aumenta durante la diferenciación de los adipocitos y en animales alimentados con una dieta rica en grasas (Li et al., 2014; Zheng et al., 2016). Dentro del tejido adiposo no se observan diferencias en los niveles de expresión de Metrnl entre los adipocitos y las células estromales. En el interior de los adipocitos, Metrnl se distribuye de forma homogénea en el citoplasma, pero no se encuentra asociada a las gotas lipídicas (Li et al., 2014).

En el tejido adiposo blanco, Metrnl reduce la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas de manera autocrina y/o paracrina. Metrnl aumenta la expresión de genes mitocondriales, genes relacionados con la β -oxidación de ácidos grasos y genes antiinflamatorios (Rao et al., 2014).

El modelo de *knockout* de Metrnl específico para el tejido adiposo blanco presenta una mayor resistencia a la insulina, mientras que en el modelo de sobreexpresión específica de Metrnl hay más protección frente a la dieta rica en grasas sin que se vean alterados

los niveles circulantes de Metrnl. Además, el aumento de los niveles circulantes de Metrnl es incapaz de rescatar la sensibilidad a insulina en el tejido adiposo blanco en el modelo de *knockout* específico (Li et al., 2015b).

La diferenciación de las células mesenquimales a adipocitos maduros es un proceso crítico para la regulación energética global del organismo y el metabolismo lipídico y juega un papel clave para el mantenimiento de un tejido adiposo blanco funcional (Ma et al., 2015). Metrnl promueve la acumulación de lípidos y aumenta la expresión de PPAR γ , uno de los principales reguladores de la diferenciación adipocitaria (Siersbæk et al., 2010). Además, Metrnl aumenta la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, como FABP4, el clúster de diferenciación 36 (CD36), la acetil-coA carboxilasa (ACC), la sintasa de ácidos grasos (FASN) y la perilipina. El bloqueo de PPAR γ en el tejido adiposo blanco inhibe los efectos beneficiosos de Metrnl sobre la resistencia a insulina (Li et al., 2015b).

A pesar de que en varios estudios se describe el papel beneficioso de Metrnl aumentando el gasto energético, mejorando la tolerancia a glucosa, la expresión de genes asociados con la termogénesis y la expresión de citoquinas antiinflamatorias (Li et al., 2015b; Rao et al., 2014), existe cierta controversia sobre el papel de Metrnl en el tejido adiposo humano.

Los resultados de un estudio clínico en el que se analizaron muestras de tejido adiposo subcutáneo de pacientes pediátricos mostraron un aumento de la expresión de Metrnl en el tejido adiposo de los pacientes con obesidad. Además, en los análisis realizados en líneas celulares de pre-adipocitos humanos la expresión de la proteína disminuía durante la diferenciación a adipocitos maduros. No obstante, no se encontró una correlación positiva entre los niveles circulantes de Metrnl y el índice de masa corporal (Löffler et al., 2017).

Sin embargo, los resultados obtenidos en otros estudios realizados en humanos respaldan los resultados observados en ratón. En pacientes con diabetes, los niveles circulantes de Metrnl disminuyen y además correlacionan negativamente con la resistencia a insulina (El-Ashmawy et al., 2019; Lee et al., 2018). Los niveles circulantes bajos de Metrnl correlacionan con mayor intolerancia a la glucosa y con la incidencia

de aterosclerosis (El-Ashmawy et al., 2019). En pacientes con obesidad sometidos a una cirugía bariátrica, el aumento de los niveles circulantes de Metrnl se asoció con una reducción de la resistencia a la insulina y con una mayor actividad termogénica. Este mismo estudio describe niveles circulantes de Metrnl más bajos en los pacientes con obesidad (Pellitero et al., 2018).

Estos resultados indican que la proteína Metrnl actúa como una adipocina producida por los tejidos adiposos, tanto a nivel local como contribuyendo a regular los niveles circulantes. En general Metrnl tiene efectos metabólicos beneficiosos, aumenta la termogénesis y el gasto energético y mejora la resistencia a insulina. La Figura 7 recoge las acciones de la Metrnl secretada por el músculo esquelético y el tejido adiposo sobre la regulación metabólica del organismo.

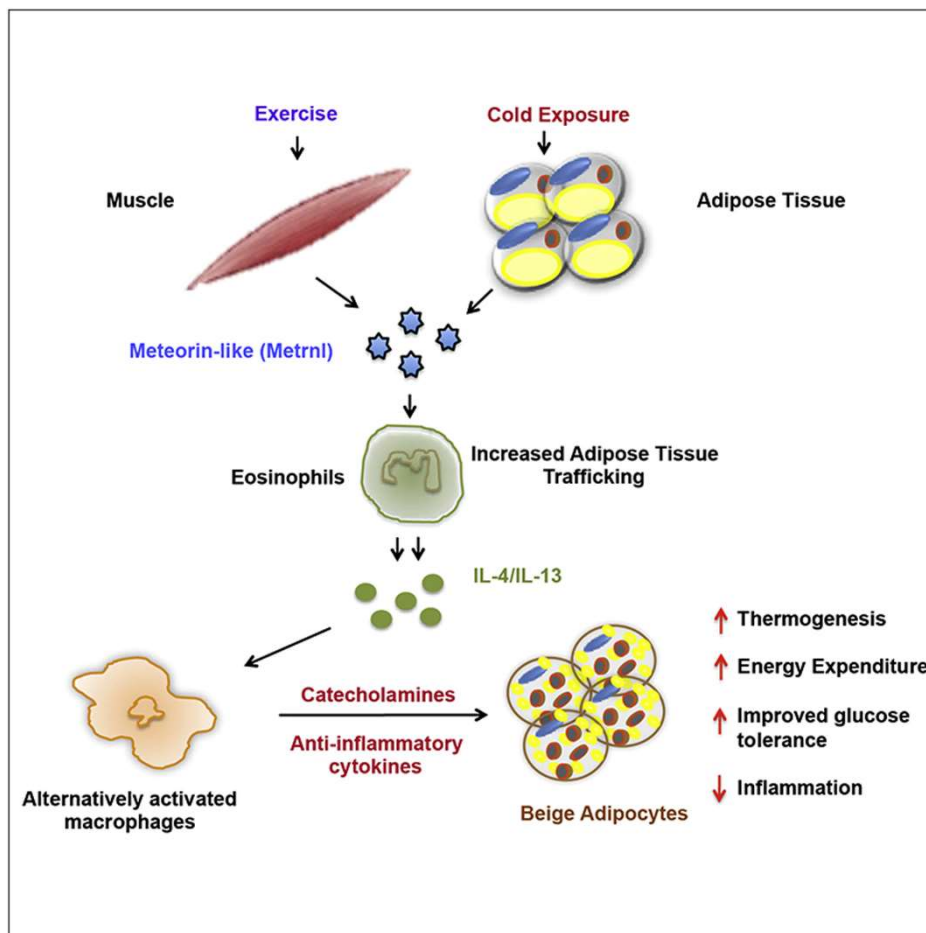


Figura 7. Mecanismos de acción de la proteína Metrnl sobre la regulación del metabolismo energético global. La Metrnl producida por el músculo y el tejido adiposo modula la acción de los macrófagos M2, que promueven el *browning* del tejido adiposo, aumentando el gasto energético y reduciendo la inflamación. Adaptado de (Rao et al., 2014).

Meteorin-like en el sistema inmune

En humanos, las células con los niveles de expresión más altos de *Metrnl* son los monocitos activados, seguidos por los tejidos barrera como las mucosas del sistema respiratorio o la piel (Zheng et al., 2016). A pesar de que en los monocitos no activados su expresión es mucho menor, el hecho de que la expresión de *Metrnl* aumente de manera drástica cuando estas células inmunes se activan sugiere que *Metrnl* podría tener un papel relevante en el sistema inmunitario (Ushach et al., 2015, 2018; Zheng et al., 2016).

Metrnl se asocia mayormente con la inducción de un fenotipo M2 o anti-inflamatorio en los macrófagos. Su expresión en los macrófagos alternativamente activados y M2-*like* está regulada por otras citocinas, que pueden inducir (TNF α , IL4) o inhibir (TGF β , interferón γ /IFN γ) su producción. A su vez, *Metrnl* también es capaz de modular el patrón de expresión de citocinas de los macrófagos (Ushach et al., 2018).

Estudios recientes han demostrado como los niveles circulantes de *Metrnl* aumentan en los ratones tratados con lipopolisacárido (LPS), un polisacárido de origen bacteriano utilizado para inducir una fuerte respuesta inmunológica (Ushach et al., 2018). El mismo grupo también ha descrito la aparición de lesiones inflamatorias en los ratones deficientes en *Metrnl*.

Como ya se ha visto anteriormente, el mecanismo mediante el cual *Metrnl* tiene efectos sobre la inducción del programa termogénico en el tejido adiposo blanco implica la estimulación de los eosinófilos infiltrados por parte de *Metrnl*, generando como respuesta la activación alternativa de los macrófagos en el tejido adiposo (Rao et al., 2014). Esto refuerza la idea de que la señalización de *Metrnl* está involucrada en otras funciones asociadas con la activación de los macrófagos M2 (Ushach et al., 2015). *Metrnl* se sobreexpresa en enfermedades autoinmunes como la dermatitis atópica, asociada con macrófagos de tipo M2 (Ushach et al., 2015).

Finalmente, en pacientes con diabetes de tipo 2 o con enfermedad cardíaca coronaria, los niveles circulantes de *Metrnl* correlacionan negativamente con los de citocinas inflamatorias, como IL6 y TNF α (Dadmanesh et al., 2018; El-Ashmawy et al., 2019). *Metrnl* también se asocia con el desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis (El-

Ashmawy et al., 2019), ambas condiciones relacionadas con la activación del sistema inmune innato, con un estado de inflamación crónica y con una desregulación entre macrófagos M1 y M2 (Bories and Leitinger, 2017).

Autofagia

La autofagia es un proceso celular autodegradativo que contribuye a la degradación de componentes celulares, permitiendo así un recambio de orgánulos u otros elementos estructurales. Por tanto, este proceso es crítico para el mantenimiento de la homeostasis y de un correcto funcionamiento celular (Zech et al., 2019). La degradación de estos elementos da lugar a monómeros biológicamente activos, como por ejemplo aminoácidos, que pueden ser reutilizados por la célula (Feng et al., 2014; Li et al., 2016). La autofagia es un mecanismo altamente conservado, presente en todas las células eucariotas.

Las proteínas del organismo se encuentran en un constante ciclo de síntesis y degradación. Junto con la vía ubiquitina-proteasoma (UPS), la autofagia es una de las vías principales para la eliminación de proteínas aberrantes o mal plegadas (Ciechanover, 2017). Así, los niveles constitutivos de autofagia son necesarios para el mantenimiento de la homeostasis de la célula y para asegurar el funcionamiento óptimo de los componentes celulares (Li et al., 2015a; Yang and Klionsky, 2010).

Frente a un estrés ambiental, como la limitación de nutrientes o el estrés oxidativo, la autofagia se induce como respuesta adaptativa para tratar de asegurar la supervivencia de la célula (Li et al., 2015a; Maiuri et al., 2007). Sin embargo, una desregulación o una activación excesiva de la autofagia puede provocar la muerte celular. El mal funcionamiento del sistema autofágico puede dar lugar a una amplia variedad de patologías, desde cáncer a enfermedades neurodegenerativas o infecciones causadas por patógenos externos (Mizushima et al., 2008).

La autofagia puede ser no específica, degradando parte del citoplasma y los componentes que encuentre, o específica, degradando orgánulos concretos como mitocondrias, peroxisomas o gotas lipídicas (Green and Levine, 2014).

La correcta regulación de estos procesos es de una importancia primordial para el corazón, puesto que el recambio de cardiomiocitos es mínimo (Bergmann et al., 2009) y necesitan degradar las proteínas y orgánulos envejecidos que ya no funcionan correctamente. En condiciones fisiológicas, los niveles de autofagia basales en el

corazón son necesarios para el mantenimiento del tamaño de los cardiomiocitos, así como de la estructura y la función cardíaca (Nakai et al., 2007). La hipertrofia cardíaca patológica está asociada con una disfunción de las vías de señalización involucradas en la regulación de la autofagia en los cardiomiocitos (Schirone et al., 2017).

Tipos de autofagia

Se conocen tres tipos principales de autofagia, que tienen en común la degradación de la carga en los lisosomas, pero que difieren en los mecanismos que conducen a esta degradación (Feng et al., 2014).

La microautofagia consiste en la incorporación directa de pequeñas cantidades de material proveniente del citoplasma en los lisosomas, a través de invaginaciones formadas en la membrana lisosomal. Una vez que contienen la carga a degradar, las invaginaciones se desprenden y quedan en el interior de los lisosomas, donde son degradadas por hidrolasas junto con la carga citoplasmática. Este sistema no requiere de la formación de autofagosomas (Castañeda et al., 2019; Zech et al., 2019).

La autofagia mediada por chaperonas o CMA es una forma de autofagia selectiva que únicamente degrada proteínas que contienen un motivo concreto, y que forma parte del sistema de control de calidad de las proteínas de la célula, además de proporcionar de aminoácidos (Cuervo et al., 1995; Kiffin et al., 2004). Los sustratos son reconocidos por chaperonas que facilitan su entrada al lisosoma a través de transportadores localizados en la membrana lisosomal (Papáčkova and Cahová, 2014).

La macroautofagia, o autofagia de ahora en adelante, es la forma de autofagia más activa y la que juega un papel más relevante para la célula (Gottlieb and Mentzer, 2010). Este complejo proceso requiere la formación de una vesícula de doble membrana llamada autofosoma (Papáčkova and Cahová, 2014), que secuestra orgánulos intactos, proteínas celulares u otras estructuras en su interior, que posteriormente serán degradados mediante la fusión del autofosoma con los lisosomas (Yang and Klionsky, 2010).

La Figura 8 muestra las vías de regulación simplificadas de la vía de la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La autofagia selectiva, de la que se hablará más adelante, permite degradar orgánulos o estructuras específicos de la célula.

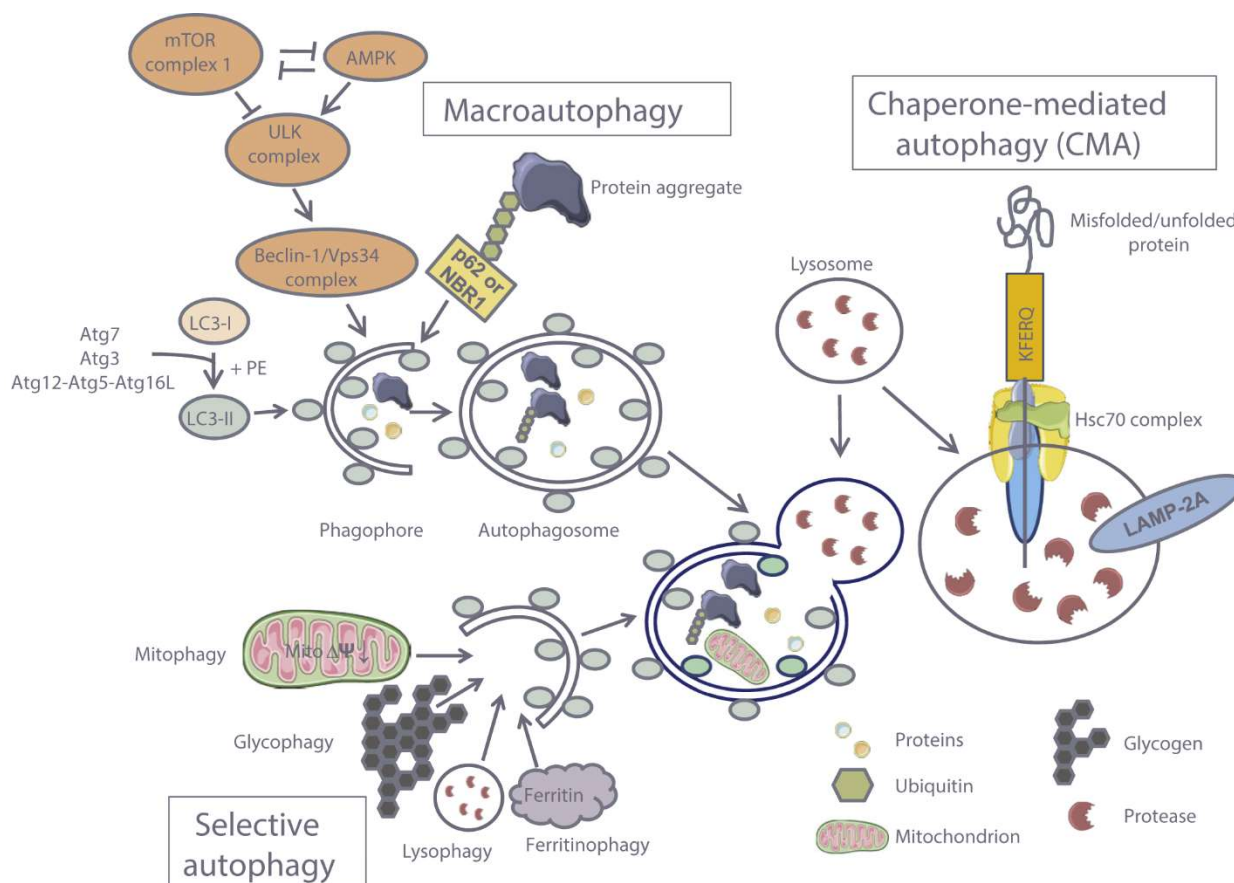


Figura 8. Regulación de las vías de la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA). Estos dos tipos, más regulados que la microautofagia, constituyen uno de los principales sistemas para el control de calidad de las proteínas celulares. La autofagia puede ser también un proceso altamente selectivo y degradar únicamente un tipo de orgánulo o estructura concreto. Adaptado de (Zech et al., 2019).

Mecanismos de la autofagia

La autofagia se inicia con la formación de un fagóforo o pre-autofosoma. Según el tipo celular o la situación fisiológica o de estrés en la que se encuentre la célula, el lugar de origen del fagóforo puede variar (Klionsky et al., 2016; Li et al., 2015a; Ravikumar et al., 2010), aunque lo más común es que la membrana que lo forma se aisle desde el retículo endoplasmático (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009).

Este proceso de inducción o nucleación del fagóforo requiere de la activación del complejo macromolecular de la cinasa activadora de la autofagia similar a Unc-51 (ULK), compuesto por los genes relacionados con la autofagia Atg3 y Atg10, ULK1 y 2 y la proteína de interacción con la familia FAK de 200 kDa (FIP200) (Ghosh and Pattison, 2018). Este complejo se encuentra fosforilado e inhibido por su unión a mTORC1 (Hosokawa et al., 2009). En condiciones de escasez de nutrientes, mTORC1 se separa del complejo. Su falta de actividad provoca la desfosforilación y consecuente activación del resto de los componentes del complejo ULK, que fosforilan la proteína Beclin-1 y activan el complejo de proteínas de tráfico vacuolar VPS, resultando en la formación de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3), que permite la elongación de las membranas y la maduración del autofagosoma (Maejima et al., 2016; Park et al., 2016, 2018; Russell et al., 2013).

La elongación del fagóforo depende de dos sistemas de conjugación de proteínas Atg. El primero es el complejo formado por Atg12, Atg5, Atg16L y Atg7. Este complejo activa el segundo complejo, formado por el sistema LC3 (proteína asociada la cadena ligera de microtúbulos 3 o Atg8) (Castañeda et al., 2019). Atg7 activa la forma citosólica de LC3, LC3-I, uniéndole un grupo fosfatidiletanolamina y la transfiriéndola a Atg3, que la incorpora a la membrana del fagóforo dando lugar a la forma madura de la proteína, LC3-II (Kabeya et al., 2003; Li et al., 2015a).

El fagóforo se cierra por completo dando lugar a un autofagosoma maduro. La presencia de LC3-II en la membrana del autofagosoma es necesaria para el reconocimiento de la carga y para la fusión de la doble membrana lipídica del autofagosoma con la membrana lisosomal (Ghosh and Pattison, 2018; Nakatogawa et al., 2007). LC3-II reconoce la proteína p62/SQSTM1, que permite a los elementos ubiquitinados entrar en el autofagosoma para su degradación (Ghosh and Pattison, 2018; Pankiv et al., 2007).

El último paso de la autofagia consiste en la fusión del autofagosoma maduro con un lisosoma. Los autofagosomas son transportados por las dineínas a lo largo de los microtúbulos hacia la región perinuclear de la célula, donde se encuentran con los lisosomas (Korolchuk et al., 2011). Existen dos tipos de interacción con los lisosomas: la interacción de tipo *kiss-and-run*, donde únicamente el contenido del autofagosoma

se transfiere al lisosoma (Jahreiss et al., 2008), o la fusión completa, que da lugar a un autofagolisosoma delimitado por una única membrana. Esta fusión está mediada por LAMP2 (proteína asociada a la membrana lisosomal 2), RAB7 (proteína relacionada con Ras 7) y por proteínas SNARE (receptores de proteínas de unión a NSF soluble) (He and Klionsky, 2009; Maiuri et al., 2007; Nakamura and Yoshimori, 2017). La proteína LC3-II de la membrana exterior del autofagosoma puede ser reciclada por Atg4, que elimina el grupo fosfatidiletanolamina (Kabeya et al., 2003). La LC3-II del interior y la proteína p62 son degradadas por enzimas lisosomales con el resto de la carga.

Regulación de la autofagia

En corazón, los niveles de autofagia en condiciones basales son muy bajos. Sin embargo, la inducción de la autofagia en respuesta al estrés es muy rápida, aumentando los niveles de autofagia con el objetivo de mantener la homeostasis celular y garantizar los nutrientes necesarios para el mantenimiento de la función cardiaca (Zech et al., 2019).

Por tanto, este proceso necesita una maquinaria reguladora capaz de responder rápidamente a distintos estímulos. Algunos de los mecanismos que regulan la autofagia en cardiomiocitos son los siguientes.

mTOR

mTOR es una serina/treonina-cinasa que forma parte de dos complejos proteicos distintos: mTORC1 y mTORC2 (Sciarretta et al., 2014). mTORC1 es un regulador negativo de la autofagia, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, mTORC1 fosforila ULK1 y Atg3, inhibiendo el complejo ULK y la formación de los autofagosomas. En ausencia de nutrientes, la proteína AMPK inhibe mTORC1 y esto conduce a la rápida desfosforilación y activación del complejo ULK (Kim et al., 2011; Maejima et al., 2016; Park et al., 2016). A nivel transcripcional, mTORC1 inhibe la acción del factor de

transcripción EB (TFEB), un regulador de la expresión de los genes ATG y de la biogénesis lisosomal (Martina et al., 2012).

AMPK y GSK-3 β

Tanto la AMPK como la GSK-3 β (cinasa de la glicógeno sintasa 3 β) son serina/treonina-cinasas que están reguladas por el estado energético de la célula. En ausencia de ATP, la AMPK se activa e induce la autofagia inhibiendo el complejo mTORC1 y provocando así la activación de ULK y la formación del fagóforo (Inoki et al., 2006; Zaha and Young, 2012). La acción de AMPK es necesaria para la activación de la autofagia durante la isquemia (Matsui et al., 2007). GSK-3 β también se activa en respuesta a la ausencia de nutrientes y provoca la inhibición de mTORC1 (Inoki et al., 2006).

El estrés oxidativo

Los niveles altos de ROS promueven la oxidación de Atg4 y disminuyen su actividad, provocando un aumento de los niveles de la forma madura LC3-II, ya que no puede ser cortada y reciclada. Esto promueve la formación de más autofagosomas (Scherz-Shouval et al., 2007; Sciarretta, 2018). Además, ciertos niveles de ROS son necesarios para la inducción de la autofagia en condiciones de ausencia de nutrientes y durante la isquemia (Sciarretta et al., 2013).

Mecanismos transcripcionales

El factor de transcripción TFEB regula la expresión de los genes ATG y las enzimas lisosomales, promoviendo la formación de autofagosomas, su fusión con los lisosomas y la degradación de la carga. Además, TFEB controla también la biogénesis lisosomal. Tanto su localización nuclear como su actividad están reguladas por ERK2 y por mTOR (Settembre et al., 2011).

Algunos microRNAs (miRNA) también juegan un papel relevante en la regulación de la autofagia en cardiomicitos (Ucar et al., 2012).

Estudio de la autofagia

A la hora de evaluar el funcionamiento o la actividad de la vía autofágica en las células, se recomienda utilizar una combinación de varios ensayos (Klionsky et al., 2016).

Los niveles estáticos de proteínas relacionadas con la autofagia pueden servir para detectar si hay una desregulación en este proceso, pero son insuficientes para determinar el grado de actividad autofágica de la célula. La detección mediante *immunoblot* de niveles elevados de LC3-II puede indicar tanto una mayor actividad autofágica con una mayor formación de autofagosomas, como una acumulación excesiva de esta proteína debida al bloqueo de la degradación de los autofagosomas existentes, y por tanto una autofagia defectuosa (Li et al., 2016; Zech et al., 2019).

La proteína p62/SQSTM1, que se degrada junto con la carga en el interior de los autofagolisosomas, también es detectable mediante *immunoblot* y puede ayudar a determinar si realmente la autofagia se encuentra activa en las células (Klionsky et al., 2016; Zech et al., 2019).

Puesto que la autofagia es un proceso altamente dinámico, la determinación de la actividad o flujo autofágico puede proporcionar información más efectiva que los niveles estáticos de proteína (Li et al., 2016). La determinación del flujo autofágico requiere el uso de un inhibidor lisosomal, que evita la fusión de los autofagosomas y los lisosomas o directamente bloquea su degradación. Algunos de los más utilizados son la leupeptina o la cloroquina. Al comparar los niveles de LC3-II basales con los niveles tras inhibir la degradación de los autofagosomas, se puede evaluar la relación entre los autofagosomas formados y degradados y por tanto los niveles de autofagia en las células. Un gran aumento en la cantidad de LC3-II indica que la autofagia se encuentra muy activa (Bhuiyan et al., 2013; Singh et al., 2017).

Los autofagosomas de doble membrana, los lisosomas de membrana simple y los autofagolisosomas se pueden observar mediante microscopia electrónica de

transmisión en secciones de corazón sin necesidad de un marcaje adicional (Bhuiyan et al., 2013; Singh et al., 2017; Tanaka et al., 2000).

Respecto al estudio de la autofagia en humanos, este se ve limitado por la gran variabilidad que existe entre individuos y por la dificultad de la obtención e interpretación de los datos. Además, para la determinación del flujo autofágico es necesaria la intervención con fármacos, de manera que no resulta accesible en pacientes.

Autofagia e hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca patológica se caracteriza por un aumento del tamaño de los cardiomiocitos, acompañado por una pérdida de estructura de los sarcómeros, un aumento de la síntesis proteica y de la re-expresión de genes fetales (Harvey and Leinwand, 2011). La inducción de la autofagia en respuesta a estrés puede limitar el daño cardíaco producido en diversas condiciones patológicas. La autofagia es un proceso que en estado basal mantiene la estructura cardíaca y su función mediante la eliminación de componentes del citoplasma, proteínas u orgánulos dañados o defectuosos (Li et al., 2016; Nakai et al., 2007).

Los defectos en la vía autofágica provocan hipertrofia cardíaca, induciendo un aumento del tamaño de los cardiomiocitos, promoviendo la activación del programa génico fetal y reduciendo la viabilidad de las células (Wang et al., 2012). Varios estudios en modelos animales de diversas formas de cardiomiopatía encontraron defectos en la vía autofágica (Zech et al., 2019).

La hipertrofia cardíaca que se produce de manera espontánea con el envejecimiento está asociada con la disminución de la autofagia basal a medida que aumenta la edad (Boengler et al., 2009; Shirakabe et al., 2016). Los ratones *knockout* condicionales de Atg5 en corazón desarrollan disfunción contráctil tan solo una semana después de la eliminación de Atg5 y desarrollan un patrón de hipertrofia y disfunción similar al asociado con el envejecimiento (Nakai et al., 2007; Taneike et al., 2010). La supresión de Atg7 tiene efectos parecidos (Pattison et al., 2011). En fibroblastos cardíacos de ratas

adultas, la activación de la autofagia contribuye a la degradación del colágeno y reduce la fibrosis cardíaca (Nishida and Otsu, 2016).

Sin embargo, el papel de la autofagia en relación con la hipertrofia es más complejo. Varios estímulos que inducen el desarrollo de la hipertrofia cardíaca también activan la autofagia en el corazón (Li et al., 2016). Por ejemplo, los cardiomiocitos primarios de rata en cultivo activan la autofagia en respuesta al estrés mecánico (Lin et al., 2014). Otros estímulos extracelulares, como los factores hormonales, la falta de glucosa o aminoácidos, o algunos fármacos, afectan también a la respuesta autofágica (Galluzzi et al., 2014). En pacientes con cardiomiopatía hipertrófica se observa una acumulación de autofagosomas, acompañada de un aumento en los niveles de LC3-II y Beclin-1 (Song et al., 2014).

En condiciones de isquemia con reperfusión, una activación temprana de la autofagia durante la isquemia tiene un papel protector proporcionando sustratos para la regeneración, mientras que la activación prolongada resulta perjudicial y provoca la muerte de los cardiomiocitos (Matsui et al., 2007; Zhai et al., 2011). De manera similar, la activación de la autofagia es una respuesta adaptativa frente a la hipertrofia causada por un aumento de presión, eliminando proteínas mal plegadas y reduciendo la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (Nakai et al., 2007; Xu et al., 2014). Sin embargo, una activación excesiva puede agravar esta situación de estrés (Zhu et al., 2007). En el modelo de hipertrofia inducida por la constricción de la aorta transversa en ratón, el grado de actividad autofágica correlaciona con el grado de hipertrofia del ventrículo izquierdo (Zhu et al., 2007). En la transición de hipertrofia a insuficiencia cardíaca en humanos se observa una acumulación de autofagosomas en los cardiomiocitos hipertrofiados. Se considera que la activación de la autofagia en estas condiciones contribuye a la pérdida de células cardíacas y a la progresión hacia la insuficiencia cardíaca (Fidziańska et al., 2010).

Por tanto, la activación de la autofagia se considera en principio una respuesta adaptativa frente a la hipertrofia cardíaca, pero una activación excesiva o sostenida durante mucho tiempo puede tener efectos perjudiciales y facilitar la progresión hacia fallo cardíaco (Li et al., 2016; Wang et al., 2012). El papel de la autofagia vendrá determinado por el grado de evolución de la hipertrofia y su severidad.

Es necesario tener en cuenta que la autofagia puede ser también un proceso altamente selectivo. En el caso de la hipertrofia cardíaca, la autofagia selectiva podría tener más relevancia que la activación de la autofagia en general. Algunos de los principales tipos de autofagia selectiva más estudiados en corazón son los siguientes:

- Mitofagia. El corazón es uno de los tejidos con mayor densidad de mitocondrias, debido a su gran demanda energética. Teniendo en cuenta el bajo grado de recambio de los cardiomiocitos, es necesaria la eliminación eficaz de las mitocondrias disfuncionales. Los niveles elevados de ROS (estrés oxidativo), los niveles bajos de ATP o los daños en la membrana o el ADN mitocondrial inducen la mitofagia en el corazón. En las mitocondrias sanas, la proteína PINK1 (cinasa inducida por PTEN 1), que se encuentra asociada a la membrana externa mitocondrial, se degrada rápidamente. En cambio, en las mitocondrias dañadas o con diferente potencial de membrana, PINK1 permanece unida a la membrana externa, se activa por auto-fosforilación y recluta a la proteína de tipo ubiquitina ligasa E3 Parkin (Ordureau et al., 2015). Parkin facilita el reconocimiento de las mitocondrias dañadas para su posterior incorporación a los autofagosomas por parte de proteínas adaptadoras, como por ejemplo BNIP3 (proteína de interacción con Bcl2 de 19kDa 3) y LC3-II (Delbridge et al., 2017; Jimenez et al., 2014).
- Glicofagia. La degradación selectiva del glicógeno es particularmente importante para proporcionar energía y mantener la homeostasis de las células cardíacas en condiciones de estrés o en la diabetes. La glicofagia es capaz de proporcionar grandes cantidades de glucosa a la célula más rápidamente que la degradación convencional del glicógeno. La proteína STBD1 (proteína con dominio de unión a almidón 1) contiene un dominio de unión a carbohidratos que facilita la captación del glicógeno por parte de los autofagosomas para su degradación (Delbridge et al., 2017). Esta vía se encuentra regulada por mTOR y Akt.
- Lipofagia. Históricamente, se consideraba que la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la lipasa adipocitaria de triglicéridos (ATGL) era el principal mecanismo de degradación de los lípidos almacenados en las gotas lipídicas del citoplasma (Schulze et al., 2017). Sin embargo, la autofagia contribuye también a

la degradación de estas gotas lipídicas mediante el proceso denominado lipofagia (Liu and Czaja, 2013; Singh et al., 2009), que implica la formación de autofagosomas y la inclusión parcial o total de las gotas lipídicas para su degradación por la vía autofágica clásica. Las proteínas presentes en la superficie de las gotas lipídicas, como las de la familia de las perilipinas, juegan un papel relevante a la hora de identificar e integrar las gotas lipídicas en los autofagosomas (Kimmel and Sztalryd, 2016). A nivel celular, la desregulación de la lipofagia es clave para procesos como la acumulación excesiva de lípidos que se da durante la obesidad y otras alteraciones metabólicas (Schulze et al., 2017).

Autofagia y patologías cardíacas asociadas con la obesidad

El exceso de peso es un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares, incluso en ausencia de otros factores de riesgo (James et al., 2004; Rabar et al., 2014). La obesidad provoca un aumento en el volumen de sangre del cuerpo, que resulta en una mayor entrada en el ventrículo izquierdo y un aumento del gasto cardíaco, provocando la hipertrofia de ambos ventrículos y de la aurícula izquierda (Csige et al., 2018; Jeckel et al., 2011).

En general, en condiciones obesogénicas el flujo autofágico se encuentra interrumpido, lo cual puede provocar daño celular en numerosos tejidos, incluyendo el corazón. Este bloqueo es debido a defectos en la fusión con los lisosomas o en la posterior degradación de los autofagolisosomas, pero no afecta a la formación de los autofagosomas (Castañeda et al., 2019).

La alimentación con una dieta rica en grasas (HF) durante periodos largos de tiempo para inducir obesidad experimentalmente induce también hipertrofia y disfunción cardíaca en modelos animales. Respecto a la actividad autofágica en corazón, parece ser que en tratamientos cortos se induce la autofagia, mientras que tras dietas HF prolongadas se observa una acumulación de autofagosomas y niveles elevados de las proteínas Atg7, Beclin-1 y p62 (Hsu et al., 2016), indicando un bloqueo de la vía autofágica en el corazón.

El estudio mediante microscopía electrónica de la estructura cardíaca de ratones alimentados con dieta HF durante 42 semanas reveló una acumulación de gotas lipídicas y de autofagosomas en los cardiomiocitos, indicando que la velocidad de formación de los autofagosomas era normal o incluso algo más alta en estos animales, pero que su degradación y por tanto el flujo autofágico se encontraba interrumpido por la dieta HF (Castañeda et al., 2019; Che et al., 2018).

Respecto al papel de la autofagia en el desarrollo de la cardiomiopatía asociada a la diabetes, existe cierta controversia. La cardiomiopatía diabética se caracteriza por el desarrollo de fibrosis en el miocardio y disfunción diastólica, y aparece en pacientes diabéticos que no sufren hipertensión ni enfermedad de la arteria coronaria (Tate et al., 2017). La diabetes provoca alteraciones metabólicas en el corazón. Una menor captación de glucosa hace que los cardiomiocitos sean más dependientes de la oxidación de ácidos grasos. Esto, junto con una acumulación de glicógeno y de gotas lipídicas, conduce a un mayor estrés oxidativo en las células, causando un bloqueo del flujo autofágico (Varma et al., 2018).

Sin embargo, en los ratones db/db, utilizados como modelo animal de diabetes tipo 2, se han hallado resultados contradictorios respecto a la actividad autofágica en corazón. Un estudio encontró niveles elevados de las proteínas LC3-II y p62, junto con una reducción de la actividad de AMPK, sugiriendo un bloqueo del flujo autofágico. Mediante microscopía electrónica se detectó una acumulación de autofagosomas, pero la ausencia de autofagolisosomas maduros y la escasez de lisosomas corroboran los resultados que apuntan a un bloqueo de la autofagia (Kanamori et al., 2015). Otros estudios encontraron un aumento de los niveles de proteína de LC3-II, Beclin-1 y una reducción de p62, y además confirmaron el aumento del flujo autofágico (Chen et al., 2017; Munasinghe et al., 2016). Algunos datos obtenidos en pacientes también respaldan la activación de la autofagia en el caso de la cardiomiopatía diabética (Munasinghe et al., 2016).

Respecto a los efectos de fármacos moduladores de la autofagia en la incidencia de la cardiomiopatía diabética, los datos actuales también son inconsistentes, pero la activación de la autofagia parece tener efectos beneficiosos en el caso de la diabetes de tipo 2. La inhibición de la autofagia mediante cloroquina en los ratones db/db empeoró

la función cardíaca y la fibrosis, reduciendo los niveles de LC3-II y aumentando los de p62 y la actividad de mTORC1 (Kanamori et al., 2015). En cambio, la activación de la autofagia mediante el tratamiento con resveratrol mejoró la función cardíaca y redujo la fibrosis, disminuyendo la acumulación de p62 y la señalización de mTORC1.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis fue el estudio de la función de dos nuevas cardiocinas, FGF21 y Metrnl, durante el desarrollo de la patología cardíaca. Se dividió en los siguientes apartados:

Parte 1

Caracterización del papel de la proteína FGF21 en corazón en un contexto de obesidad, utilizando como modelo ratones deficientes en esta proteína sometidos a una dieta rica en grasas.

Estudio de los mecanismos mediante los cuales FGF21 lleva a cabo su función cardioprotectora en estas condiciones.

Parte 2

Caracterización de la proteína Metrnl como nueva cardiocina y potencial biomarcador de patología cardíaca.

Estudio de las funciones de esta proteína en corazón en un contexto de hipertrofia cardíaca, utilizando como modelo ratones deficientes en Metrnl y la recuperación de la expresión cardíaca de Metrnl mediante vectores adeno-asociados y estudios *in vitro* utilizando el modelo de cardiomiocitos neonatales en cultivo.

Materiales y métodos

Estudios en animales y cultivos celulares

Modelos animales

Colonia Fgf21 -/-

Los ratones deficientes en el gen Fgf21 (a partir de aquí Fgf21^{-/-}) (B6N; 129S5-Fgf21^{tm1Lex}/Mmcd) fueron obtenidos del *Mutant Mouse Regional Resource Center*, un repositorio de cepas de ratón financiado por NCRN-NIH, y fueron donados al MMRRC por Genentech, Inc.

Los grupos de ratones machos *wild-type* (wt) y Fgf21^{-/-} de dos meses de edad fueron alimentados con una dieta estándar (*Chow Diet*) (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan) o una dieta rica en grasas (*High Fat*, HF) de la cual el 45% de las calorías provienen de grasas (Research Diets; D12451) durante 16 semanas. Los ratones se mantuvieron en ayuno durante la noche previa a su sacrificio.

Colonia PPAR α -/-

Los ratones deficientes en el gen Ppara (Ppara^{-/-}) (B6.129S4- Ppara^{tm1Gonz}/J) fueron obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EEUU). Se utilizaron ratones machos *wild-type* y Ppara^{-/-} de la misma edad para los experimentos.

Colonia Metrnl -/-

Los ratones deficientes en el gen Metrnl (Metrnl^{-/-}) (C57BL/6NTac-Metrnl^{tm1a(KOMP)Wtsi}/WtsiH ; EM: 07966) fueron obtenidos del *Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project* (Sanger MGP). Se utilizaron ratones machos *wild-type* y Metrnl^{-/-} de la misma edad para los experimentos.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la directiva 86/609/CEE del Consejo de la Comunidad Europea y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad de Barcelona.

Intervenciones en animales

Inducción de hipertrofia cardíaca

Para la inducción de un modelo patológico de hipertrofia cardíaca *in vivo* se utilizaron ratones machos de tres meses de edad, *wild-type* o *Metrnl*^{-/-}. Los animales se anestesiaron con un 1,5% de isoflurano. A continuación, se implantaron quirúrgicamente minibombas osmóticas (Alzet; 1007D) por vía subcutánea en la región interescapular del ratón. Las minibombas contenían un tampón salino (PBS) o isoproterenol (ISO) (Sigma; I6504) y estaban ajustadas para liberar el fármaco a una velocidad de 15 mg por kg y por día durante 7 días. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la operación.

Para la inducción de hipertrofia cardíaca mediante la constricción de la aorta transversa (TAC), los ratones se anestesiaron con un 1,5% de isoflurano. Tras abrir el tórax, se realizó la ligación de la aorta transversa entre la aorta braquiocefálica y la arteria carótida común izquierda, utilizando un hilo de sutura de seda de calibre 6-0. Los ratones fueron sacrificados 28 días después de la operación.

Para la inducción de hipertrofia cardíaca en ratones de 6 días de edad, los animales *wild-type* o *Ppara*^{-/-} fueron inyectados con isoproterenol (ISO) por vía intraperitoneal (ip), con una dosis de 15 mg por kg y por día durante 7 días. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la operación.

Inducción de hipertensión

Para la inducción de hipertensión, los ratones *wild-type* se anestesiaron con un 1,5% de isoflurano. A continuación, se implantaron quirúrgicamente las minibombas osmóticas (Alzet; 1007D) por vía subcutánea en la región interescapular del ratón. Las minibombas contenían un tampón salino (PBS) o angiotensina II (AngII) (Sigma; A6402), y estaban ajustadas para liberar el fármaco a una velocidad de 1 mg por Kg y por día durante 7 días.

Vectores víricos adeno-asociados (AAV)

Los vectores víricos adeno-asociados utilizados en este estudio (AAV9-CMV-Null como control, AAV9-CMV-GFP y AAV9-CMV-Metrnl) fueron generados por el

CBATEG (Barcelona) utilizando un procedimiento de co-transfección dual-triple de plásmido, seguido por una precipitación con polietilenglicol (PEG) y una posterior purificación por centrifugación en gradiente de CsCl₂. La administración se realizó por vía intraperitoneal (ip) en animales de 7 días de edad con una dosis de 1×10^{13} partículas de genoma vírico por ratón. Los experimentos se realizaron con estos mismos animales a los 3 meses de edad.

Medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca

La presión arterial de los ratones se midió mediante la colocación de un manguito en la cola con el sistema BP2000 (Visitech Systems). Los ratones se entrenaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante durante 5 días antes de la implantación de las minibombas osmóticas, para evitar la alteración de los resultados debida al estrés. Se hizo el promedio de diez mediciones consecutivas para calcular la presión arterial sistólica, diastólica y media y la frecuencia cardíaca durante el período de 7 días posterior a la implantación de la minibomba.

Ecocardiografías

Los ratones *wild-type*, *Metrnl*^{-/-} o *Fgf21*^{-/-} fueron anestesiados con isoflurano al 1,5%. Las medidas de las dimensiones cardíacas se obtuvieron a partir de ecocardiografías realizadas utilizando el equipo VividQ (GE Healthcare) con una sonda lineal de 12 MHz. Las mediciones se realizaron en modo M y Doppler. Se midieron tres ciclos cardíacos diferentes para cada evaluación y se obtuvieron los valores promedio. Los análisis de las imágenes ecocardiográficas fueron realizados por dos observadores diferentes, que desconocían a qué grupo experimental pertenecían los animales.

Se obtuvieron las medidas correspondientes al grosor del septo interventricular (IVS), la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) y el diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID), después de sístole y después de diástole. Se calculó la fracción de eyección (EF), la fracción de acortamiento (FS), la frecuencia cardíaca (HR), el volumen del ventrículo izquierdo después de diástole (EDV) y de sístole (ESV), la relación entre el grosor de la pared y el radio del ventrículo (H/R), el índice de esfericidad del corazón (SI) y la masa del ventrículo izquierdo (LVm).

Análisis histológicos e inmunohistoquímicas

Tras extraer el corazón del animal, se eliminaron las aurículas con un bisturí y se seccionó transversalmente a media altura. La mitad superior se fijó en formalina tamponada neutra al 4%. Al cabo de 24 horas, se cambió la formalina por una solución nueva y se fijó durante 24 horas adicionales. Las muestras se conservaron en etanol al 70% hasta el momento de realizar la inclusión con parafina. Las secciones se hicieron en un micrótomato rotativo para bloques de parafina y posteriormente fueron desparafinadas y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar el área de la sección transversal del eje corto de los cardiomiocitos (CSA) en el ventrículo izquierdo (LV) o en el septo interventricular (S), utilizando el software de código abierto ImageJ.

La fibrosis se evaluó utilizando la tinción tricrómica de Masson (Panreac). Las regiones afectadas por la fibrosis (en azul) se midieron utilizando el software de código abierto ImageJ, calculando el porcentaje del área fibrótica respecto al área total de cada imagen.

Para la detección de los macrófagos infiltrados en el tejido mediante inmunohistoquímica, las secciones de corazón previamente incluidas en parafina se incubaron con un anticuerpo primario contra F4/F80 (Abcam; ab6640). Para la detección, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra contra IgG de rata conjugado con Alexa Fluor® 488. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61).

La acumulación de lípidos en el corazón se evaluó mediante la tinción con Oil Red O (ORO). En este caso, las criosecciones del tejido congeladas en OCT fueron incubadas con ORO durante 10 minutos y se analizaron cuantitativamente utilizando el software de código libre ImageJ.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras de tejido cardíaco se fijaron con un 2,5% de glutaraldehído y un 2% de paraformaldehído en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, se fijaron en tetraóxido de osmio al 1% y FeCNK al 0,8% en tampón fosfato. Tras la deshidratación en una serie de soluciones de acetona, las muestras de tejido se embebieron con resina Spurr. Las secciones ultrafinas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 (Izasa Scientific).

Cultivo primario de cardiomiocitos

Cultivo de cardiomiocitos de rata

Para el aislamiento y cultivo de cardiomiocitos se utilizaron ratas Sprague-Dawley neonatas (de entre 1 y 2 días de edad). Los animales fueron decapitados para extraer los corazones, que a continuación se digirieron en una solución de colagenasa tipo I (Life Technologies; 17018-029) y pancreatina (Sigma; P3292), realizando 5 digestiones consecutivas del tejido y recogiendo las células aisladas en suero bovino neonatal inactivado (NCS). A continuación, las células obtenidas se resuspendieron en el medio de siembra (Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM] suplementado con 10% de suero de caballo, 5% de suero bovino neonatal y 50mg/l de gentamicina) y se incubaron durante una hora en un frasco de cultivo con recubrimiento de plástico, con el objetivo de separar los cardiomiocitos (que no se adhieren al plástico) de los fibroblastos cardíacos (que sí lo hacen).

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 6 pozos recubiertas con gelatina al 1% con una densidad de $0,5 \times 10^6$ células por pozo. El cultivo se mantuvo durante la noche siguiente con el medio de siembra (Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM] suplementado con 10% de suero de caballo, 5% de suero bovino neonatal, 50mg/l de gentamicina, y $10 \mu\text{M}$ de citosina β -D-arabinofuranósido [AraC]). El AraC estuvo presente durante todo el cultivo celular de cardiomiocitos para suprimir el crecimiento de los fibroblastos restantes después de la separación.

16 horas después del aislamiento de las células, la población restante, predominantemente cardiomiocitos neonatales (NCM), se incubó en un medio sin suero, consistente en DMEM y gentamicina (50 mg/l) como único sustrato durante 24 horas. La infección con adenovirus se realizó en presencia del medio sin suero. Posteriormente, el medio se reemplazó por un medio experimental consistente en medio DMEM sin suero, suplementado con L-carnitina 0,25 mM, insulina 0,25 mU/ml y albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (Sigma; A6003), en el que se realizaron los distintos tratamientos.

Los cardiomiocitos en cultivo se recogieron en un máximo de 5 días después del aislamiento, utilizando el reactivo de Tripure (Roche; 11667165001) para la extracción de ARN o tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa para la extracción de proteínas para Western blot.

Cultivo de fibroblastos cardiacos de rata

Los fibroblastos cardíacos neonatales de rata (CF) fueron aislados y separados de los cardiomiocitos tal como se ha descrito anteriormente. Las células de pase 1 (P1) y pase 3 (P3) se sembraron en placas de cultivo con una densidad de $0,3 \times 10^5$ células por cm^2 , utilizando el mismo medio DMEM pero suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (FBS) y gentamicina (50 mg/l).

Los fibroblastos cardíacos se tripsinizaron una vez para obtener las células de pase 1 (p1 o control) y 2 veces más durante los días siguientes para obtener las células de pase 3 (p3 o miofibroblastos). 24 horas antes de añadir los tratamientos correspondientes a las células, se sustituyó el medio de cultivo por otro con un 0,1% de FBS.

Cultivo de cardiomiocitos de ratón

Los cardiomiocitos de ratón (mNCM) se obtuvieron a partir de ratones *wild-type* o *Fgf21* $-/-$. El procedimiento experimental para obtener y cultivar cardiomiocitos de ratón fue básicamente el mismo que para los de rata, pero la colagenasa utilizada fue de tipo II (Worthington; L5004176), y en lugar de suero bovino neonatal se utilizó suero de ternera fetal (FBS).

Tratamiento de las células cardíacas en cultivo

Para la inducción de la hipertrofia, los cardiomiocitos de rata se estimularon con el agonista α_1 adrenérgico fenilefrina (PE) (10 μM) (Sigma; P6126), un factor de crecimiento hipertrófico, durante 24 horas. En el caso de los cardiomiocitos de ratón se utilizó angiotensina II (50 μM) (Sigma; A6402).

Donde se indica, las células se estimularon durante 24 horas con FGF21 recombinante (50 nM) (Biovendor; RD272108100), ácido oleico (0,4 mM) (Sigma; O1257) o la combinación de ácido oleico (0,2 mM) y ácido palmítico (0,2 mM) (Sigma; P0500), ambos conjugados con BSA al 1%. Se añadió cloroquina (50 μM) (Sigma; C6628) a las células 8 horas antes de la recolección. El tratamiento con el antagonista de PPAR α GW6471 (1 μM) (Sigma; G5045) o Metrnl recombinante (R&D; 6679-MN) a las concentraciones indicadas se realizó durante 24 horas antes del tratamiento con PE. Los anticuerpos contra IgG (Sigma; AP147P) o Metrnl (Origene; TA334847) se añadieron al medio en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ después de los pre-tratamientos de 24 horas.

Ninguno de los tratamientos indujo una pérdida celular significativa en las concentraciones utilizadas.

Transducción génica mediante adenovirus (Ad)

Se construyeron adenovirus recombinantes que contienen ADNc murino de Metrnl o de PPAR α (Ad5-CMV-Metrnl y Ad5-CMV-PPAR α ; CBATEG, Barcelona). Las células se infectaron con vectores adenovirales de Metrnl o PPAR α y con un vector nulo Ad5-CMV-Null como control, a 10 IFU por célula durante 24 horas en el medio sin suero indicado anteriormente.

Medición de la oxidación de ácidos grasos

Se midió la oxidación de ácido oleico [C^{14}] en homogenados de corazón recién aislados. El tejido se homogenizó en un tampón de sacarosa/Tris/EDTA y se incubó durante 60 minutos en una mezcla de reacción (pH 8,0) que contenía ácido oleico [$1\text{-}^{14}\text{C}$]. Tras la incubación, se midió la cantidad de CO_2 emitido.

Determinación de la actividad de la aconitasa y el complejo IV

La actividad de la aconitasa se midió utilizando un kit de ensayo colorimétrico (Cayman; 705502). Se obtuvieron extractos de proteína de corazones de ratones adultos *wild-type* y *Fgf21 -/-* siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit. La actividad del complejo IV se midió utilizando el Complex IV Activity Microplate Assay Kit (Mitosciences; ab109911) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de malondialdehído (MDA)

El malondialdehído es un producto secundario obtenido a causa de la peroxidación de lípidos, como consecuencia de un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este indicador de los niveles de estrés oxidativo se puede detectar mediante el ensayo TBARS, puesto que reacciona con el ácido tiobarbitúrico, provocando cambios cuantificables en la absorbancia de la muestra.

El tejido cardíaco se homogenizó sobre hielo en una proporción de 100 mg de tejido por cada ml de PBS. A continuación, se mezclaron 50 µl de tejido homogenizado o de los distintos puntos de la recta patrón realizada con (1,1,3,3)-tetraetoxipropano con 280 ml del reactivo de TCA-TBA-HCl y se incubaron las muestras 10 minutos a 100°C. La reacción se paró añadiendo 100 µl de ácido acético glacial y 200 µl de cloroformo. Tras centrifugar las muestras a 1000 rpm durante 10 minutos, se midió la absorbancia a 530 nm del sobrenadante para determinar la concentración de MDA.

Extracción de proteínas y Western blotting

Los lisados de tejido se obtuvieron homogenizando los corazones de ratón en tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las células en cultivo se recogieron en tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, rascando las placas sobre hielo.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) en geles al 10% y se transfirieron a membranas

Immobilon-P (Millipore).

La detección de proteínas mediante Western blot se realizó utilizando anticuerpos contra Parkin (Cell Signaling; 2132), p62 (Cell Signaling; 5114), LC3BI/II (Cell Signaling; 2775), ERK (Cell Signaling; 4695) y p-ERK (Cell Signaling; 4370), p38 MAPK (Cell Signaling; 9212) y p-p38 MAPK (Cell Signaling; 9211), CREB (Cell Signaling; 9104) y p-CREB (Cell Signaling; 9191), β -klotho (Abcam; ab76356), la proteína desacopladora 3 (UCP3) (Chemicon; AB3046), α -SMA (Sigma; A5228) y PGC1 α (Santa Cruz; SC-13067). Como control de carga se utilizó la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Sigma; G9545) o la proteína total teñida sobre la membrana con reactivo de Ponceau (PS).

Aislamiento de ARN y RT-qPCR

El ARN total se extrajo utilizando el reactivo de Tripure (Roche; 11667165001) en el caso del corazón y el músculo esquelético, y un kit de extracción en columnas para los tejidos no musculares (Macherey-Nagel; 740955250). El ADNc se sintetizó a partir de 0,5 μ g de ARN total mediante transcripción inversa (RT), utilizando el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems; 4387406) en un volumen de reacción total de 20 μ l. La Real-Time-PCR cuantitativa se realizó por duplicado para mayor precisión, utilizando los ensayos de expresión génica Taqman (Termo Fisher). Cada mezcla de reacción, en un volumen total de 25 μ l, contenía 1 μ l de ADNc, 12,5 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (Invitrogen; 2060531), sondas en una concentración final de 250 nM y *primers* en una concentración final de 900 nM de Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems).

Cada muestra se analizó por duplicado y se usó el valor medio de ambos ensayos para calcular la expresión del ARNm del gen de interés y del gen de referencia o *housekeeping* (ciclofilina A, PPIA). Los niveles de ARNm del gen de interés en cada muestra se normalizados respecto a los del gen de referencia utilizando el método comparativo ($2^{-\Delta CT}$) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de metabolitos en plasma y fosforilación de proteínas

Los niveles de glucosa y triglicéridos se midieron utilizando el sistema de Accutrend Technology (Roche). Los niveles de la proteína Metrnl en plasma y en medios de cultivo se detectaron utilizando un kit de ELISA para Metrnl (R&D; DY6679).

La fosforilación de proteínas en cultivos primarios de cardiomiocitos se evaluó utilizando el kit Milliplex MAP 9-plex Multi-Pathway Signaling Magnetic Bead para proteína total (Merck-Millipore; 48-680MAG) y fosforilada (Merck-Millipore; 48-681MAG), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Estadística

En los experimentos *in vivo* se usaron al menos cinco ratones por grupo. Para los estudios *in vitro*, cada experimento se realizó por triplicado utilizando al menos dos aislamientos de cardiomiocitos independientes. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student o el análisis de varianza one-way ANOVA seguido de los tests post-hoc de Bonferroni o Dunnet, según corresponda. Se realizó también la prueba post-hoc de Tuckey para comprobar la homogeneidad de las varianzas.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Un valor de *P* inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Estudios en humanos

Biopsias cardíacas

Los corazones de donantes menores de 70 años con muerte cerebral de origen cerebrovascular o traumático son evaluados de forma rutinaria para detectar un posible trasplante en la unidad de trasplantes del Hospital Clínic de Barcelona.

De las muestras obtenidas, 9 corazones se obtuvieron de individuos sanos normotensos (controles) y 28 corazones se obtuvieron de donantes con un historial largo de hipertensión que no fueron elegibles para trasplante por falta de un receptor compatible. De estos 28 corazones, 18 mostraban criterios clínicos y ecosonográficos de cardiomiopatía dilatada, definida como la presencia de una fracción de eyección del ventrículo izquierdo inferior al 50% e hipertrofia del ventrículo izquierdo. La hipertensión se definió como valores de presión arterial sistólica de al menos 140 mmHg y/o presión arterial diastólica de al menos 90 mmHg. También se obtuvieron 4 corazones isquémicos con cardiomiopatía, 3 corazones con cardiomiopatía valvular y 2 corazones con cardiomiopatía idiopática.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínic (Barcelona; ref HCB/2015/0233), y se obtuvo el consentimiento informado de las familias de los donantes conforme al uso de tejido de miocardio para esta investigación antes de iniciar el estudio. Todos los procedimientos del estudio se ajustaron a los estándares éticos descritos en la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983.

Análisis histológicos

La expresión de Metrnl en el miocardio se analizó mediante la inmunodetección con un anticuerpo anti-Metrnl (Abcam; ab121775). Se evaluaron seis áreas de cada muestra, con un total de entre 200-600 células cuantificadas por campo (≥ 1200 células/muestra). La expresión de Metrnl se calculó en función de la proporción de cardiomiocitos teñidos positivamente respecto a cardiomiocitos no teñidos. Los análisis inmunohistoquímicos fueron realizados por dos evaluadores independientes.

Muestras de plasma

Población de estudio

Desde mayo de 2009 hasta abril de 2014, los pacientes ambulatorios con insuficiencia cardíaca tratados en el Hospital Germans Trias y Pujol (Badalona) se incluyeron consecutivamente en el estudio. Todos los análisis de biomarcadores se realizaron sobre la misma muestra de sangre, que se almacenó a -80°C sin ciclos previos de congelación y descongelación.

Todas las muestras fueron obtenidas entre las 9:00 am y las 12:00 pm. Los participantes dieron su consentimiento informado por escrito y el comité de ética local aprobó el estudio. Todos los procedimientos del estudio se ajustaron a los estándares éticos descritos en la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983.

Seguimiento y resultados

Todos los pacientes realizaron visitas de seguimiento a intervalos regulares y predefinidos. En casos de descompensación, los pacientes realizaron visitas adicionales cuando fue necesario. El horario regular de visitas incluía un mínimo de visitas trimestrales con enfermeros, visitas bianuales con médicos y visitas electivas con geriatras, psiquiatras y médicos de rehabilitación.

El punto final primario del estudio fue el fallecimiento por cualquier causa. También se evaluó la muerte por causa cardiovascular. Un fallecimiento se consideró de origen cardiovascular cuando fue causada por fallo cardíaco (fallo cardíaco descompensado o fallo cardíaco resistente al tratamiento, en ausencia de otra causa); muerte súbita (muerte inesperada, atestiguada o no, de un paciente previamente estable sin evidencia de empeoramiento de la insuficiencia cardíaca o cualquier otra causa de muerte); infarto agudo de miocardio (debido a complicaciones mecánicas, hemodinámicas o arrítmicas); accidente cerebrovascular (en asociación con déficits neurológicos agudos recientes); una muerte procedimental (después de procedimientos cardiovasculares de diagnóstico o terapéuticos); y otras causas cardiovasculares (por ejemplo, la ruptura de un aneurisma, isquemia periférica o disección aórtica). Los eventos fatales se identificaron a partir de registros clínicos en papel y electrónicos, a partir de entrevistas

con médicos generales y al contactar a los familiares de los pacientes. Los datos se verificaron mediante la comparación con los registros almacenados en las bases de datos de los sistemas de salud catalanes y españoles. El seguimiento se cerró el 30 de septiembre de 2017.

Estadística

Para el análisis estadístico de los resultados de las histologías se utilizó el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney, incluido en el programa GraphPad Prism (versión 6.01).

Para el análisis multivariable de supervivencia (regresión de Cox) de los pacientes con insuficiencia cardíaca, los cálculos estadísticos se realizaron siguiendo el método Fine&Gray de R essentials para SPSS, utilizando el paquete de R “cmprsk” de Bob Gray. El paquete “cmprsk” fue construido bajo la versión de R 3.2.5.

Resultados

Parte 1: Estudios acerca de FGF21

Inducción de FGF21 y represión de KLB en tejido cardíaco tras 16 semanas de dieta rica en grasas

Con el objetivo de determinar el papel de FGF21 en corazón en condiciones obesogénicas, ratones *wild type* (wt) o deficientes en FGF21 (Fgf21^{-/-}) fueron alimentados con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. Previamente se había descrito que en estas condiciones aumentan los niveles plasmáticos de FGF21 (Dutchak et al., 2012; Fisher et al., 2010). En concordancia con estos resultados previos, en nuestras condiciones experimentales los niveles plasmáticos de FGF21 aumentaron significativamente en los ratones wt (Fig 9A).

A continuación, se midieron los niveles de expresión de Fgf21 y Fgfr1 (que codifica para el receptor de FGF21 de tipo 1) en los corazones de estos animales. Se encontró un aumento significativo de los niveles de ARNm de FGF21 en corazón en los ratones alimentados con HF. Los niveles de ARNm del receptor Fgfr1 no se vieron alterados por la dieta (Fig 9B).

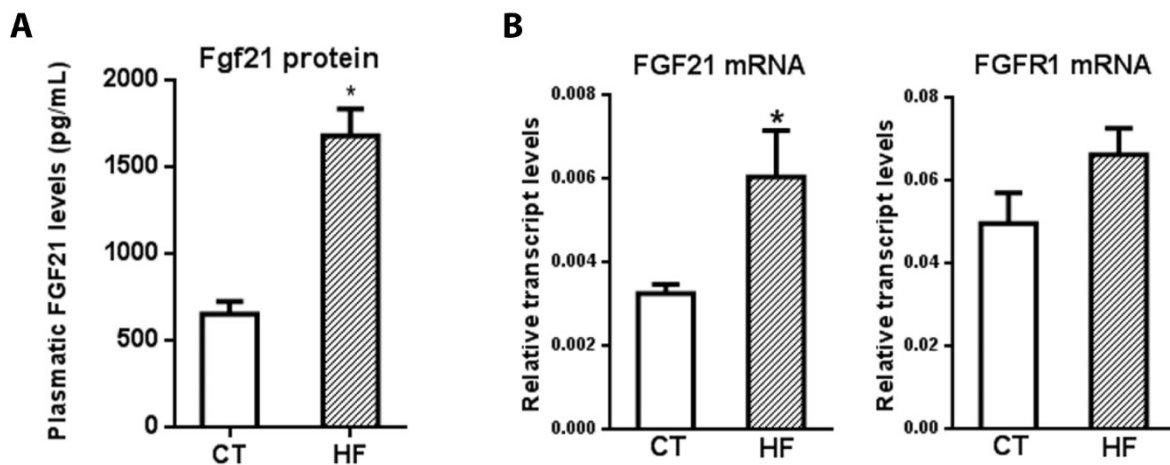


Figura 9. Sistema cardíaco de FGF21 y su receptor durante la obesidad. Ratones *wild-type* (wt) adultos se alimentaron con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. (A) Niveles plasmáticos de FGF21 y (B) niveles de expresión en corazón del ARNm de Fgf21 y Fgfr1. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con t-test (* $p < 0,05$ comparado con grupo control).

Respecto a la expresión de Klb, que codifica para el co-receptor β -klotho (requerido para las acciones de FGF21), la dieta HF provocó una reducción tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína (Fig 10). Este último resultado sugiere cierto grado de resistencia cardíaca a FGF21, similar a la que se da en los tejidos adiposos durante la obesidad (Díaz-Delfín et al., 2012; Fisher et al., 2010).

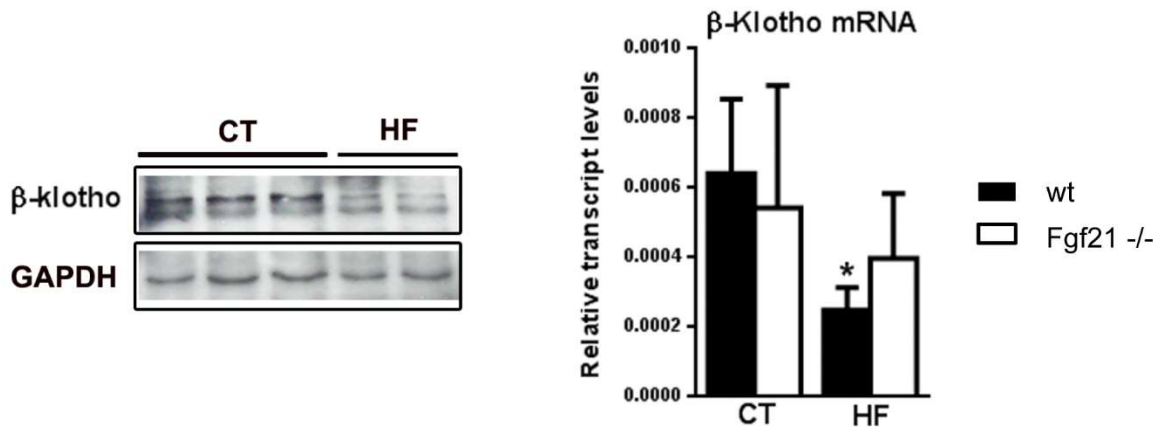


Figura 10. Niveles cardíacos del co-receptor de FGF21 durante la obesidad. Inmunoblot representativo de los niveles de proteína del co-receptor β -klotho en corazón utilizando GAPDH como control de carga y niveles de expresión en corazón del ARNm de β -klotho en ratones wt (barras negras) y Fgf21^{-/-} (barras blancas), alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente).

A continuación, se estudiaron los efectos directos de los ácidos grasos sobre los cardiomiocitos usando el modelo *in vitro* de cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatales (NCMs). El tratamiento de los NCMs con oleato o con una combinación de oleato y palmitato durante 24 horas provocó un fuerte aumento en los niveles de ARNm de Fgf21, pero no afectó a la expresión del co-receptor β -klotho (Fig 11).

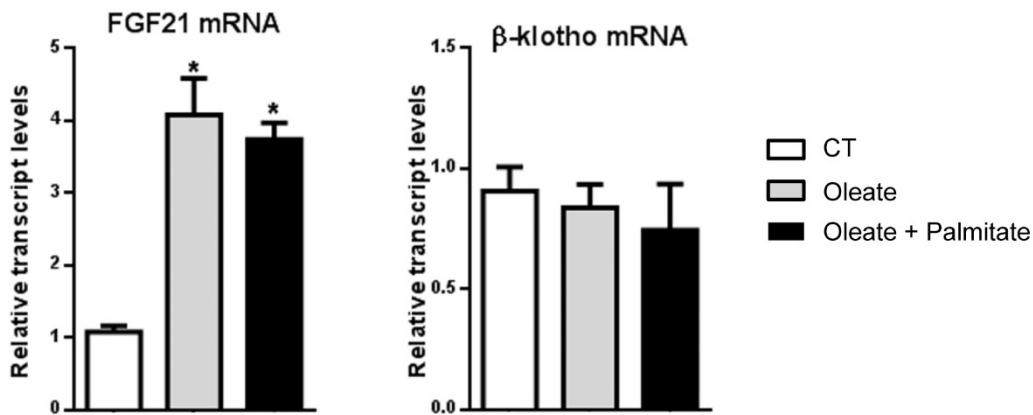


Figura 11. Niveles de expresión de ARNm de *Fgf21* y β -klotho en NCMs tras el tratamiento con oleato (0,4mM) o la combinación de oleato (0,2mM) y palmitato (0,2mM) durante 24 horas. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con t-test (* p <0,05 comparado con grupo control correspondiente).

En resumen, la alimentación con una dieta rica en grasas o el tratamiento de cultivos primarios con ácidos grasos provoca un aumento en los niveles de expresión de *Fgf21* en las células cardíacas.

Los ratones *Fgf21*^{-/-} desarrollan hipertrofia cardíaca tras 16 semanas de dieta rica en grasas

Para analizar el impacto del aumento de los niveles sistémicos y cardíacos de FGF21 inducidos por una dieta obesogénica, los ratones *Fgf21*^{-/-} fueron sometidos a este mismo régimen en las mismas condiciones que los ratones wt. En primer lugar, se analizaron las alteraciones sistémicas y las consecuencias a nivel cardíaco de la alimentación con la dieta HF o con la dieta control en los animales wt y *Fgf21*^{-/-} (Tabla 2). No se observaron diferencias entre el peso corporal de los ratones wt y *Fgf21*^{-/-} sometidos a una dieta control, y la subida de peso tras las 16 semanas de tratamiento con la dieta HF fue similar en ambos genotipos, sin diferencias en la ingesta. Los niveles circulantes de glucosa, insulina y adiponectina tampoco sufrieron cambios. Los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) se redujeron significativamente con la dieta obesogénica, pero no se observaron diferencias entre ratones wt y *Fgf21*^{-/-}. Esta reducción de los niveles de NEFAs se puede atribuir a un deterioro de la lipólisis en el

tejido adiposo blanco de los ratones wt, provocado por la exposición a una dieta HF de larga duración, tal como se ha descrito en otros estudios (Lucas et al., 2016).

Un análisis del fenotipo cardíaco mostró que la relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (HW/TL) aumentaba significativamente después de la dieta HF en los ratones wt. Respecto a los ratones *Fgf21*^{-/-}, tanto el peso del corazón como la relación de este con la tibia aumentaron significativamente tras ser sometidos a la dieta obesogénica. El peso del corazón de los animales *Fgf21*^{-/-}, corregido por la longitud de la tibia, fue significativamente mayor que el de los ratones wt en los grupos alimentados con la dieta HF (Tabla 2).

Las mediciones ecocardiográficas realizadas en estos animales revelaron que el diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole y en sístole (LVIDd y LVIDs, respectivamente), y el volumen final diastólico y sistólico (EDV y ESV) eran significativamente mayores en los ratones wt alimentados con HF respecto a los ratones wt alimentados con la dieta control. El resto de los parámetros no se vieron alterados por la dieta rica en grasas en los animales wt (Tabla 2).

En los ratones *Fgf21*^{-/-}, el diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole y en sístole (LVIDd y LVIDs), el volumen final diastólico y sistólico (EDV y ESV), el septo interventricular en diástole (IVSd) y el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (PWTd) aumentaron significativamente después de la dieta rica en grasas, en comparación con sus correspondientes controles con la dieta estándar. Estos parámetros también se vieron significativamente aumentados en comparación con el grupo wt alimentado con la dieta HF. El índice de esfericidad (SI) se vio significativamente reducido en los ratones *Fgf21*^{-/-} alimentados con la dieta HF, pero no en los ratones wt en las mismas condiciones. Este dato indica cierto grado de hipertrofia excéntrica o dilatación en los ratones *Fgf21*^{-/-} en respuesta a la dieta obesogénica. No se observaron diferencias en la fracción de eyección (EF) o en la fracción de acortamiento (FS).

	wt		Fgf21 ^{-/-}	
	CT	HF	CT	HF
BW (g)	30.7 ± 1.5	42.3 ± 1.3*	26.9 ± 1.3	37.7 ± 0.7*
Food intake (kcal/mouse)	ND	1106 ± 170	ND	1307 ± 200
HW (mg)	151.8 ± 2.5	173.3 ± 4.7	150.4 ± 4.7	185.6 ± 8.0*
HW/TL (mg/mm)	8.7 ± 0.2	10.3 ± 0.3*	8.6 ± 0.3	11.2 ± 0.4*#
Glucose (mmol/L)	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3
NEFAa (mmol/L)	2.1 ± 0.5	1.2 ± 0.1*	2.15 ± 0.3	1.2 ± 0.1*
Insulin (mmol/L)	1.99 ± 0.9	15.4 ± 3.2	1.6 ± 0.7	9.2 ± 6.8
Adiponectin (µg/mL)	80.4 ± 7.5	79.4 ± 7.3	70.2 ± 7.3	74.6 ± 4.3
LVIDd (mm)	3.78 ± 0.13	4.06 ± 0.09*	3.88 ± 0.18	4.59 ± 0.03*#
LVIDs (mm)	2.47 ± 0.12	2.79 ± 0.12*	2.60 ± 0.15	3.18 ± 0.04*#
IVSd (mm)	0.69 ± 0.04	0.74 ± 0.04	0.68 ± 0.03	0.93 ± 0.03*#
IVSs (mm)	1.09 ± 0.09	1.16 ± 0.06	0.98 ± 0.05	1.26 ± 0.05*
LVPWd (mm)	0.76 ± 0.07	0.75 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.90 ± 0.02*#
LVPWs (mm)	1.07 ± 0.15	1.08 ± 0.05	0.89 ± 0.07	1.12 ± 0.03
EDV (mm ³)	61.50 ± 4.99	72.90 ± 3.92*	65.83 ± 7.85	96.62 ± 1.68*#
ESV (mm ³)	21.96 ± 2.67	29.73 ± 3.02*	25.21 ± 3.59	40.22 ± 1.17*#
H/R ratio	0.40 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.01
SI	2.17 ± 0.04	2.08 ± 0.03	2.14 ± 0.06	1.92 ± 0.01*#
EF (%)	69.75 ± 4.83	66.63 ± 3.01	66.57 ± 4.65	63.17 ± 1.88
FS (%)	34.88 ± 3.7	32.25 ± 2.43	32.14 ± 3.95	29.63 ± 1.09

Tabla 2. Caracterización de los animales wt y Fgf21^{-/-} tras 16 semanas de dieta HF. Los ratones wt y Fgf21^{-/-} se mantuvieron con una dieta control (CT) o una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. La tabla muestra los datos de peso corporal (BW), peso del corazón (HW), peso del corazón corregido por longitud de la tibia (HW/TL), niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados (NEFAs), insulina y adiponectina, diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole y en sístole (LVIDd y LVIDs), septo interventricular en diástole y en sístole (IVSd y IVSs), grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole y en sístole (LVPWd y LVPWs), volumen final diastólico y sistólico (EDV y ESV), relación entre el grosor de la pared y el radio (indicador de la tendencia hacia hipertrofia excéntrica o concéntrica) (H/R), índice de esfericidad (SI), fracción de eyección (EF) y de acortamiento (FS). Todas las medidas se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

En conjunto, estos resultados indican que tras someter a los animales a una dieta obesogénica, el grupo wt desarrollaba algunos signos de dilatación cardíaca. Sin embargo, la respuesta de los ratones Fgf21^{-/-} a la dieta HF fue más marcada, desarrollando una mayor hipertrófica cardíaca y dilatación. No se observaron diferencias en la contractibilidad cardíaca en ninguno de los grupos.

En concordancia con las mediciones ecocardiográficas obtenidas, en el análisis de secciones histológicas del tejido teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) se observó que la dieta HF aumenta significativamente el área transversal de los cardiomiocitos en los ratones *Fgf21*^{-/-}, pero no en los ratones wt (Fig 12A).

A continuación, se analizó la expresión de ARNm del marcador de hipertrofia *Acta1* (que codifica para la actina esquelética α) (Fig 12B). La expresión de este marcador aumentó significativamente en los ratones *Fgf21*^{-/-} en condiciones basales respecto a los ratones wt. La dieta HF provocó un aumento significativo en el ARNm de *Acta1* en los ratones wt, mientras que los niveles en los ratones *Fgf21*^{-/-} se mantuvieron similares a los niveles de expresión basales, que ya se encontraban incrementados.

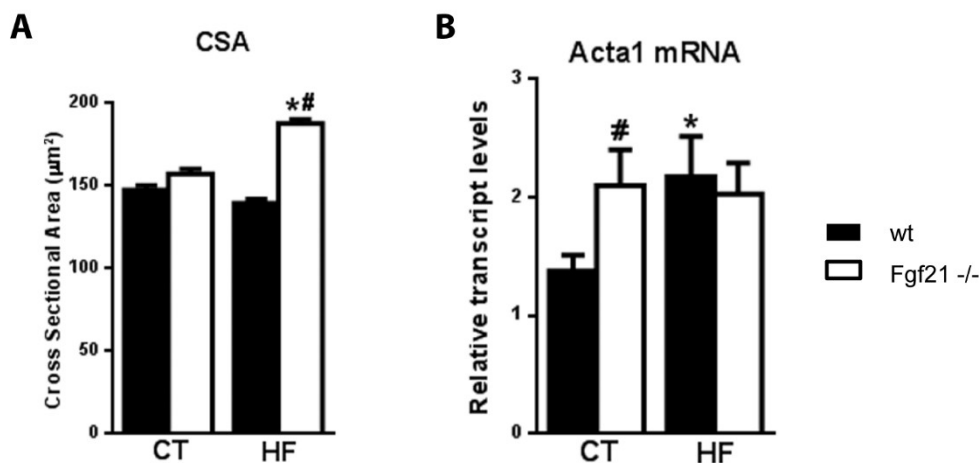


Figura 12. Efectos de la dieta rica en grasas sobre la hipertrofia cardíaca en ratones deficientes en FGF21. Los ratones wt (barras negras) y *Fgf21*^{-/-} (barras blancas) fueron alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. (A) Cuantificación del área transversal de los cardiomiocitos en la pared del ventrículo izquierdo. (B) Niveles de expresión de ARNm del marcador de hipertrofia *Acta1*. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo wt correspondiente).

Se estudió la expresión del ARNm de los marcadores de fibrosis cardíaca metaloproteasa-9 (*Mmp9*), colágeno-3 (*Col3a1*) y factor de crecimiento transformante- β (*Tgfb*) (Fig 13A). En los ratones *Fgf21*^{-/-}, los niveles de expresión cardíaca de *Mmp9* aumentaron significativamente en comparación con los ratones wt tanto en el grupo control como en el grupo alimentado con dieta HF. Los niveles de expresión de *Col3a1* y *Tgfb* tendieron a aumentar también en los ratones *Fgf21*^{-/-} sometidos a la dieta rica en grasas, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas.

Finalmente, para evaluar directamente la incidencia de la fibrosis en los corazones de estos animales, las secciones cardíacas se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson. No se encontraron signos de fibrosis en los ratones wt bajo ninguna condición. En cambio, los ratones *Fgf21*^{-/-} alimentados con HF presentaron extensas regiones fibróticas (Fig 13B).

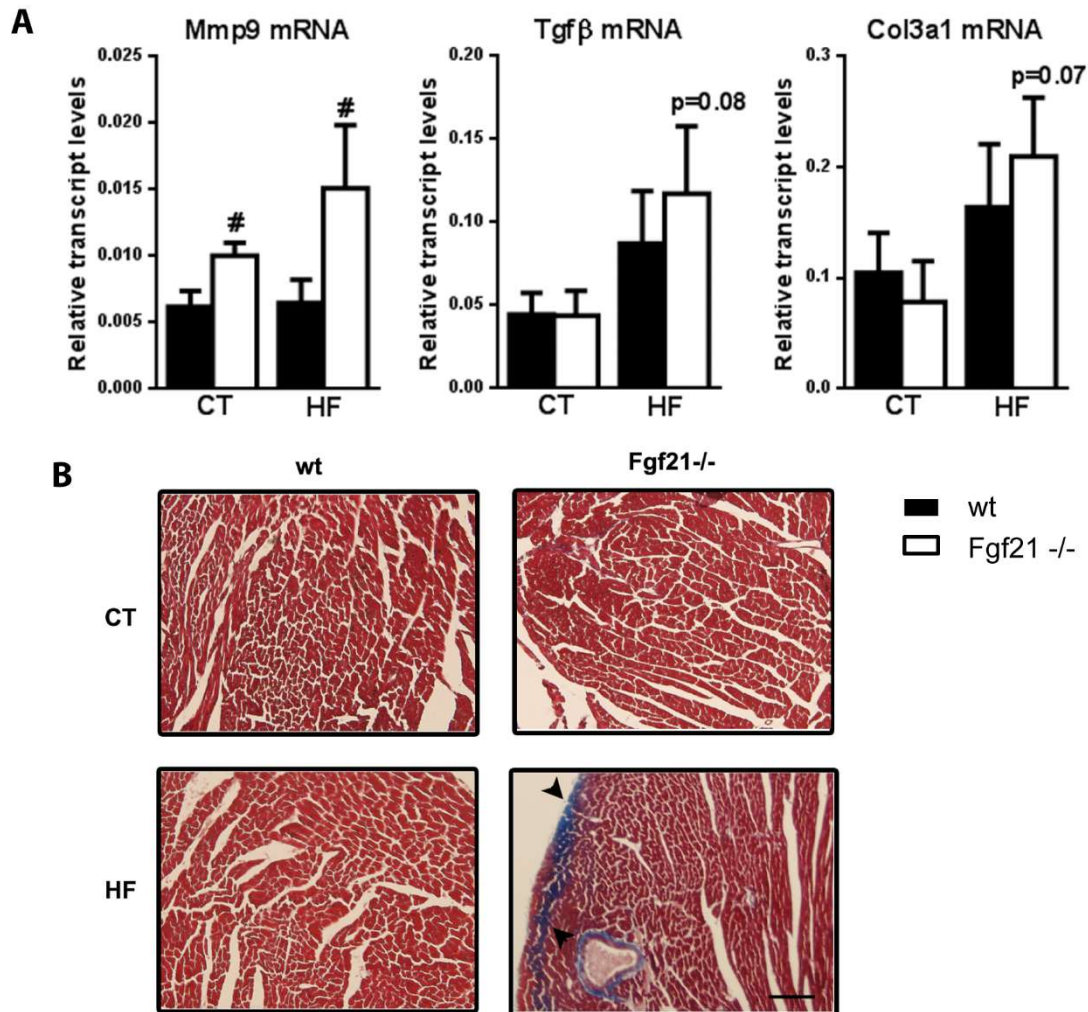


Figura 13. Efectos de la dieta rica en grasas sobre la fibrosis cardíaca en ratones deficientes en FGF21. Los ratones wt (barras negras) y *Fgf21*^{-/-} (barras blancas) fueron alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. (A) Niveles de expresión de ARNm de los marcadores de fibrosis *Mmp9*, *Tgfβ* y *Col3a1*. (B) Determinación de la fibrosis en secciones histológicas de corazón teñidas con la tinción tricrómica de Masson (20x aumentos; escala 50μm). Las flechas señalan las áreas fibróticas (en azul). Los resultados se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

Los resultados indican que, en ausencia de la proteína FGF21, una dieta rica en grasas promueve la hipertrofia cardíaca y sensibiliza a los ratones frente a estímulos pro-hipertróficos y otros trastornos asociados como el desarrollo de fibrosis cardíaca.

La falta de FGF21 atenúa la respuesta antioxidante a la dieta rica en grasas

La proteína FGF21 está involucrada en la respuesta cardíaca a estrés oxidativo (Planavila et al., 2015a). En consecuencia, se estudiaron varios marcadores cardíacos de estrés oxidativo en los ratones wt y *Fgf21*^{-/-} tras la dieta HF de 16 semanas.

Para determinar la incidencia del estrés oxidativo en los corazones de estos animales, se analizó la actividad de la aconitasa, que se conoce que disminuye en condiciones de estrés oxidativo (Cantu et al., 2009). En los animales wt no se modificó la actividad de la aconitasa en ninguna de las condiciones analizadas, pero en los ratones *Fgf21*^{-/-} la actividad de la aconitasa disminuyó significativamente en el grupo alimentado con HF, en comparación con los ratones *Fgf21*^{-/-} alimentados con una dieta estándar (Fig 14A).

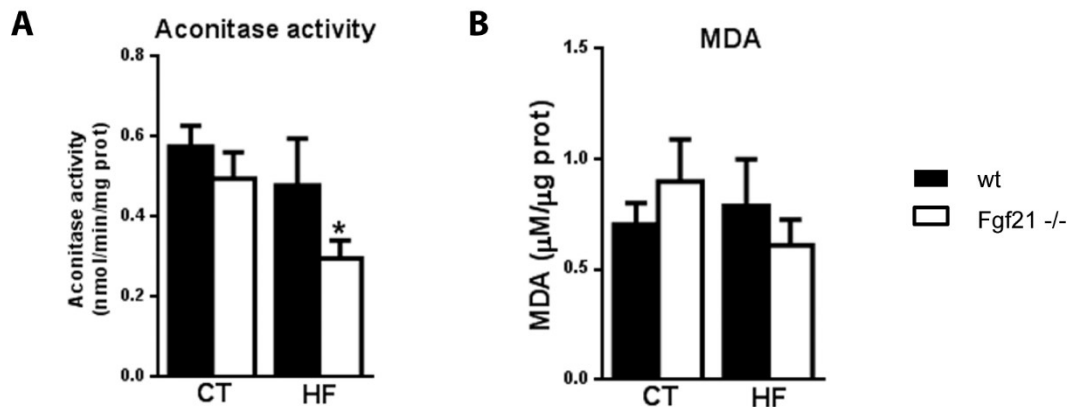


Figura 14. Efectos sobre el estrés oxidativo de la dieta rica en grasas en ratones wt y deficientes en FGF21. Los ratones wt (barras negras) y *Fgf21*^{-/-} (barras blancas) fueron alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. (A) Actividad de la aconitasa determinada a partir de extractos de proteína de muestras cardíacas y expresada como nmol/min/mg de proteína. (B) Niveles de MDA en muestras cardíacas de estos animales. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo wt correspondiente).

Como medida del estrés oxidativo se analizaron los niveles de malondialdehído (MDA), pero no se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones experimentales (Fig 14B).

A continuación, se estudió la expresión del ARNm de genes cardíacos que codifican para varias proteínas involucradas en vías antioxidantes, como Ucp3, Cat (Catalasa), Gpx1 (glutación peroxidasa 1), Sod2 (superóxido dismutasa 2) y Prdx5 (peroxiredoxina 5), en condiciones basales y en respuesta a un alto contenido en grasa en la dieta (Fig 15). No se encontraron diferencias en la expresión de los genes analizados entre ratones wt y Fgf21^{-/-} en condiciones basales.

Sin embargo, tras la dieta HF, los niveles de expresión cardíacos de los genes Ucp3, Cat, Gpx1 y Prdx5 aumentaron significativamente en los ratones wt respecto al grupo alimentado con la dieta control, pero no se alteraron en los ratones Fgf21^{-/-} sometidos a la dieta HF en comparación con sus respectivos controles (Fig 15).

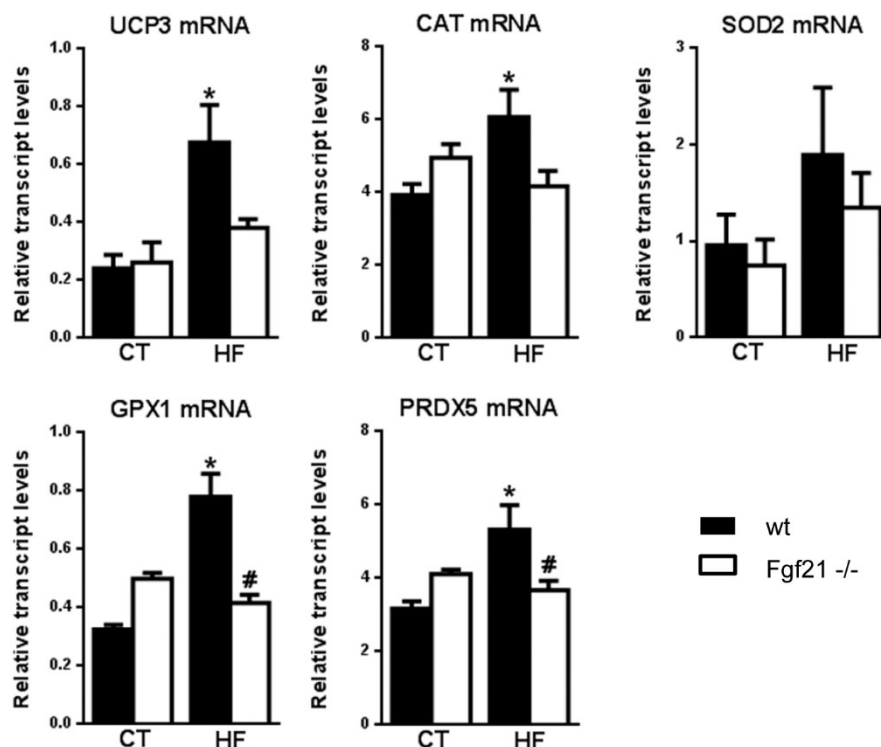


Figura 15. Niveles cardíacos de expresión de ARNm de los marcadores de estrés oxidativo Ucp3, Cat, Sod2, Gpx1 y Prdx5 en ratones wt y deficientes en FGF21. Los ratones wt (barras negras) y Fgf21^{-/-} (barras blancas) fueron alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

Los niveles de proteína de UCP3 aumentaron con la dieta HF en los ratones wt, pero no en los ratones *Fgf21*^{-/-} sugiriendo una menor capacidad antioxidante en el corazón de estos animales (Fig 16).

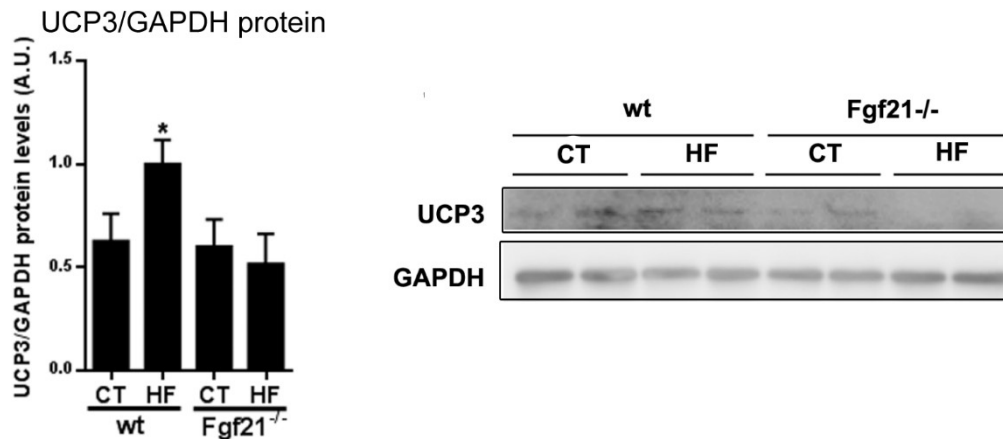


Figura 16. Niveles cardíacos de la proteína UCP3 en ratones wt y deficientes en FGF21 alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. Inmunoblot representativo de los niveles de proteína UCP3 en corazón y cuantificación, utilizando GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo wt correspondiente).

Estos resultados sugieren que, en ausencia de FGF21, la respuesta antioxidante adaptativa en el corazón de estos animales frente a una dieta obesogénica se encuentra atenuada.

La falta de FGF21 promueve la acumulación de lípidos en el corazón en respuesta a una dieta obesogénica

Debido a que la acumulación de lípidos en el corazón podría ser una de las principales causas de disfunción cardíaca durante la obesidad (Fukushima and Lopaschuk, 2016b, 2016a; Sakamoto et al., 2000), a continuación analizamos la acumulación de gotas lipídicas en las muestras cardíacas utilizando la tinción Oil Red O (ORO). No se encontraron evidencias de una acumulación significativa de lípidos en los corazones de los animales wt alimentados con la dieta estándar o con la dieta rica en grasas (Fig 17). Sin embargo, el marcaje de lípidos en corazón aumentó dramáticamente en las muestras de ratones *Fgf21*^{-/-} alimentados con la dieta HF.

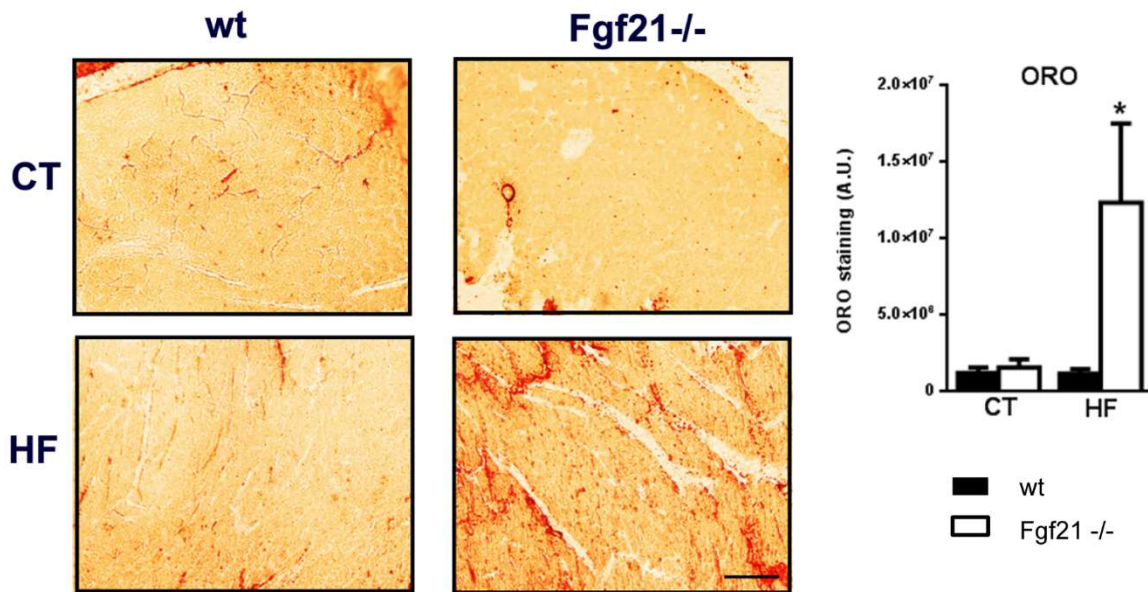


Figura 17. Acumulación cardíaca de lípidos en corazones de ratones deficientes en FGF21: efectos de la dieta HF. Secciones histológicas representativas teñidas con Oil Red O (ORO; 20x aumentos; escala 50µm) y cuantificación en la pared del ventrículo izquierdo de los corazones de animales wt (barras negras) y Fgf21^{-/-} (barras blancas) alimentados con una dieta control o una dieta HF durante 16 semanas. Los resultados se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

El paso siguiente fue analizar las vías moleculares involucradas en la regulación del metabolismo lipídico en corazón, con el objetivo de determinar el mecanismo responsable de esta acumulación anormal de lípidos en los ratones Fgf21^{-/-}. Se analizaron los niveles de expresión del ARNm de los genes Hsl (lipasa sensible a hormonas) y Atgl (lipasa adipocitaria de triglicéridos), ambas enzimas involucradas en la lipólisis; Dgat (diacilglicerol aciltransferasa), involucrada en la biosíntesis de triglicéridos; y Lpl (lipoproteína lipasa), involucrada en la captación de lípidos (Fig 18A).

Sorprendentemente, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los genes estudiados, en ninguno de los grupos experimentales ni entre genotipos. Tampoco se encontraron cambios significativos en la expresión del gen Pparg, que codifica por el factor de transcripción PPARγ, relacionado con la adipogénesis y la regulación del almacenamiento de lípidos, ni en Plin5 (perilipina 5), asociado con las gotas lipídicas en corazón, en los ratones wt en ninguna de las condiciones dietéticas (Fig 18A).

Sin embargo, en los ratones *Fgf21*^{-/-} los niveles de expresión de ARNm tanto de *Pparg* como de *Plin5* se encontraban aumentados en condiciones de dieta estándar, y se mantuvieron también elevados con la dieta HF. Teniendo en cuenta que una dieta rica en grasas induce la oxidación de ácidos grasos (FAO) en corazón (Fukushima and Lopaschuk, 2016a; Sakamoto et al., 2000), se examinó la tasa de FAO, así como la expresión de genes asociados con esta vía metabólica. La tasa de FAO aumentó notablemente tras la dieta rica en grasas tanto en los ratones wt como en los *Fgf21*^{-/-} (Fig 18B), sin diferencias significativas entre genotipos en ninguna de las condiciones dietéticas. Por otra parte, los niveles de expresión de los genes relacionados con la FAO, *Pdk4* y *Acox* (acil-coA oxidasa), mostraron cierta tendencia a aumentar tras la dieta HF en ratones wt y *Fgf21*^{-/-}, llegando a ser estadísticamente significativa únicamente en los ratones wt (Fig 18C).

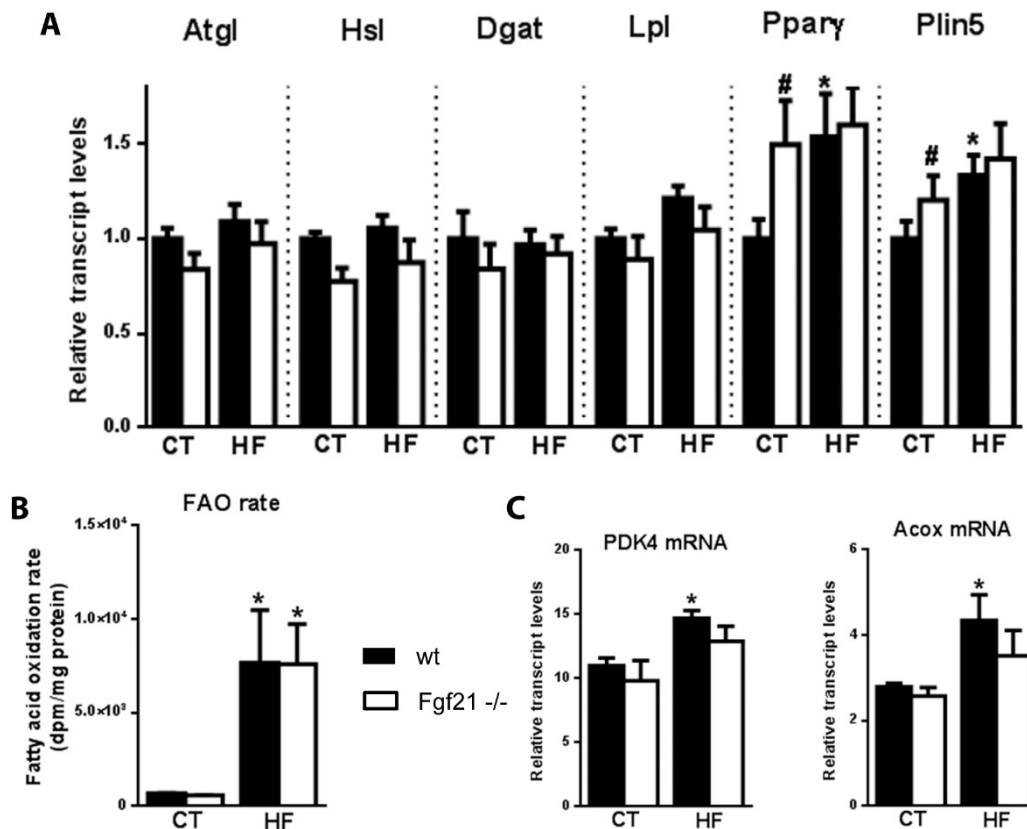


Figura 18. Efectos sobre el metabolismo de los ácidos grasos de la dieta rica en grasas en ratones wt y deficientes en FGF21. (A) Niveles de expresión cardíaca del ARNm de genes involucrados en la regulación del metabolismo lipídico en ratones wt (barras negras) y *Fgf21*^{-/-} (barras blancas). (B) Tasas de oxidación de ácidos grasos en homogenados de tejido cardíaco fresco. (C) Niveles de expresión de ARNm de los genes de catabolismo lipídico *Pdk4* y *Acox*. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo wt correspondiente).

En conjunto, estos resultados indicaron que el rendimiento del metabolismo lipídico en corazón, tal como se refleja en el estado de las vías catabólicas y anabólicas, es similar en los ratones wt y *Fgf21*^{-/-} después de las 16 semanas de alimentación con la dieta rica en grasas.

Sin embargo, ni la regulación transcripcional de las vías clásicas de homeostasis de las gotas lipídicas ni los cambios en las vías de oxidación de ácidos grasos explican la excesiva acumulación de lípidos descrita en respuesta a la dieta HF en ausencia de FGF21 (Fig 17). Esta acumulación podría contribuir al desarrollo de los trastornos cardíacos exacerbados que se observaron en los ratones *FGF21*^{-/-} en respuesta a la dieta rica en grasas.

La autofagia cardíaca está bloqueada en los ratones *Fgf21*^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasas

La autofagia es un mecanismo molecular responsable de la degradación de componentes intracelulares, incluyendo las gotas lipídicas, en el fenómeno conocido como lipofagia.

Para determinar el mecanismo molecular responsable de la acumulación de lípidos en los ratones deficientes en FGF21, en primer lugar analizamos la expresión de varios genes reguladores de la autofagia, como *Atg7*, *Ulk1*, *Lc3b*, *Bnip3* y *Tfeb* (Fig 19A).

En los ratones wt, se encontró un aumento significativo en la expresión del ARNm de todos los genes estudiados en respuesta a la dieta HF, exceptuando *Tfeb*. Sin embargo, en los ratones deficientes en FGF21 no se observaron cambios en la expresión del ARNm de estos marcadores autofágicos en respuesta a la alimentación con la dieta rica en grasas (Fig 19A).

A continuación, se examinaron los niveles de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62 (Klionsky et al., 2016) en los corazones de estos animales (Fig 19B). Los análisis mediante inmunoblot no mostraron diferencias significativas en los animales wt en ninguna de las condiciones dietéticas. Con la dieta control, los ratones *Fgf21*^{-/-} presentaron niveles más altos de la proteína LC3-II, que podría indicar cierto grado de

activación de la autofagia en estas condiciones basales. En cambio, los ratones *Fgf21*^{-/-} alimentados con la dieta HF mostraron una importante acumulación, estadísticamente significativa, de p62 (Fig 19B). Esta proteína es un sustrato de degradación en la vía autofágica, y por tanto su acumulación es consistente con una reducción o un bloqueo de la autofagia.

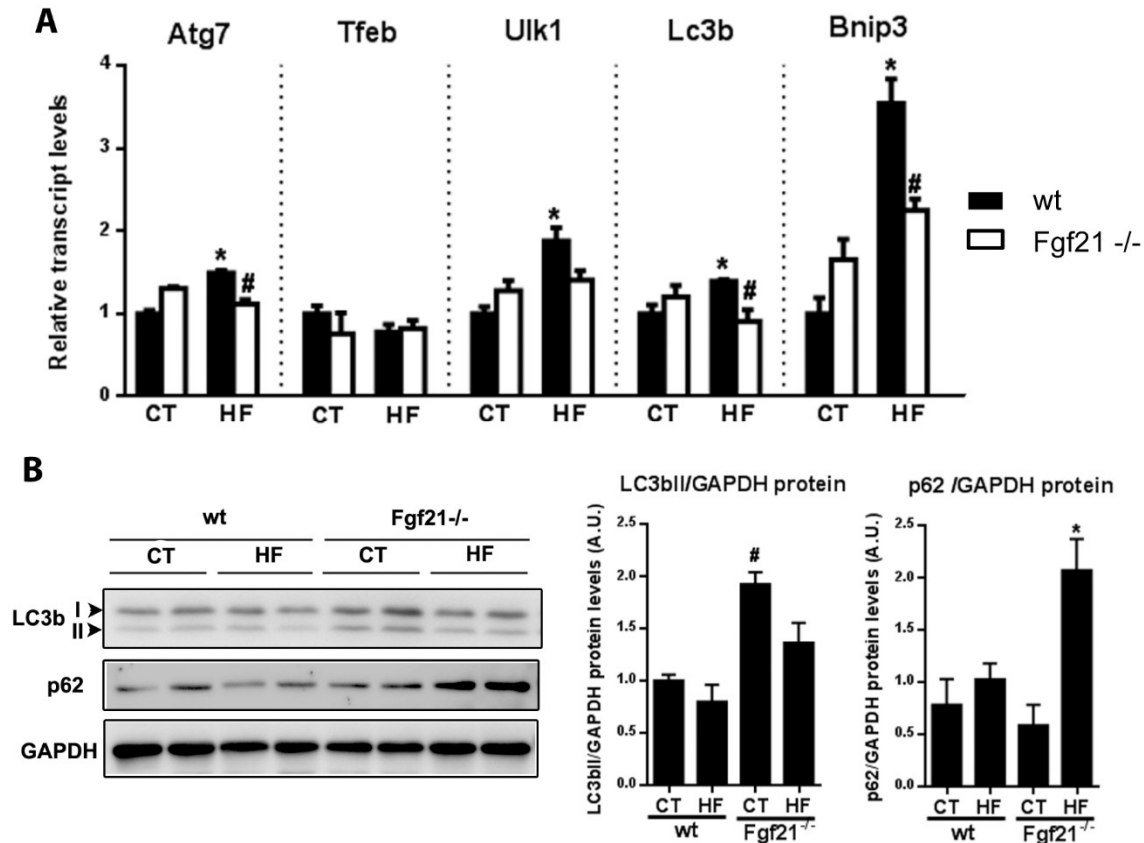


Figura 19. FGF21 está involucrada en la regulación de la autofagia cardíaca *in vivo*. Los ratones wt (barras negras) y *Fgf21*^{-/-} (barras blancas) fueron alimentados con una dieta estándar (CT) o con una dieta rica en grasas (HF) durante 16 semanas. (A) Niveles de expresión en corazón del ARNm de los genes relacionados con la autofagia *Atg7*, *Tfeb*, *Ulk1*, *Lc3b* y *Bnip3*. (B) Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62, corregidas por GAPDH. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo wt correspondiente).

Los niveles de expresión de ARNm de los genes mitocondriales *Pink1* y *Parkin* y los niveles de proteína *Parkin* (Fig 20A) no se vieron alterados significativamente en ninguna de las condiciones experimentales. La actividad mitocondrial, determinada mediante la actividad del complejo IV, también se mantuvo estable en todas las condiciones (Fig 20B).

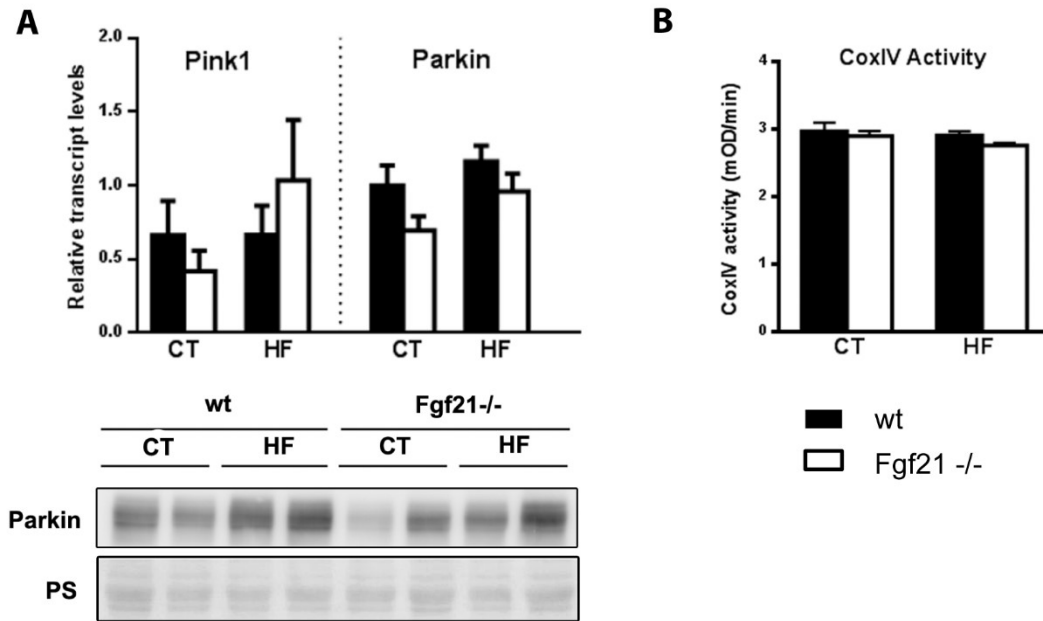


Figura 20. Actividad mitocondrial y estado de la mitofagia en ratones wt y deficientes en FGF21 alimentados con dieta HF durante 16 semanas. (A) Niveles cardíacos de expresión del ARNm de Pink1 y Parkin en ratones wt (barras negras) y Fgf21^{-/-} (barras blancas) alimentados con una dieta estándar (CT) o rica en grasas (HF) durante 16 semanas, e inmunoblot representativo de los niveles de proteína Parkin, corregidos por proteína total (tinción Ponceau). (B) Actividad del complejo IV de la cadena mitocondrial en los corazones de estos animales. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA.

Para confirmar el efecto directo de FGF21 sobre la regulación de la autofagia en las células cardíacas, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de genes relacionados con la autofagia (Atg7, Tfeb, Ulk1 y Lc3b) en cardiomiocitos neonatales de ratón, procedentes de animales wt y Fgf21^{-/-} (Fig 21A). La expresión de los genes analizados, excepto Ulk1, disminuyeron significativamente en los cardiomiocitos procedentes de ratones Fgf21^{-/-} en comparación con los de ratones wt.

A continuación, los cardiomiocitos en cultivo se trataron con FGF21 recombinante durante 24 horas y se analizó la expresión de los genes de la vía autofágica (Fig 21B). La expresión del ARNm de Atg7, Ulk1 y especialmente Tfeb, aumentaron significativamente tras el tratamiento con FGF21.

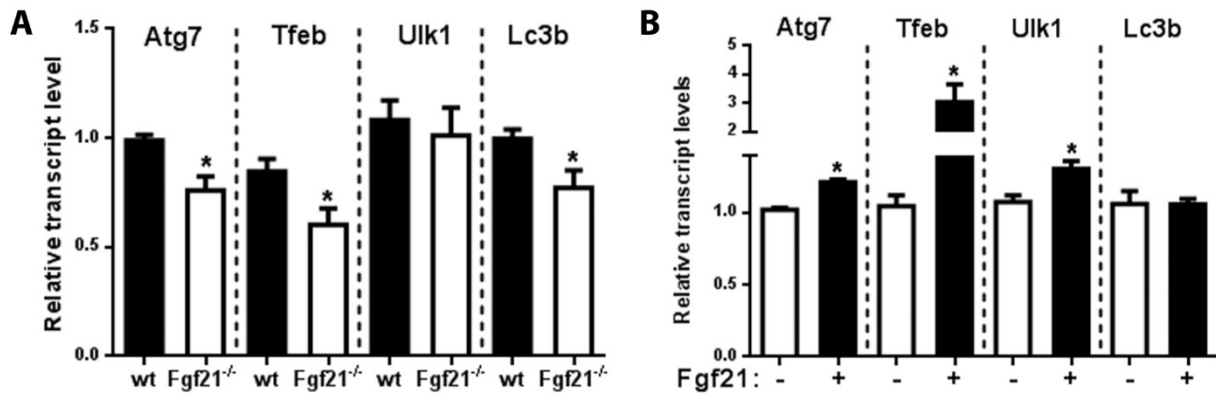


Figura 21. FGF21 regula la autofagia a nivel transcripcional en cardiomiocitos. (A) Niveles de expresión del ARNm de los genes relacionados con la autofagia en cardiomiocitos procedentes de ratones wt y Fgf21^{-/-} y (B) en cardiomiocitos tratados con FGF21 (50nM) durante 24 horas. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3). Análisis estadístico realizado con t-test (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente).

Se analizaron los niveles estáticos de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62 en los cardiomiocitos neonatales tratados con FGF21 (Fig 22A). El tratamiento con FGF21 no modificó los niveles de la proteína LC3-II, pero causó una reducción drástica de los niveles de proteína p62, indicando que FGF21 induce la autofagia en los cardiomiocitos.

Finalmente, con tal de confirmar la activación del flujo autofágico por acción de FGF21, se trataron los cardiomiocitos con FGF21 en presencia o ausencia del inhibidor de autofagia cloroquina (Fig 22B).

Se detectó cierta acumulación de LC3-II y p62 en las células tratadas únicamente con cloroquina, lo que indica cierto grado de actividad autofágica basal en los cardiomiocitos en cultivo. Sin embargo, en los cardiomiocitos tratados con FGF21 también en presencia de cloroquina, los niveles de las proteínas LC3-II y p62 aumentaron notablemente en comparación con su correspondiente control, confirmando así el aumento de la actividad autofágica en las células cardíacas en respuesta a FGF21.

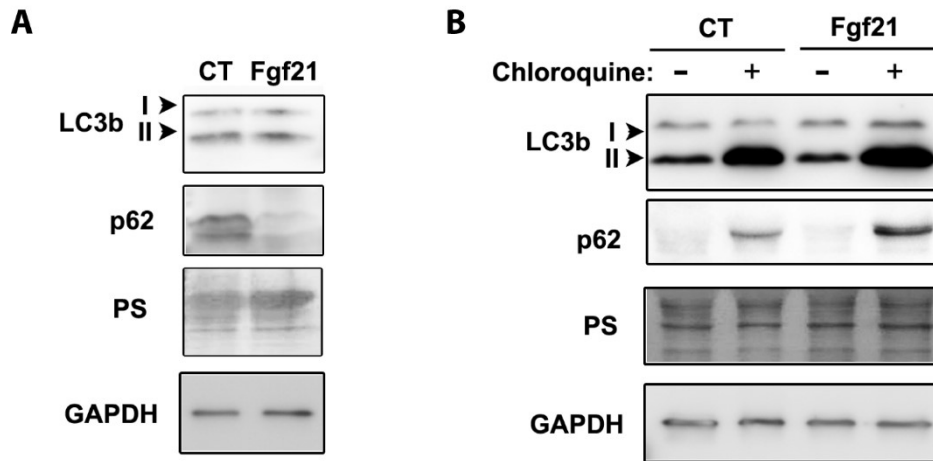


Figura 22. FGF21 regula la actividad autofágica en cardiomiocitos. (A) Inmunoblot representativo de los niveles de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62 en cardiomiocitos en cultivo, tratados con FGF21 (50nM) durante 24 horas y (B) inmunoblot representativo de los niveles de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62 en cardiomiocitos en cultivo, tratados con FGF21 (50nM) durante 24 horas en presencia o ausencia del inhibidor de la autofagia cloroquina (50 μ M), añadido 8 horas antes de lisar las células. Se usó la proteína total (tinción Ponceau) y GAPDH como control de carga. (n=3).

Por último, se examinó la estructura subcelular de secciones de corazón de ratones wt o *Fgf21*^{-/-} sometidos a una dieta rica en grasas, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

En los ratones wt sometidos a la dieta obesogénica se observó la presencia de múltiples vesículas de degradación con estructura de doble membrana, que se identificaron como autofagosomas (Fig 23).

Muchas de estas vesículas contenían pequeñas gotas de grasa o una gota de mayor tamaño, indicativo de lipofagia. Sin embargo, este tipo de vesículas de degradación lipídica no se encontró en las imágenes de ratones *Fgf21*^{-/-} sometidos a la misma dieta rica en grasas, indicando un bloqueo de la lipofagia en corazón en ausencia de FGF21.

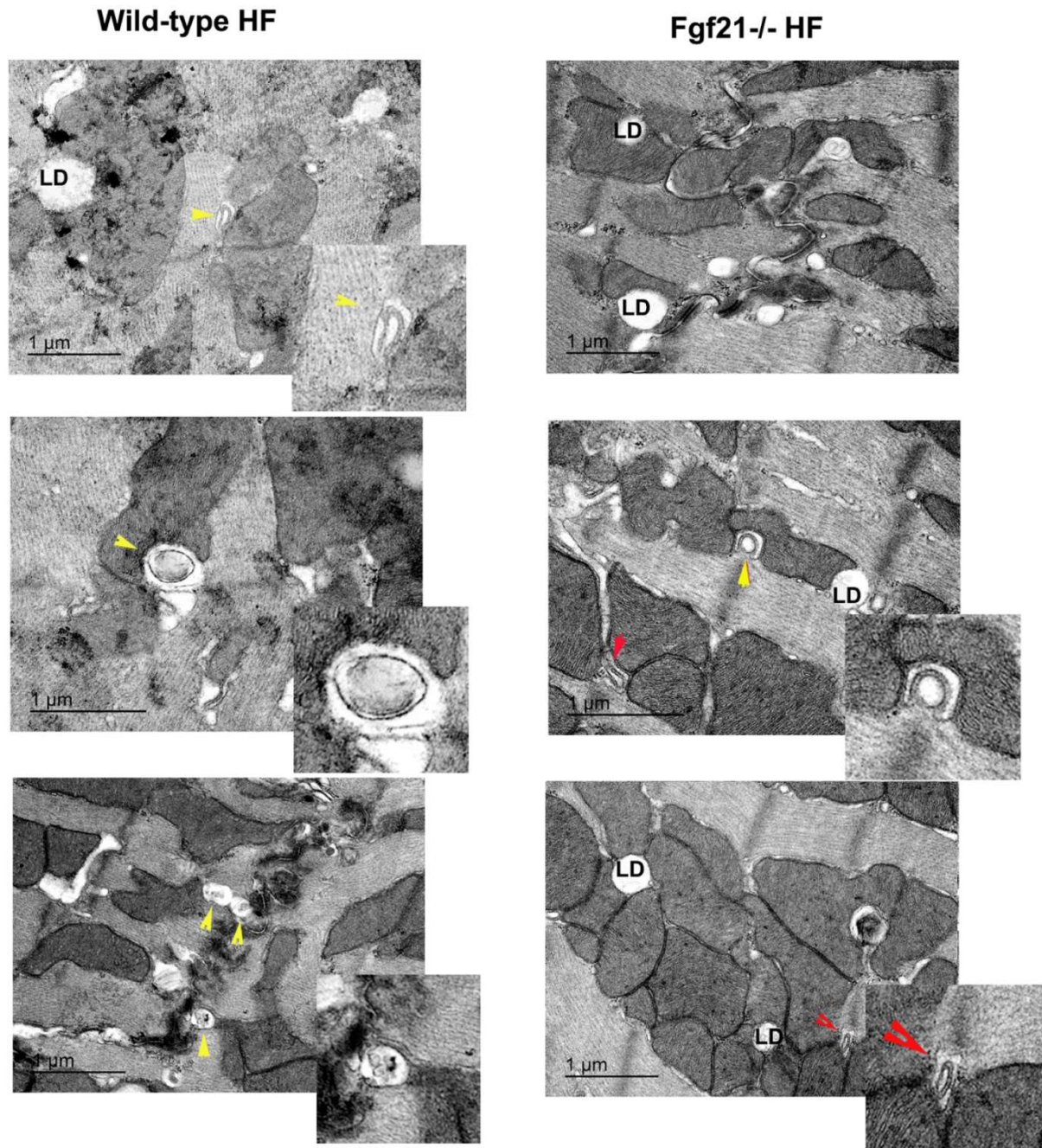


Figura 23. Estructura subcelular del corazón en animales wt y *Fgf21*^{-/-} alimentados con una dieta HF durante 16 semanas. Imágenes representativas, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las flechas amarillas marcan autofagosomas que contienen lípidos en su interior. Las flechas rojas marcan autofagosomas que contienen otros sustratos citoplasmáticos de degradación, pero no lípidos. LD: gotas lipídicas. (n=3).

Resultados

Parte 2: Estudios acerca de Metrnl

Los cardiomiocitos producen y secretan Metrnl, y su expresión aumenta en respuesta al estrés cardíaco

Debido a los altos niveles de expresión cardíaca de Metrnl, descritos previamente (Rao et al., 2015) y al desconocimiento de la función de esta proteína en corazón, nos planteamos que Metrnl podría ser una potencial candidata a cardiocina. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se describe por primera vez el papel de Metrnl como una nueva cardiocina.

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión relativos del ARNm de Metrnl en varios tejidos de ratón. Se encontró que el tejido con la expresión más alta de esta proteína era el corazón, en concordancia con los datos previos (Rao et al., 2014).

En el corazón, la expresión de Metrnl duplicaba los niveles de ARNm de Metrnl encontrados en otros tejidos, como el músculo esquelético o el tejido adiposo, considerados previamente como las principales fuentes de Metrnl (Fig 24A).

En muestras de biopsias humanas, los niveles de expresión del ARNm de Metrnl en corazón eran similares a los del tejido adiposo, y el doble de los encontrados en el hígado y el músculo esquelético (Fig 24B).

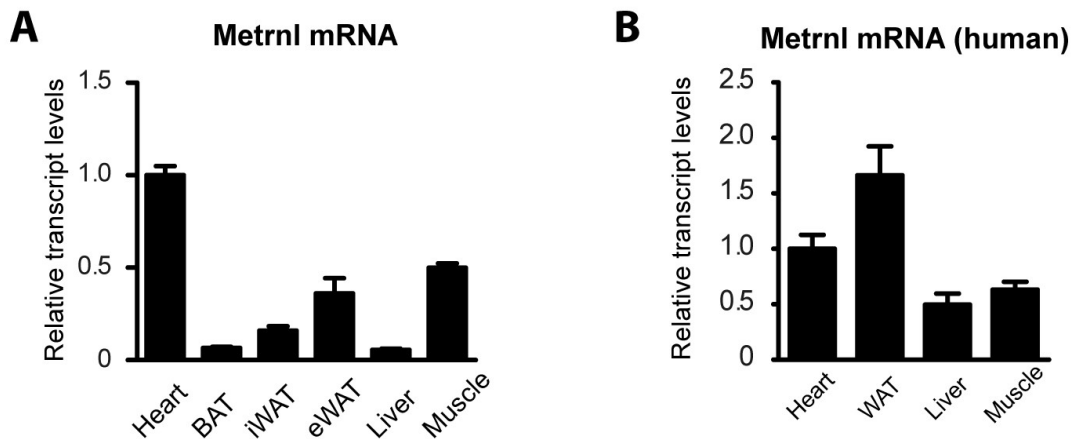


Figura 24. Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en (A) corazón, tejido adiposo marrón interescapular (BAT), tejido adiposo blanco inguinal y epididimal (iWAT y eWAT), hígado y músculo en ratón y (B) en corazón, tejido adiposo blanco, hígado y músculo en pacientes. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo; n=8 pacientes por grupo).

Los niveles de expresión del ARNm de Metrnl aumentaron significativamente en corazón en respuesta a la inducción de hipertrofia cardíaca mediante distintos modelos

experimentales en ratón, como el tratamiento con el agente hipertrófico isoproterenol (ISO), la constricción de la aorta transversa (TAC) y la hipertensión inducida mediante el tratamiento con angiotensina II (AngII) (Fig 25A).

Además, en muestras cardíacas de pacientes con insuficiencia cardíaca, los niveles de expresión del ARNm de Metrnl también aumentaron significativamente respecto a pacientes control (Fig 25B). El análisis inmunohistoquímico de biopsias cardíacas de pacientes afectados por distintas cardiomiopatías también reveló un aumento significativo de los niveles de proteína Metrnl (Fig 25C), indicando que la expresión de Metrnl se induce en condiciones de patología o estrés cardíaco.

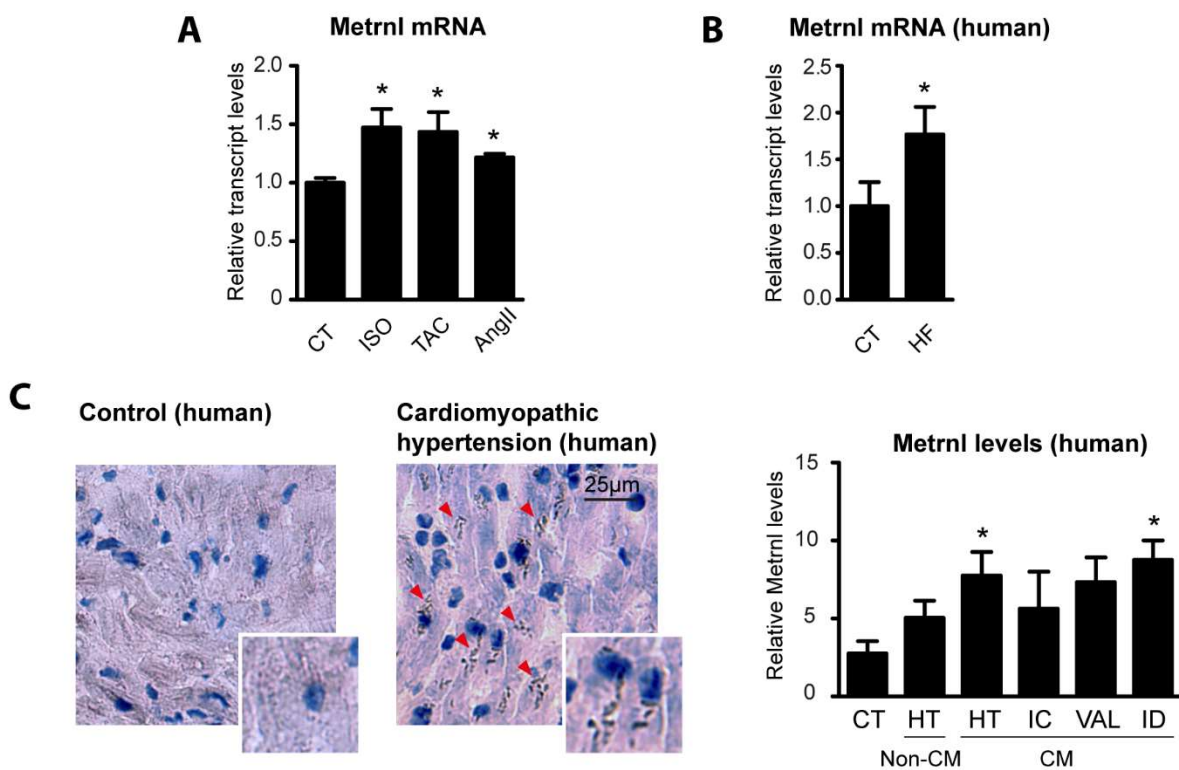


Figura 25. Niveles de expresión de Metrnl en distintas situaciones de estrés cardíaco. (A) Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en muestras cardíacas de ratón, en respuesta a infusión con isoproterenol durante 7 días (ISO), constricción de la aorta transversa (TAC) e infusión con angiotensina II durante 7 días (AngII). (B) Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en muestras de pacientes control (CT) o con insuficiencia cardíaca. (C) Detección mediante inmunohistoquímica y cuantificación de los niveles de proteína Metrnl en muestras cardíacas de pacientes control (CT), con hipertensión sin cardiomiopatía (HT Non-CM), con hipertensión y cardiomiopatía (HT CM), con isquemia y cardiomiopatía (IC CM), con cardiomiopatía valvular (VAL CM) y con cardiomiopatía idiopática (ID CM). Los resultados se expresan como media \pm SEM (A; n=5 por grupo). Análisis estadístico realizado con t-test o con el test no paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$ comparado con grupo control).

El aislamiento de los principales tipos celulares presentes en el corazón indicó que Metrnl se expresa preferentemente en los cardiomiocitos (CM) respecto a los fibroblastos cardíacos (CF) (Fig 26A). Los niveles de expresión del ARNm de Metrnl en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales (NCMs) aumentaron significativamente después de la exposición al agente hipertrófico fenilefrina (PE) (Fig 26B).

Finalmente, para determinar si realmente la proteína Metrnl producida por los cardiomiocitos estaba siendo secretada por las células, se analizaron los niveles de proteína Metrnl en los medios de cultivo de los NCMs (Fig 26C). La tasa basal de secreción de Metrnl al medio de cultivo en condiciones control (CT) fue de aproximadamente 0,04 ng por mililitro en 24 horas. Tras el tratamiento con PE, la tasa de secreción de Metrnl por parte de los cardiomiocitos aumentó significativamente, hasta los 0,08 ng por mililitro en 24 horas.

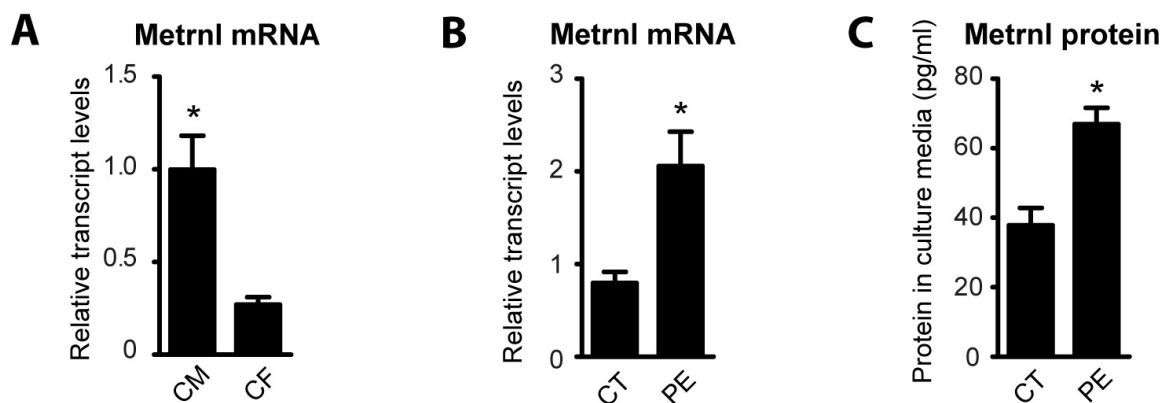


Figura 26. Niveles de expresión de Metrnl en células cardíacas. (A) Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en cardiomiocitos (CM) y fibroblastos cardíacos (CF). (B) Niveles de expresión y (C) proteína Metrnl secretada al medio de cardiomiocitos en cultivo, en condiciones basales (CT) y tratados con fenilefrina (PE). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con t-test (* $p < 0,05$ comparado con grupo control).

Estos resultados indican que el corazón reacciona a la inducción de hipertrofia y otras lesiones cardíacas induciendo la expresión de Metrnl, y que los cardiomiocitos expresan y secretan Metrnl en respuesta a dichos estímulos.

PPAR α controla la expresión de Metrnl en corazón

El paso siguiente fue estudiar los mecanismos responsables de la regulación de la expresión de Metrnl y la capacidad de respuesta del corazón en el contexto de inducción de la hipertrofia.

Estudios previos han demostrado que la activación de la vía PPAR α protege al corazón frente a la hipertrofia cardíaca (Planavila et al., 2011; Smeets et al., 2007, 2008b, 2008a) y que otros miembros de la familia de factores de transcripción PPAR regulan la expresión de Metrnl en tejido adiposo y músculo esquelético (Jung et al., 2018; Li et al., 2015b).

Por tanto, a continuación se analizó la expresión del ARNm de Metrnl en corazón en ratones wt y deficientes en PPAR α , en condiciones basales y después de la inducción de hipertrofia cardíaca mediante el tratamiento con isoproterenol (ISO) (Fig 27A).

La expresión cardíaca del ARNm de Metrnl fue menor en los ratones PPAR α -/- en condiciones basales. Tal como se esperaba, el tratamiento con ISO provocó un aumento en los niveles de expresión del ARNm de Metrnl en los ratones wt. Sin embargo, la inducción de la expresión de Metrnl por exposición a ISO se perdió totalmente en los ratones PPAR α -/-.

La participación de la vía PPAR α en la regulación de la expresión cardíaca de Metrnl se confirmó con el modelo *in vitro* de cardiomiocitos de ratas neonatales. La sobreexpresión de PPAR α en los cardiomiocitos en cultivo, mediada por vectores adenovíricos, produjo un aumento significativo tanto en los niveles de expresión del ARNm de Metrnl como en la cantidad de proteína secretada por las células (Fig 27B).

Por contra, el tratamiento de las células con un antagonista de PPAR α (GW6771) atenuó significativamente el aumento de los niveles de expresión del ARNm de Metrnl en respuesta al tratamiento con fenilefrina (PE) (Fig 27C).

En conjunto, estos resultados indican que la vía PPAR α es crítica para la regulación de la expresión de Metrnl en corazón.

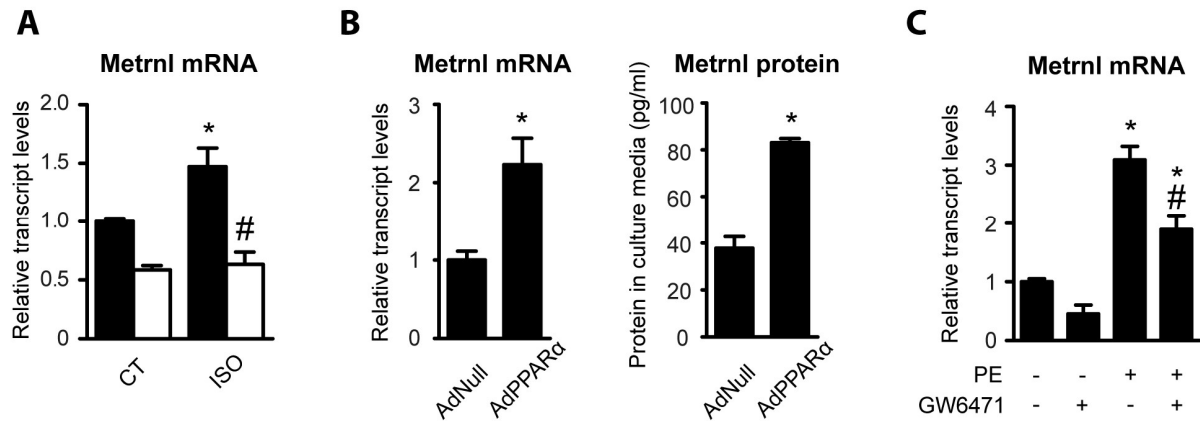


Figura 27. El factor de transcripción PPAR α regula la expresión de Metrnl en corazón. (A) Niveles de expresión cardíaca del ARNm de Metrnl en ratones wt y PPAR α ^{-/-}, en condiciones basales (CT) y tras 7 días de infusión con isoproterenol (ISO). (B) Niveles de expresión del ARNm y secreción de proteína Metrnl en cardiomiocitos en cultivo, infectados con un adenovirus control (Null) o con PPAR α . (C) Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en cardiomiocitos en cultivo, tratados con fenilefrina (PE) y con el antagonista de PPAR α (GW6471). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo; n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con t-test o one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt o control sin GW6471 correspondiente).

Metrnl es un nuevo biomarcador para enfermedades cardíacas

Considerando que las células cardíacas producen y secretan la proteína Metrnl en respuesta a estímulos pro-hipertroóficos y a estrés cardíaco, a continuación se analizaron los niveles circulantes de proteína Metrnl en ratones sometidos a un modelo experimental de inducción de hipertrofia cardíaca (mediante infusión de isoproterenol, ISO) y sus correspondientes controles (infundidos con tampón salino, CT).

Se encontró que los niveles plasmáticos de Metrnl aumentaron significativamente tras 7 días de infusión continua con ISO (Fig 28A).

Para determinar la potencial contribución de los diferentes tejidos a los niveles circulantes de Metrnl tras la inducción de la hipertrofia cardíaca en este modelo, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de Metrnl en corazón, tejido adiposo marrón (BAT), tejido adiposo blanco inguinal (iWAT) y epididimal (eWAT), hígado y músculo esquelético.

La expresión del ARNm de Metrnl se indujo de manera significativa en el corazón de los animales tratados con ISO, en comparación con los ratones CT, pero también en el tejido adiposo marrón y en el músculo esquelético (Fig 28B). Los niveles circulantes de Metrnl también aumentaron de manera significativa en estas condiciones.

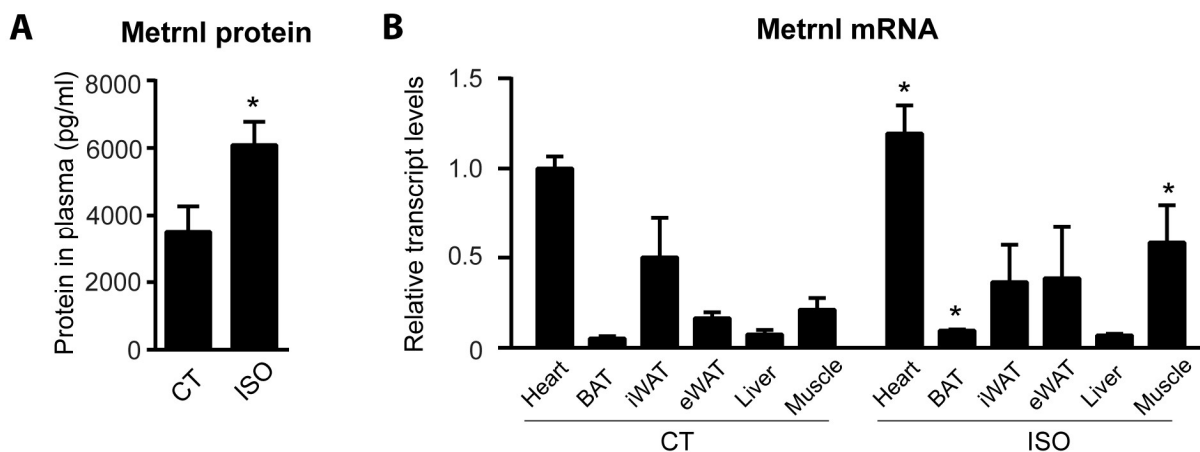


Figura 28. Contribución de diversos tejidos al aumento de los niveles circulantes de Metrnl tras la inducción experimental de hipertrofia cardíaca mediante ISO. (A) Niveles de proteína Metrnl en plasma en ratones infundidos con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. (B) Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en corazón, tejido adiposo marrón (BAT), tejido adiposo blanco inguinal (iWAT) y epididimal (eWAT), hígado y músculo esquelético. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con t-test (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente).

Estos datos indican que el corazón aumenta la secreción de Metrnl en respuesta al daño cardíaco. Sin embargo, no es posible determinar la relevancia de su aportación al aumento de los niveles circulantes en este modelo, puesto que otros tejidos también aumentan la producción de esta hormona en respuesta a la activación de los receptores β -adrenérgicos mediante isoproterenol.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se tuvo acceso a muestras de una gran cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca, en colaboración con el Hospital Germans Trias i Pujol. Con el objetivo de explorar más a fondo el valor de Metrnl como potencial biomarcador pronóstico en la insuficiencia cardíaca, se examinó el valor predictivo de la proteína Metrnl circulante para evaluar el riesgo de mortalidad dentro de esta cohorte (n=446; edad media=66,7 años (todos entre 59 y 76 años); 72,4% hombres y fracción de eyección del ventrículo izquierdo media de 34,8%).

En un análisis multivariable que incluyó niveles de Metrnl circulante, edad, sexo, fracción de eyección (LVEF), etiología isquémica y presencia de diabetes e hipertensión, únicamente los niveles de Metrnl (HR 1,18 (CI 95% 1,009-1,369); p=0,038), la edad (HR 1,06 (CI del 95%: 1,039-1,071); p<0,001) y el sexo (HR 0,69 (CI del 95% 0,483-0,985); p=0,041) fueron predictores independientes de muerte por cualquier causa (Tabla 3).

Curiosamente, tan solo la edad (HR 1,05 (IC 95% 1,03-1,07); p<0,001), los niveles circulantes de Metrnl (HR 1,12 (IC 95% 1,08-1,71); p=0,008) y la etiología isquémica (HR 1,70 (IC 95% 1,10-2,65); p=0,018) fueron predictores independientes de muerte por causas cardiovasculares (Tabla 3).

	All-Cause Death			Cardiovascular Death		
	HR	95% CI	P Value	HR	95% CI	P Value
Age, yrs	1.06	1.04-1.07	<0.001	1.05	1.03-1.07	<0.001
Female	0.69	0.48-0.99	0.041	0.86	0.67-1.49	0.600
ZLog(Metrnl)	1.18	1.01-1.37	0.038	1.12	1.08-1.71	0.008
LVEF	1.01	1.00-1.02	0.191	1.00	0.99-1.02	0.720
Ischemic etiology	1.07	0.79-1.46	0.646	1.70	1.10-2.65	0.018
Diabetes mellitus	1.33	0.99-1.80	0.062	1.26	0.82-1.93	0.300
Hypertension	1.06	0.75-1.48	0.758	1.03	0.62-1.71	0.920

Tabla 3. Estudio de supervivencia de Cox a partir de datos obtenidos de una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca (n=446; edad media=66,7 años), utilizando el método Fine&Gray de R essentials para SPPS. Los niveles circulantes de Metrnl se expresan como el logaritmo estandarizado de la concentración en plasma (HR= Hazard Ratio; CI= intervalo de confianza; LVEF= fracción de eyección del ventrículo izquierdo).

Estos datos indican que Metrnl es un nuevo y prometedor biomarcador pronóstico para pacientes con insuficiencia cardíaca. Dentro de la cohorte con insuficiencia cardíaca, niveles más elevados de Metrnl correlacionan con un mayor riesgo de mortalidad en esta población.

Los ratones deficientes en Metrnl desarrollan hipertrofia del septo interventricular y son más sensibles a la fibrosis

Las observaciones previas indican que el corazón es un sitio de expresión y secreción relevante de Metrnl, y que Metrnl es un biomarcador para enfermedades cardíacas. El paso siguiente fue indagar en el papel de Metrnl en corazón, determinando en primer

lugar el impacto de la ausencia de Metrnl en un modelo animal, utilizando ratones Metrnl^{-/-}.

Los ratones Metrnl^{-/-} no mostraron ninguna alteración importante en los valores morfométricos o metabólicos generales en condiciones basales. Únicamente se observó una reducción leve en los depósitos de tejido adiposo blanco y en los niveles circulantes de triglicéridos, en concordancia con el papel de esta proteína en el tejido adiposo en ratón (Li et al., 2015b).

Se analizó la morfología del corazón de los ratones deficientes en Metrnl tras 7 días de infusión continua con tampón salino como control (CT) o con isoproterenol (ISO) para inducir hipertrofia cardíaca. En condiciones basales, la proporción entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (HW/TL) no se alteró en los ratones Metrnl^{-/-} en comparación con los ratones wt (Tabla 4).

Después de 7 días de infusión con ISO, la relación HW/TL aumentó significativamente tanto en ratones wt como en ratones Metrnl^{-/-}, en comparación con los animales no tratados correspondientes (CT), independientemente del genotipo. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la presión arterial en ninguno de los genotipos, en ninguna de las condiciones experimentales ni de los genotipos.

Se realizaron medidas ecocardiográficas de los animales tras 7 días de infusión con isoproterenol (ISO) o con tampón salino como control (CT). En condiciones basales, no se detectaron diferencias entre genotipos en el grosor del septo interventricular (IVS) o la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW), en condiciones de sístole o diástole, según lo determinado por la ecocardiografía (Tabla 4). Curiosamente, después del tratamiento con ISO, los ratones Metrnl^{-/-} desarrollaron un aumento significativo tanto en el grosor del IVS como de la LVPW, mientras que en los ratones wt solo se produjo hipertrofia significativa en la LVPW, pero no en el septo interventricular (IVS) (Tabla 4).

	CT		ISO	
	wt	Metrnl -/-	wt	Metrnl -/-
HW/TL (mg/mm)	6.88 ± 0.16	7.33 ± 0.28	8.75 ± 0.33***	8.59 ± 0.18*
IVSd (mm)	0.58 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.04	0.69 ± 0.03###***
LVPWd (mm)	0.69 ± 0.07	0.67 ± 0.44	1.02 ± 0.25*	0.78 ± 0.05#*
LVIDd (mm)	4.21 ± 0.19	4.06 ± 0.33	4.14 ± 0.15	4.15 ± 0.11
IVSs (mm)	0.92 ± 0.08	0.88 ± 0.12	1.05 ± 0.14	1.20 ± 0.08###***
LVPWs (mm)	0.93 ± 0.08	0.80 ± 0.06	1.23 ± 0.18*	1.02 ± 0.08###*
LVIDs (mm)	3.08 ± 0.17	3.27 ± 0.09	2.96 ± 0.18	2.97 ± 0.77**
EF (%)	59.3 ± 2.7	50.8 ± 5.1#	61.1 ± 3.1	62.3 ± 2.7***
FS (%)	27.2 ± 1.6	22.0 ± 2.8#	27.8 ± 2.0	28.8 ± 1.8***
HR (bpm)	308.2 ± 63.6	358.6 ± 70.8	474.6 ± 91.3*	511.8 ± 27.4*
EDV (mm ³)	79.4 ± 8.7	73.1 ± 13.6	76.1 ± 6.6	76.3 ± 4.6
ESV (mm ³)	37.5 ± 5.2	43.1 ± 3.0	34.1 ± 5.0	34.2 ± 2.2*
H/R ratio	0.33 ± 0.04	0.34 ± 0.05	0.49 ± 0.13*	0.38 ± 0.02#
LVm (g/m ²)	93.3 ± 5.6	84.2 ± 7.2	126.5 ± 27.6*	110.3 ± 9.9*

Tabla 4. Parámetros ecocardiográficos de ratones wt y Metrnl-/- después de 7 días de infusión con isoproterenol. Las medidas corresponden al septo interventricular (IVS), la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) y el diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID) después de sístole (s) o de diástole (d), fracción de eyección (EF), fracción de acortamiento (FS), frecuencia cardíaca (HR), volumen después de diástole (EDV) y sístole (ESV), relación entre el grosor de la pared y el radio (indicador de la tendencia hacia hipertrofia excéntrica o concéntrica) (H/R) y masa del ventrículo izquierdo (LVm). Las medidas se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

Se realizó un análisis histológico de los corazones de estos animales, a partir de secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), y se cuantificó el área de la sección transversal de los cardiomiocitos (CSA) de la pared del ventrículo izquierdo y del septo interventricular (Fig 29A).

Se encontró que, en condiciones basales, el área de los cardiomiocitos era significativamente mayor en los ratones Metrnl-/- en ambas paredes, en comparación con los ratones wt. Con el tratamiento con ISO, el área de los cardiomiocitos aumentó significativamente en los ratones Metrnl-/- y wt, pero en el caso de los ratones Metrnl-/- este aumento fue mucho mayor en el septo interventricular.

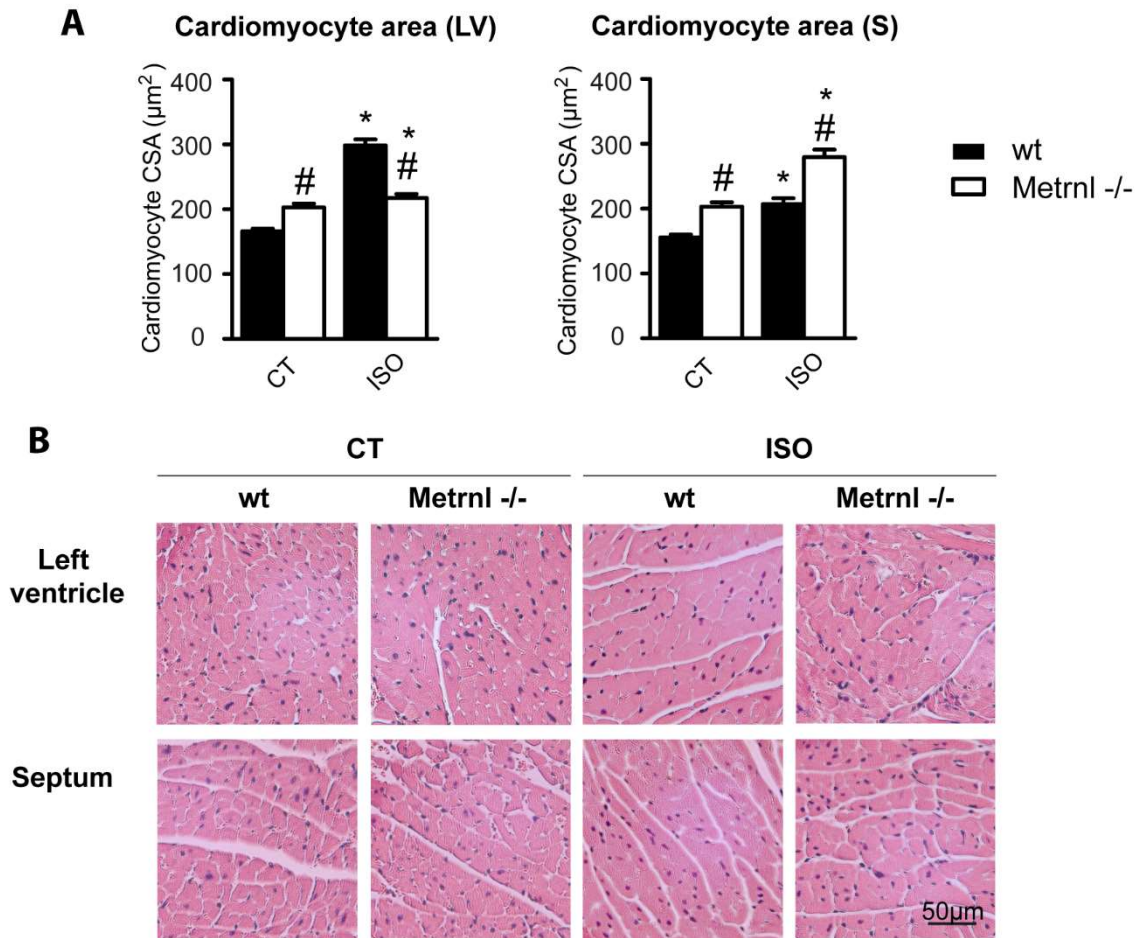


Figura 29. (A) Área de la sección transversal de los cardiomiocitos y (B) secciones cardíacas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), correspondientes al ventrículo izquierdo (LV) o al septo interventricular (S) de animales wt (barras negras) y Metrnl^{-/-} (barras blancas) control y tratados con ISO durante 7 días (20x aumentos; escala 50µm). Los resultados se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

Por tanto, se concluyó que, aunque la ausencia de Metrnl no condujo a ninguna alteración distintiva respecto al peso del corazón, sí que provocó una remodelación cardíaca anormal, provocando un aumento mucho mayor en el grosor y el área de los cardiomiocitos en el septo interventricular en respuesta al tratamiento con ISO.

Los indicios morfológicos de las alteraciones cardíacas en los ratones Metrnl^{-/-} fueron acompañados por algunos trastornos funcionales (Tabla 4). La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (EF) y la fracción de acortamiento (FS) se redujeron significativamente en los ratones Metrnl^{-/-} en comparación con los ratones wt en condiciones basales, indicando signos de insuficiencia cardíaca. Tanto la fracción de eyección (EF) como la fracción de acortamiento (FS) aumentaron significativamente en

los ratones *Metrnl*^{-/-} tratados con ISO, mientras que estos parámetros no se vieron afectados por el tratamiento en los ratones wt.

Los niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia ANP (*Nppa*) y α -actinina (*Acta1*) fueron similares en los ratones wt y *Metrnl*^{-/-} en condiciones basales (Fig 30).

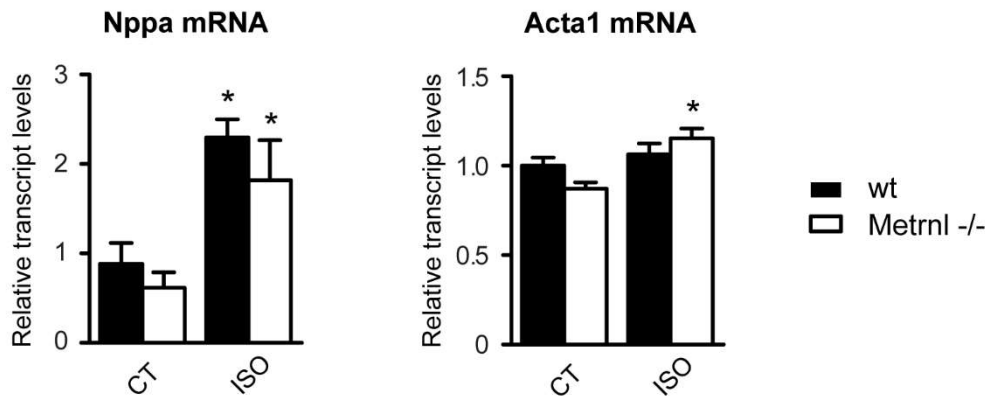


Figura 30. Niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia *Nppa* y *Acta1* en ratones wt (barras negras) y *Metrnl*^{-/-} (barras blancas) control y tratados con isoproterenol (ISO) durante 7 días. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente).

Tras 7 días de infusión con ISO, los niveles de expresión de *Nppa* aumentaron de manera similar en ambos genotipos, mientras que la expresión de *Acta1* solo se indujo significativamente en los ratones *Metrnl*^{-/-}.

Para evaluar la incidencia de la fibrosis cardíaca, se realizó la tinción tricrómica de Masson en secciones histológicas de muestras cardíacas de los animales wt y *Metrnl*^{-/-}, control y tratados con ISO (Fig 31A). Posteriormente, se cuantificaron las áreas fibróticas a partir de las imágenes obtenidas.

Además, se evaluó la expresión del ARNm de los marcadores de fibrosis colágeno 3 (*Col3a1*) y factor de crecimiento transformante β (*Tgfb*) (Fig 31B).

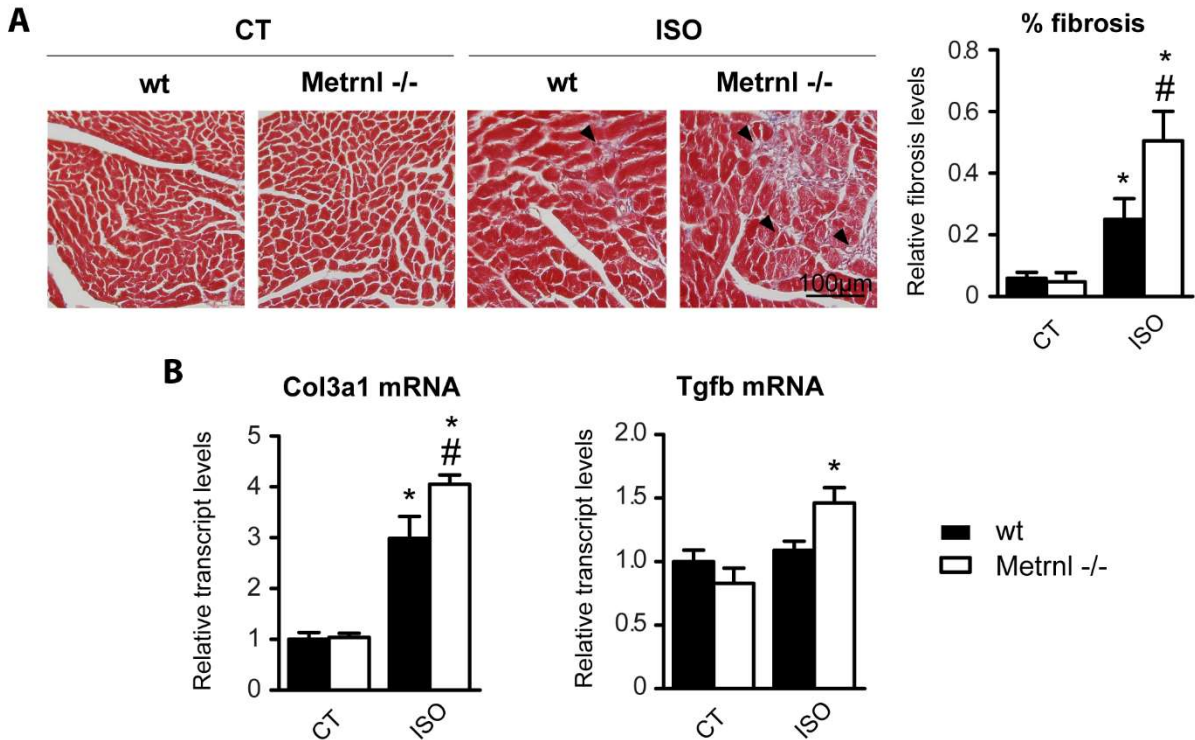


Figura 31. (A) Determinación de la fibrosis en secciones histológicas de corazón de ratones wt y *Metrnl*^{-/-} en condiciones control o tratados 7 días con isoproterenol (ISO), teñidas con la tinción tricrómica de Masson (20x aumentos; escala 100µm). Las flechas marcan las áreas fibróticas (en azul). (B) Niveles de expresión cardíaca del ARNm de los marcadores de fibrosis *Col3a1* y *Tgfb* en ratones wt (barras negras) y *Metrnl*^{-/-} (barras blancas) en condiciones control o tratados 7 días con isoproterenol (ISO). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo wt correspondiente).

Estos resultados indican que la incidencia de la fibrosis provocada por el tratamiento con ISO fue mayor en los ratones *Metrnl*^{-/-} en comparación con los wt.

En conjunto, la ausencia de *Metrnl* en corazón promueve el desarrollo de alteraciones cardíacas y sensibiliza a los ratones frente a la disfunción cardíaca y otros trastornos asociados, como la fibrosis. Además, la falta de *Metrnl* se asocia con un patrón de hipertrofia cardíaca diferente al de los ratones wt, con un mayor engrosamiento del septo interventricular.

La sobreexpresión cardíaca específica de Metrnl previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca

Para investigar más a fondo el papel de Metrnl en la biología cardíaca, se utilizó un modelo de recuperación de la expresión de Metrnl específicamente en corazón en el modelo de ratón. Se sabe que el serotipo 9 de los virus adeno-asociados (AAV9) se dirige preferentemente al corazón, con una transducción mínima en el resto de tejidos (Bär et al., 2014). Esta especificidad fue confirmada mediante la detección de la proteína verde fluorescente (GFP), contenida en el vector AAV9-CMV-eGFP, en secciones histológicas de diversos órganos, incluyendo el corazón (Fig 32A).

La recuperación específica de Metrnl en corazón, mediada por el vector AAV9, se confirmó mediante el análisis de los niveles de expresión del ARNm en los distintos tejidos de animales Metrnl^{-/-} (Fig 32B). Los ratones Metrnl^{-/-} inyectados con el AAV9-CMV-Metrnl mostraron altos niveles de expresión de Metrnl en corazón, niveles de expresión mucho más bajos en músculo esquelético, y niveles prácticamente indetectables en el resto de tejidos analizados.

Encontramos que la recuperación de la expresión de Metrnl en corazón, mediada por el AAV9, normalizó e incluso aumentó ligeramente los niveles circulantes de la proteína Metrnl en los ratones Metrnl^{-/-} (Fig 32C), lo cual refuerza la hipótesis de que la proteína Metrnl secretada por el corazón es capaz de modificar los niveles circulantes a nivel sistémico.

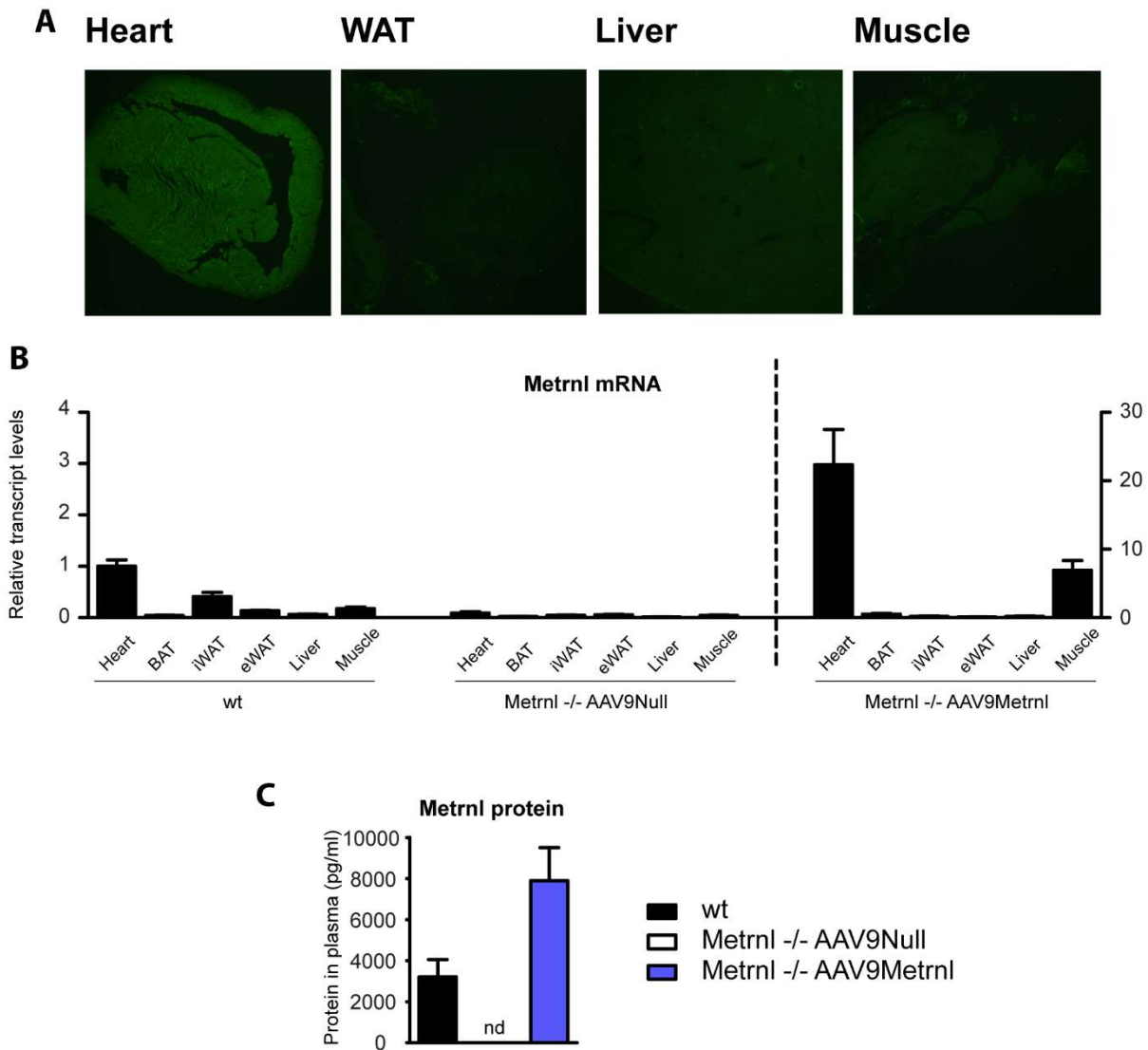


Figura 32. (A) Secciones histológicas de corazón, tejido adiposo blanco (WAT), hígado y músculo esquelético de ratones inyectados con AAV9-CMV-eGFP. (B) Niveles de expresión del ARNm de *Metrnl* en corazón, tejido adiposo marrón (BAT), tejido adiposo blanco inguinal y epididimal (iWAT y eWAT), hígado y músculo esquelético, en ratones wt, *Metrnl*^{-/-} inyectados con un AA9 nulo y *Metrnl*^{-/-} inyectados con un AAV9-CMV-*Metrnl*. (C) Niveles circulantes de proteína *Metrnl* en ratones wt, *Metrnl*^{-/-} inyectados con un AA9 nulo y *Metrnl*^{-/-} inyectados con un AAV9-CMV-*Metrnl*. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo).

Los ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con el vector vacío (AA9-CMV-Null), utilizado como vector de control, y con el vector con *Metrnl* (AAV9-CMV-*Metrnl*) se infundieron de manera continua con isoproterenol (ISO) durante 7 días para inducir hipertrofia cardíaca.

Tal como se esperaba, tras los 7 días de infusión con ISO, la relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (HW/TL) aumentó en los ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con el AAV-Null, en comparación con el grupo control (CT) no tratado (Fig 33A). Por el contrario, en el caso de los ratones *Metrnl*^{-/-} en los que la expresión de *Metrnl* fue inducida en el corazón mediante la inyección del AAV9-*Metrnl*, la relación HW/TL, indicativa del desarrollo de hipertrofia cardíaca, se redujo significativamente.

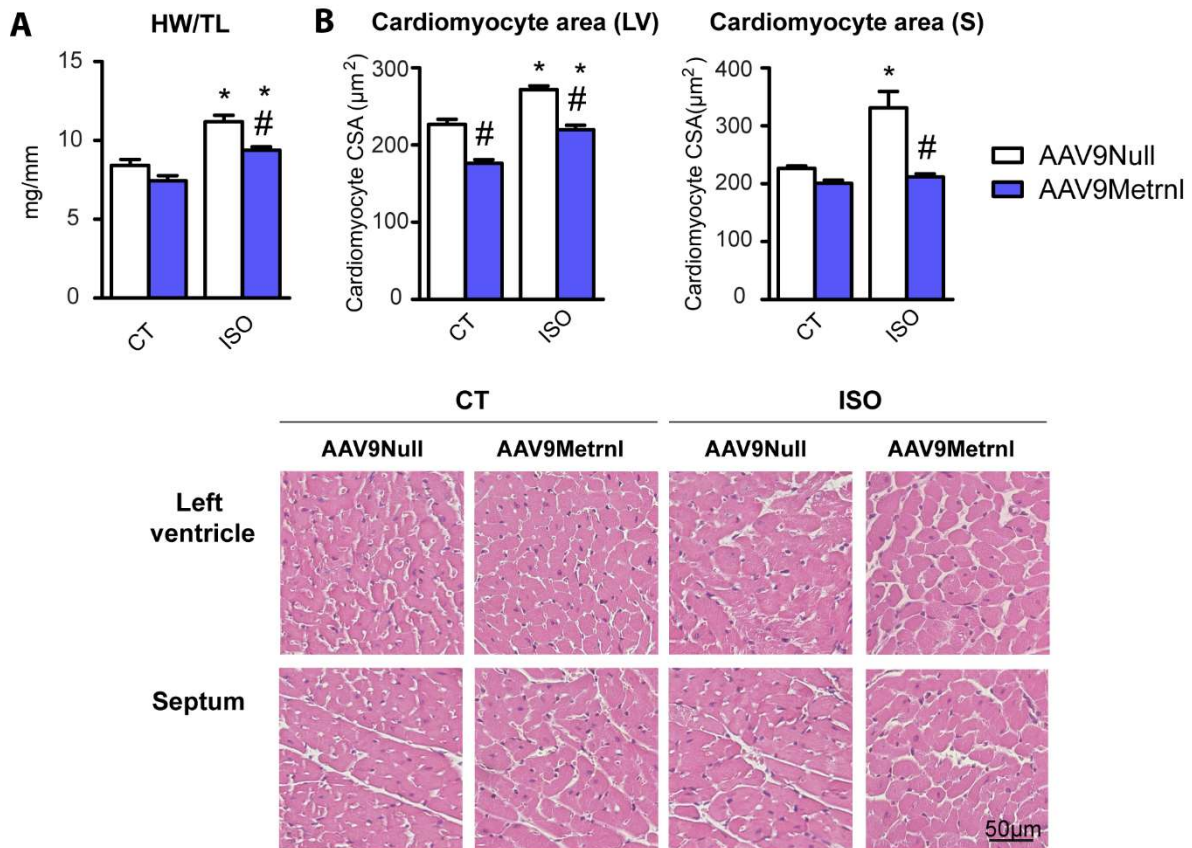


Figura 33. La recuperación de la expresión cardíaca de *Metrnl* mediante el vector AAV9-*Metrnl* protege frente al desarrollo de la hipertrofia. (A) Relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia en ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null (barras blancas) y AAV9-*Metrnl* (barras azules), tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. (B) Área de la sección transversal de los cardiomiocitos de la pared del ventrículo izquierdo (LV) y del septo interventricular (S) y secciones cardíacas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), correspondientes al ventrículo izquierdo o al septo interventricular (20x aumentos; escala 50µm). Los resultados se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo AAV9-Null correspondiente).

El examen histológico de las secciones cardíacas correspondientes al ventrículo izquierdo y al septo interventricular, teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), confirmaron que el área de la sección transversal de los cardiomiocitos se reducía

significativamente en los ratones Metrnl^{-/-} inyectados con AAV9-Metrnl tratados con ISO, respecto a los ratones inyectados con el vector AAV9 nulo tratados con ISO, que sí desarrollaron una marcada hipertrofia cardíaca (Fig 33B).

Las mediciones ecocardiográficas realizadas a estos animales tras 7 días de tratamiento con ISO revelaron que el volumen después de diástole (EDV), el grosor del septo interventricular (IVS) en diástole y sístole, el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) en diástole y el diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole tendían a ser más bajos en los ratones inyectados con AAV9-Metrnl tratados con ISO en comparación con sus correspondientes controles inyectados con el AA9-Null, alcanzando la significación estadística en el caso del IVSd (Tabla 5).

	CT		ISO	
	AAVNull	AAVMetrnl	AAVNull	AAVMetrnl
IVSd (mm)	0.59 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.87 ± 0.04***	0.80 ± 0.12**
LVPWd (mm)	0.64 ± 0.01	0.66 ± 0.09	0.86 ± 0.04**	0.79 ± 0.10
LVIDd (mm)	4.34 ± 0.30	4.26 ± 0.36	4.55 ± 0.08	4.29 ± 0.29
IVSs (mm)	1.02 ± 0.04	0.80 ± 0.06	1.48 ± 0.07****	1.25 ± 0.02#****
LVPWs (mm)	0.76 ± 0.02	0.84 ± 0.05	1.11 ± 0.05**	1.15 ± 0.09**
LVIDs (mm)	3.23 ± 0.27	3.41 ± 0.17	3.24 ± 0.13	3.15 ± 0.19
EF (%)	57.4 ± 2.7	47.2 ± 3.3	61.7 ± 3.3	59.0 ± 4.1
FS (%)	26.0 ± 1.7	20.4 ± 1.7	28.8 ± 2.1	27.0 ± 2.5
HR (bpm)	392.6 ± 27.1	292.6 ± 29.1	485.2 ± 8.8*	453.4 ± 12.9#****
EDV (mm ³)	87.5 ± 13.8	81.9 ± 7.2	95.1 ± 4.3	83.4 ± 6.1
ESV (mm ³)	43.9 ± 9.0	48.4 ± 5.8	42.8 ± 4.2	40.2 ± 5.5
H/R ratio	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.01
LVm (g/m ²)	97.1 ± 13.8	88.2 ± 5.3	164.3 ± 2.9***	132.9 ± 15.5#*

Tabla 5. Parámetros ecocardiográficos de ratones Metrnl^{-/-} inyectados con AAV9Null o AAV9Metrnl después de 7 días de infusión con isoproterenol. Las medidas corresponden al septo interventricular (IVS), la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) y el diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID) después de sístole (s) o de diástole (d), fracción de eyección (EF), fracción de acortamiento (FS), frecuencia cardíaca (HR), volumen después de diástole (EDV) y sístole (ESV), relación entre el grosor de la pared y el radio (H/R) y masa del ventrículo izquierdo (LVm). Las medidas se expresan como media ± SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con two-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo AAV9Null correspondiente).

Sin embargo, la masa del ventrículo izquierdo (LVm), calculada a partir de los parámetros de las ecocardiografías, se redujo significativamente en los ratones inyectados con AAV9-Metrnl tratados con ISO respecto a los ratones inyectados con el AAV9 nulo correspondientes.

En conjunto estos resultados indican que la recuperación cardíaca de la expresión de Metrnl en los ratones Metrnl^{-/-} es capaz de revertir la hipertrofia cardíaca.

La expresión del ARNm de los genes marcadores de hipertrofia cardíaca, Nppa y Acta1, fue similar en los ratones Metrnl^{-/-} independientemente de la inyección con el AAV9-Metrnl o con el vector control AAV9-Null en condiciones basales (Fig 34).

Sin embargo, la infusión con ISO durante 7 días provocó un aumento en los niveles de expresión del ARNm de Nppa y Acta1 en los ratones inyectados con el AAV9-Null, pero este efecto se redujo significativamente en los ratones inyectados con el AAV9-Metrnl tratados con ISO.

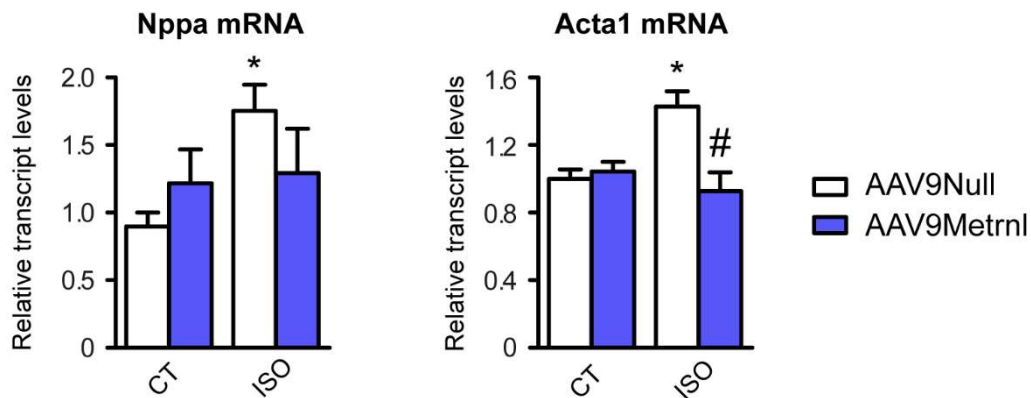


Figura 34. Niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia Nppa y Acta1 en ratones Metrnl^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null (barras blancas) y AAV9-Metrnl (barras azules), tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo AAV9Null correspondiente).

Respecto a la incidencia de la fibrosis en los corazones de estos animales, encontramos que la infusión con ISO durante 7 días conducía a un aumento sustancial en las áreas fibróticas (evaluadas en secciones cardíacas mediante la tinción tricrómica de Masson) y a la consecuente inducción de la expresión del ARNm de Col3a1 y Tgfb en los ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con el AAV9-Null. En cambio, tanto los niveles expresión del marcador Tgfb como el área afectada por la fibrosis se redujeron significativamente en los ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con AAV9-*Metrnl* (Fig 35A, B).

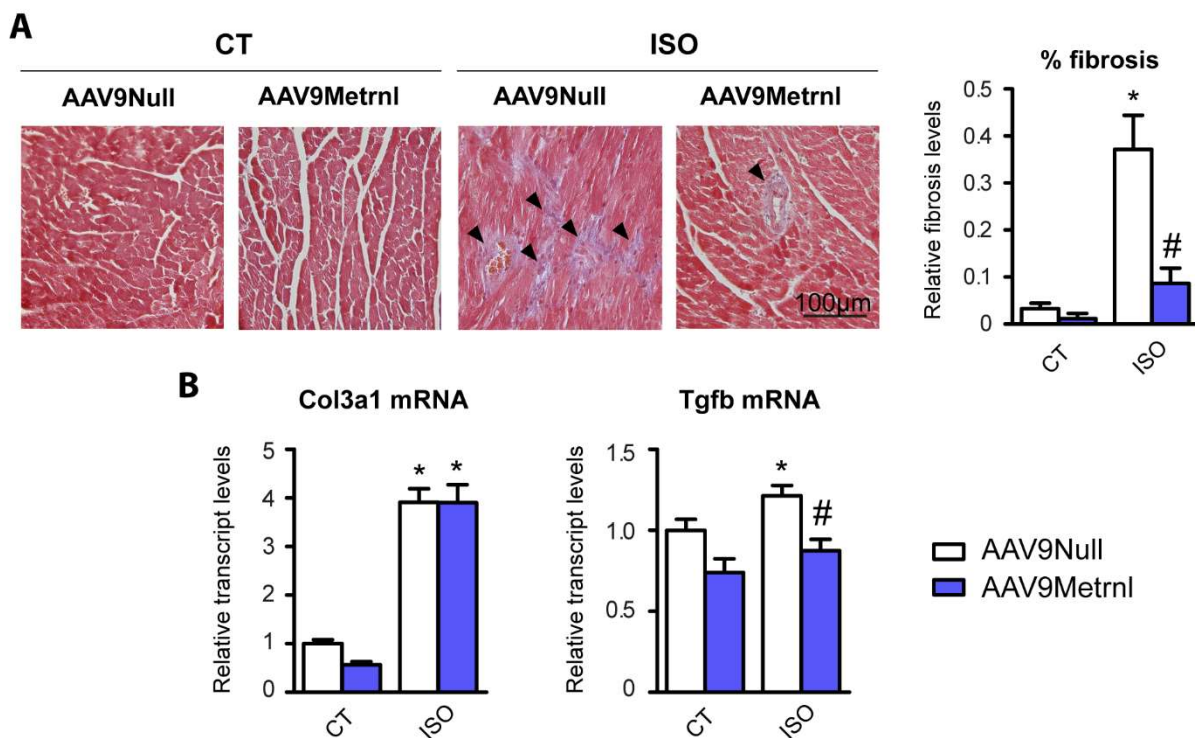


Figura 35. (A) Determinación de la fibrosis en secciones histológicas de corazón, teñidas con la tinción tricrómica de Masson (20x aumentos; escala 100µm), procedentes de ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null (barras blancas) y AAV9-*Metrnl* (barras azules), tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. Las flechas marcan las áreas fibróticas (en azul). (B) Niveles de expresión cardíaca del ARNm de los marcadores de fibrosis Col3a1 y Tgfb en ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null (barras blancas) y AAV9-*Metrnl* (barras azules), tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo AAV9Null correspondiente).

En base a estos hallazgos, se llegó a la conclusión de que la sobreexpresión cardíaca de la proteína Metrnl es capaz de prevenir la hipertrofia cardíaca y otros trastornos asociados como el desarrollo de fibrosis.

Metrnl induce los programas génicos de oxidación de ácidos grasos y activación alternativa de macrófagos (M2) en tejido cardíaco

Dada la estrecha asociación entre las alteraciones en la vía de oxidación de los ácidos grasos (FAO) y la hipertrofia cardíaca (Planavila et al., 2005; Smeets et al., 2008a), se examinó la expresión de varios genes relacionados con esta vía.

Los niveles de expresión del ARNm de piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (Pdk4), carnitina palmitoiltransferasa (Cp1tb), acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (Acadm) y coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador peroxisómico y (Ppargc1a, PGC1 α) disminuyeron notablemente en los ratones Metrnl^{-/-} inyectados con el AAV9 nulo tras el tratamiento con ISO, tal como era de esperar (Fig 36A).

La sobreexpresión cardíaca de Metrnl mediada por el vector AAV9-Metrnl indujo un aumento de los niveles de expresión del ARNm de Pdk4 y Ppargc1a en corazón. Además, los niveles de proteína de PGC1 α en corazón aumentaron significativamente en los ratones inyectados con el AAV9-Metrnl (Fig 36B).

En general, estos resultados indican que la sobreexpresión de Metrnl y la consecuente reversión de la hipertrofia cardíaca se asocian con la activación de la vía de PGC1 α y de la oxidación de ácidos grasos.

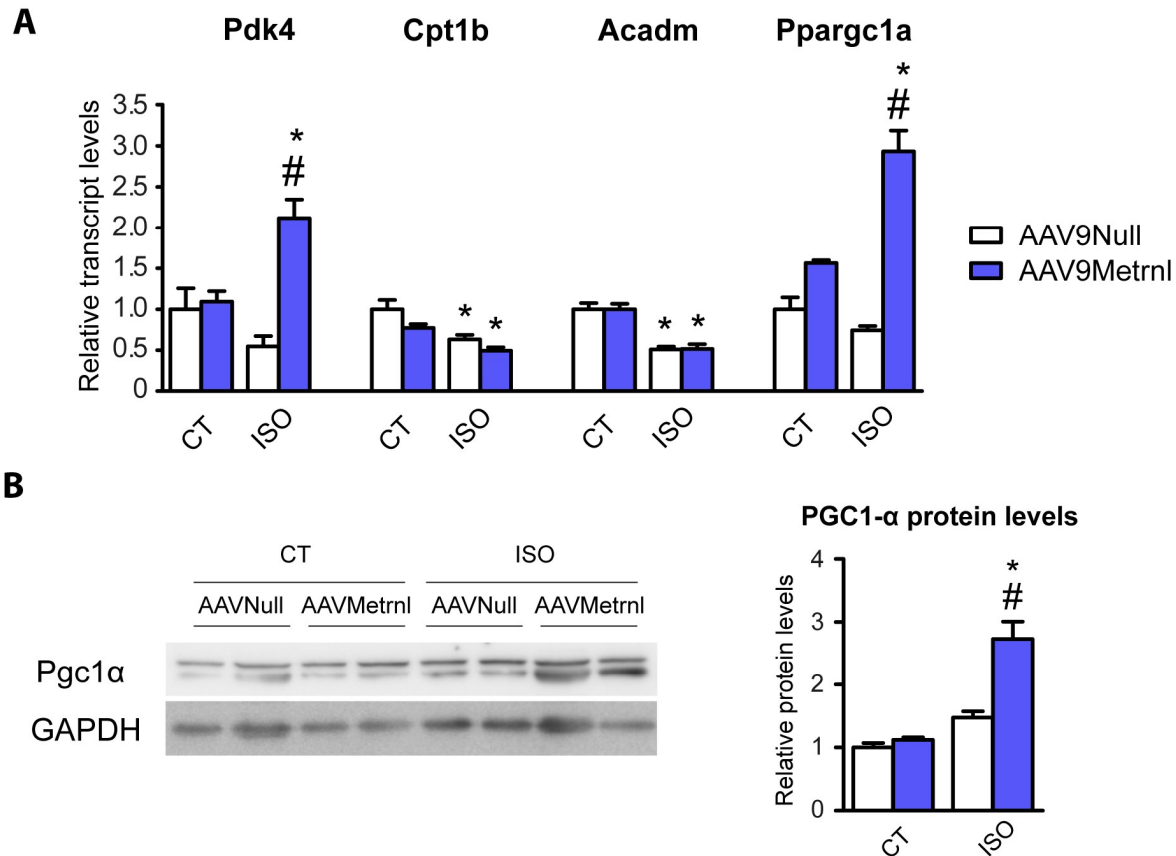


Figura 36. (A) Niveles cardíacos de expresión del ARNm de Pdk4, Cpt1b, Acadm y Ppargc1a en ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null (barras blancas) y AAV9-Metrnl (barras azules), tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. (B) Inmunoblot representativo de los niveles de la proteína PGC1 α en ratones *Metrnl*^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null y AAV9-Metrnl, tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo AAV9Null correspondiente).

Teniendo en cuenta que un ambiente pro-inflamatorio a menudo se asocia con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, y que hay varios reportes sobre el papel de *Metrnl* modulando las vías inflamatorias sistémicas y del tejido adiposo por diferentes mecanismos (Rao et al., 2014; Ushach et al., 2018), a continuación se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de genes implicados en la señalización de citocinas pro-inflamatorias de tipo M1, como IL6, MCP1 (*Ccl2*) y TNF α (*Tnfa*).

Se encontró que el tratamiento con ISO durante 7 días indujo la expresión de los marcadores de inflamación Il6, Ccl2 y Tnfa en el corazón de los ratones Metrnl^{-/-} inyectados con el AAV9-Null, pero no en los ratones inyectados con el vector AAV9-Metrnl, en los que los niveles de expresión del ARNm de Ccl2 y Tnfa se redujeron significativamente (Fig 37A).

Los niveles de expresión del ARNm de genes anti-inflamatorios, asociados con la señalización de citocinas de tipo 2, como Arg1, Cd163 y Mrc1, también fueron analizados en estas muestras (Fig 37B). Se descubrió que la sobreexpresión cardíaca de Metrnl incrementaba los niveles de transcripción de estos genes.

Es más, la sobreexpresión de Metrnl modificó la proporción de macrófagos M1 y M2, estimada en base a la relación de la expresión del ARNm de iNOS y Arg1 (Cereijo et al., 2018; Redondo-Angulo et al., 2016), que disminuyó significativamente en los ratones inyectados con el AAV9-Metrnl (Fig 37C).

Finalmente, la inmunodetección de macrófagos infiltrados en el tejido cardíaco (células positivas para F4/F80) indicó que no había diferencias significativas en la población total de macrófagos en ninguna de las condiciones analizadas (Fig 37D).

Dado que los eosinófilos han sido reportados como células diana de Metrnl en el tejido adiposo (Rao et al., 2014), se analizó también la expresión del ARNm de los genes marcadores de eosinófilos Il4 e Il13 en los corazones de estos animales. Sin embargo, no se logró detectar su expresión en ninguna de las condiciones experimentales.

En conjunto, estos datos indican que Metrnl no induce cambios masivos en la cantidad total de macrófagos infiltrados en el tejido cardíaco, sino que induce un cambio de un entorno M1 en respuesta al tratamiento con ISO, en el que predomina la señalización de citocinas pro-inflamatorias, a un entorno M2, donde predominan las citocinas con función anti-inflamatoria.

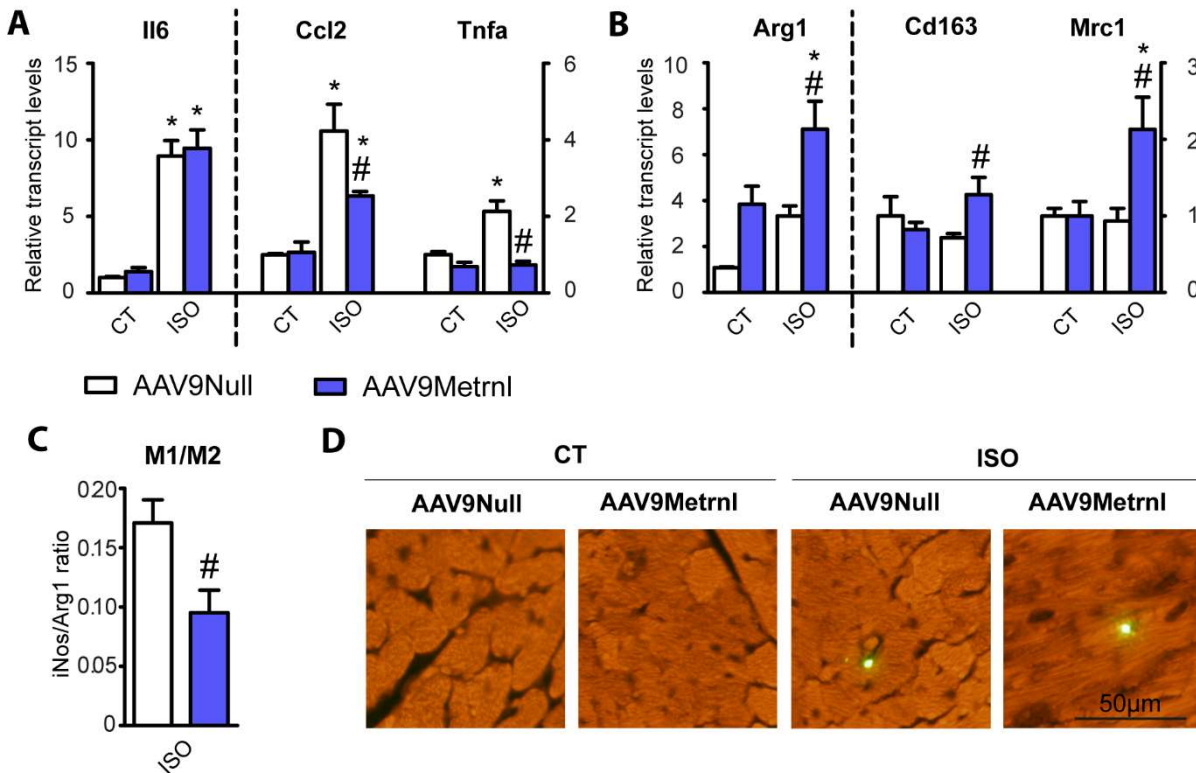


Figura 37. (A) Niveles cardíacos de expresión del ARNm de los marcadores M1 Il6, Ccl2 y Tnfa y (B) niveles cardíacos de expresión del ARNm de los marcadores M2 Arg1, Cd163 y Mrc1 en ratones Metrnl^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null (barras blancas) y AAV9-Metrnl (barras azules), tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. (C) Relación entre la expresión de iNOS y Arg1, indicadora de la proporción de macrófagos M1 y M2 en el tejido cardíaco. (D) Inmunodetección de macrófagos (F4/F80 positivos) en secciones de tejido cardíaco de ratones Metrnl^{-/-} inyectados con los vectores AAV9-Null y AAV9-Metrnl, tratados con tampón salino (CT) o isoproterenol (ISO) durante 7 días. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo AAV9Null correspondiente).

Dados estos resultados, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de los genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos y con la respuesta inflamatoria en el modelo de inducción de hipertrofia mediante ISO en los ratones Metrnl^{-/-} en comparación con sus correspondientes controles wt.

Se encontró que los niveles de expresión cardíaca del ARNm de los genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos se reducían considerablemente en los ratones Metrnl^{-/-} en condiciones basales, mientras que los niveles en respuesta al tratamiento con ISO durante 7 días se mantuvieron similares en ambos genotipos (Fig 38A).

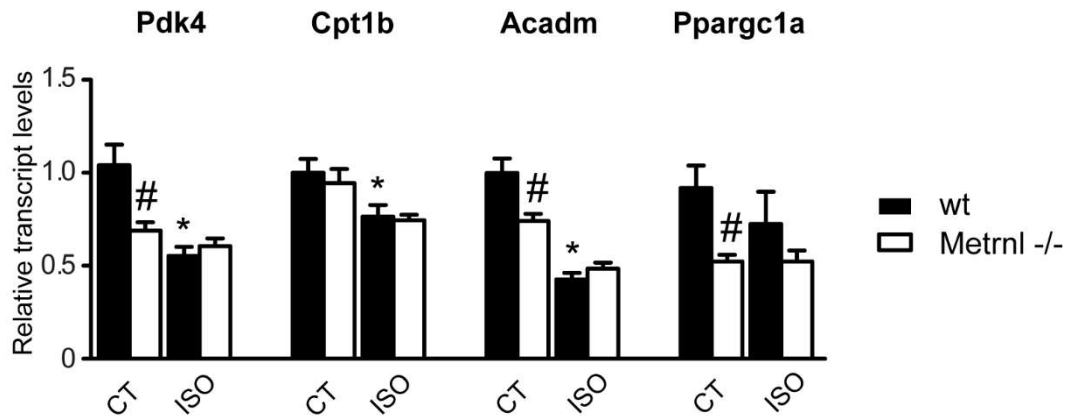


Figura 38. Niveles cardíacos de expresión del ARNm de Pdk4, Cpt1b, Acadm y Ppargc1a en ratones wt (barras negras) y Metrnl-/- (barras blancas) en condiciones control o tratados 7 días con isoproterenol (ISO). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

Además, aunque la expresión cardíaca de los genes pro-inflamatorios IL6, MCP1 (Ccl2) y TNF α (Tnfa) aumentó con el tratamiento con ISO independientemente del genotipo (Fig 39A), los niveles de expresión del ARNm de citocinas anti-inflamatorias de tipo 2 aumentaron únicamente en los ratones wt tras la inducción de hipertrofia, pero no en los ratones Metrnl-/- (Fig 39B).

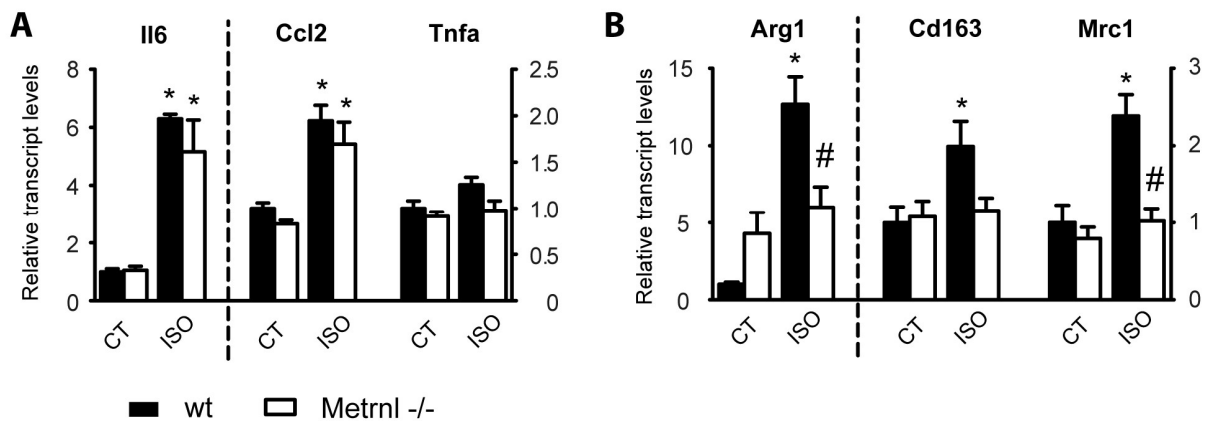


Figura 39. (A) Niveles cardíacos de expresión del ARNm de los marcadores M1 Il6, Ccl2 y Tnfa y (B) niveles cardíacos de expresión del ARNm de los marcadores M2 Arg1, Cd163 y Mrc1 en ratones wt (barras negras) y Metrnl-/- (barras blancas) en condiciones control o tratados 7 días con isoproterenol (ISO). Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=5 animales por grupo). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control correspondiente; #p<0,05 comparado con grupo wt correspondiente).

Metrnl actúa directamente sobre las células cardíacas y previene la hipertrofia de los cardiomiocitos

Para establecer si los efectos de Metrnl observados previamente en los modelos *in vivo* implican una acción directa de Metrnl sobre los cardiomiocitos, utilizamos el modelo de cardiomiocitos de ratas neonatales en cultivo primario (NCMs) para realizar los experimentos *in vitro*. Se estudiaron los efectos de Metrnl utilizando el modelo estándar de tratamiento con fenilefrina (PE) para inducir la hipertrofia de las células cardíacas.

El tratamiento con PE aumentó el área de la sección transversal de los cardiomiocitos (CSA), indicando la inducción de la hipertrofia a nivel celular, mientras que el tratamiento de estas células con proteína Metrnl recombinante (tratadas durante las 24 horas previas a la inducción de la hipertrofia con PE, y durante las 24 horas siguientes) atenuó significativamente el aumento del tamaño celular inducido por el tratamiento con fenilefrina (Fig 40A). Los niveles de expresión del ARNm de los marcadores moleculares de hipertrofia *Nppa* y *Acta1* aumentaron en concordancia con la hipertrofia inducida por el tratamiento con PE, y este efecto se redujo en las células tratadas previamente con Metrnl (Fig 40B).

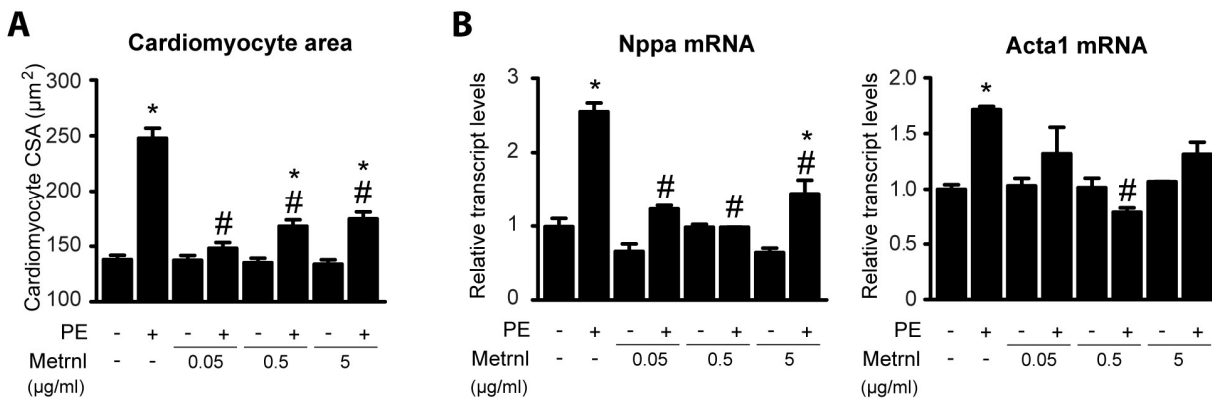


Figura 40. Efectos de Metrnl sobre la hipertrofia en cardiomiocitos en cultivo. (A) Área de la sección transversal y (B) niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia *Nppa* y *Acta1* en cardiomiocitos de ratas neonatales en cultivo, tratados con fenilefrina (PE) durante 24 horas y con Metrnl recombinante durante las 24 horas previas a añadir la PE y las 24 horas posteriores. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control sin PE correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo control sin Metrnl correspondiente).

Además, la sobreexpresión de Metrnl en los cardiomiocitos en cultivo, a través de la transducción mediada por vectores adenovirales, aumentó 20 veces la expresión normal de Metrnl en los NCMs (Fig 41A) y evitó la hipertrofia inducida por fenilefrina (PE) en estas células.

El área de la sección transversal de los cardiomiocitos tratados con PE y sobreexpresando Metrnl se redujo significativamente respecto a células tratadas con PE e infectadas con un vector vacío (AdNull) (Fig 41B), igual que los niveles expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia Nppa y Acta1 (Fig 41C).

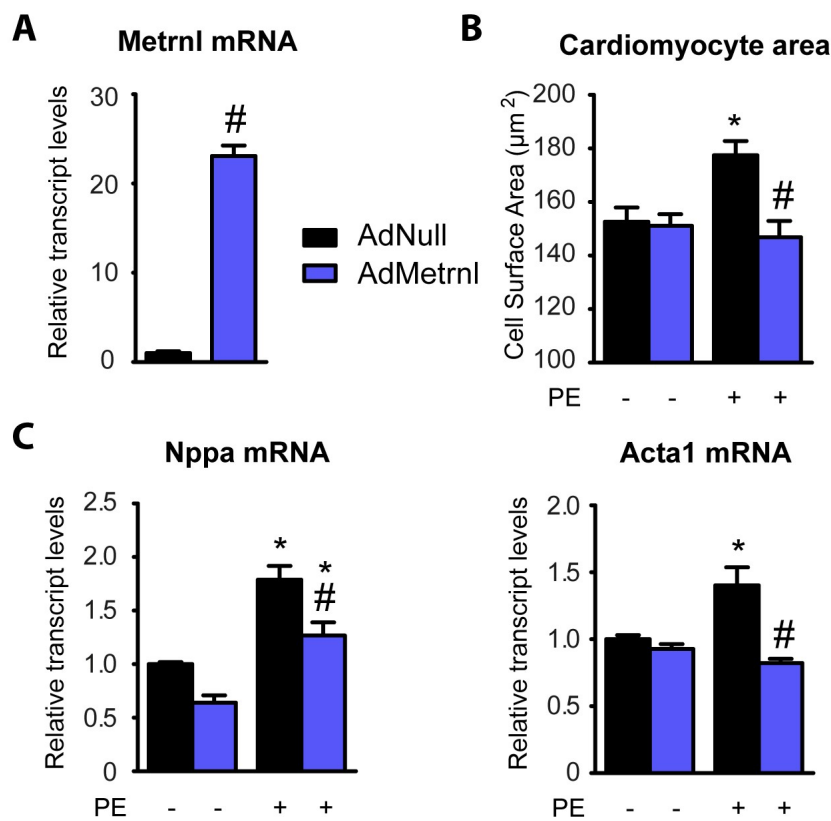


Figura 41. Efectos de la sobreexpresión Metrnl sobre la hipertrofia en cardiomiocitos en cultivo. (A) Niveles de expresión del ARNm de Metrnl en cardiomiocitos infectados con un adenovirus nulo (AdNull) (barras negras) o con Metrnl (AdMetrnl) (barras azules). (B) Área de la sección transversal y (C) niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia Nppa y Acta1 de cardiomiocitos infectados con adenovirus nulo o Metrnl y tratados con fenilefrina (PE) durante 24 horas. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control sin PE correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo AdNull correspondiente).

Tal como se ha descrito en estudios previos, los fibroblastos cardíacos de rata cultivados sobre un sustrato rígido se diferencian progresivamente de fibroblastos a miofibroblastos, un modelo representativo de la fibrosis cardíaca patológica (Ferrer-Curriu et al., 2019; Teunissen et al., 2007). Las células de pase 1 se consideran fibroblastos cardíacos (CF) y las células de pase 3 se consideran miofibroblastos cardíacos (CMF), según el aumento de la actina del músculo liso α (α -SMA o Acta2).

Se confirmó el aumento de la expresión de α -SMA a nivel de ARNm (gen Acta2) y de proteína en los CMF respecto a los CM (Fig 42). El tratamiento de células de ambos pases con Metrnl recombinante no modificó la expresión del ARNm ni los niveles de proteína α -SMA en CF o CMF, indicando que Metrnl no tiene ningún efecto directo sobre la fibrosis cardíaca en este modelo *in vitro*.

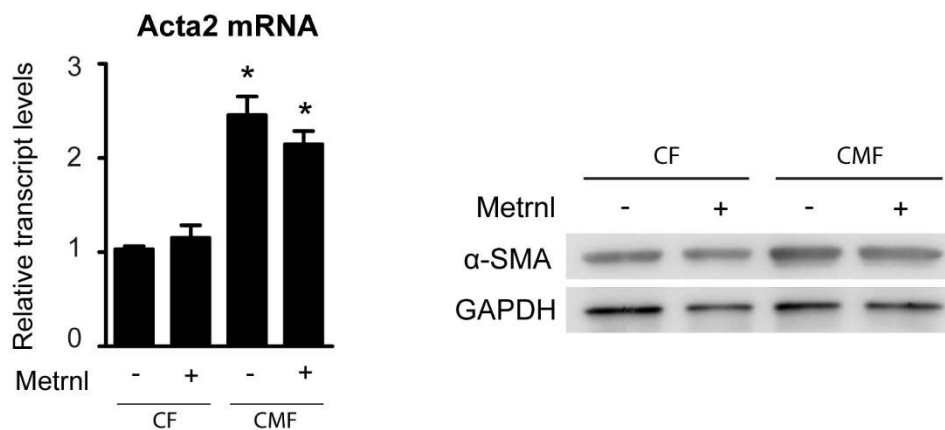


Figura 42. Efectos de Metrnl sobre la fibrosis cardíaca en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos en cultivo. Niveles de expresión del ARNm de Acta2 e inmunoblot representativo de los niveles de proteína α -SMA en fibroblastos cardíacos (pase 1) y miofibroblastos (pase 3) tratados con Metrnl recombinante. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control sin PE correspondiente).

Estos datos indican que Metrnl tiene efectos directos sobre los cardiomiocitos, a los que protege frente a la hipertrofia cardíaca. Sin embargo, no parece tener una acción directa sobre los fibroblastos cardíacos.

Metrnl actúa de manera autocrina sobre las células cardíacas

Teniendo en cuenta el doble papel de las células cardíacas como diana y fuente de Metrnl, se planteó si esta proteína podría tener un papel autocrino directo sobre los cardiomiocitos.

Se trataron los cardiomiocitos primarios en cultivo con un anticuerpo contra Metrnl, con el objetivo de neutralizar la proteína secretada al medio por los propios cardiomiocitos. La adición del anticuerpo neutralizante contra Metrnl al medio de cultivo de los NCMs aumentó significativamente el área de la sección transversal de las células (Fig 43A), así como los niveles de expresión del ARNm de los genes marcadores de hipertrofia, Nppa y Acta1 respecto a los cardiomiocitos tratados con un anticuerpo control contra IgG (Fig 43B). En los cardiomiocitos tratados con PE para inducir hipertrofia se observó cierta tendencia al aumento de la expresión del gen Nppa en presencia del anticuerpo contra Metrnl.

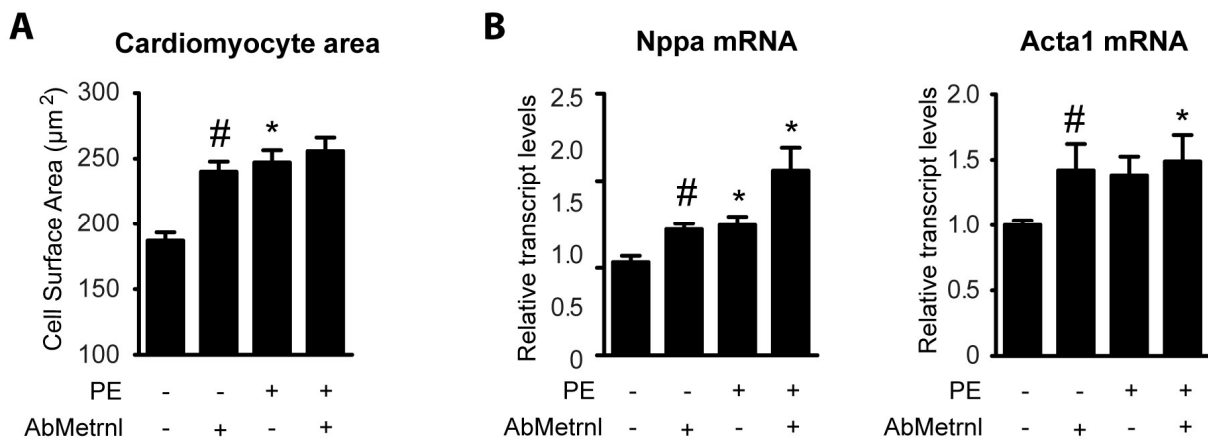


Figura 43. Efectos autocrinos de Metrnl sobre los cardiomiocitos. (A) Área de la sección transversal y (B) niveles de expresión del ARNm de los marcadores de hipertrofia Nppa y Acta1 de cardiomiocitos tratados con anticuerpo contra IgG como control y anticuerpo contra Metrnl en el medio de cultivo. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (* $p < 0,05$ comparado con grupo control sin PE correspondiente; # $p < 0,05$ comparado con grupo con anticuerpo contra IgG correspondiente).

En conjunto, estos resultados muestran que el bloqueo de la actividad de la proteína Metrnl producida y secretada de manera endógena por los cardiomiocitos favorece la inducción de hipertrofia en estas células, confirmando así un papel autocrino para la Metrnl secretada por los cardiomiocitos.

Finalmente, teniendo en cuenta el desconocimiento de los receptores de Metrnl, realizamos un *screening* de varias posibles vías de señalización por las que podría estar actuando Metrnl en las células cardíacas.

Se determinaron los efectos del tratamiento con Metrnl en el modelo de cardiomiocitos en cultivo sobre un conjunto de vías de señalización intracelulares mediadas por cinasas (AKT, ERK, JNK, NF- κ B, p38, CREB, p70S6K, STAT3 y STAT5), utilizando un sistema Multiplex.

Se encontraron dos proteínas cuya fosforilación se inducía en respuesta al tratamiento con Metrnl: el factor de transcripción CREB y la proteína p38-MAPK (Fig 44A). La fosforilación de ambas proteínas en este mismo experimento se confirmó mediante su detección en inmunoblot (Fig 44B).

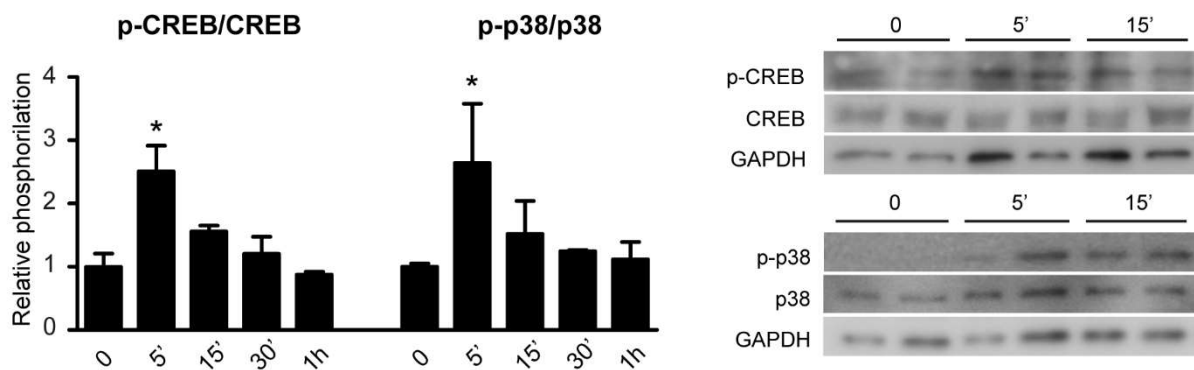


Figura 44. Metrnl activa las vías de CREB y p38-MAPK en cardiomiocitos. (A) Niveles de fosforilación relativa de las proteínas CREB y p38 en cardiomiocitos control o tratados con Metrnl durante 5, 15, 30 o 60 minutos. (B) Inmunoblot representativo de los niveles de CREB y p38 fosforiladas respecto a niveles de CREB y p38 totales en cardiomiocitos control o tratados con Metrnl durante 5 y 15 minutos. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control).

También se encontró que la expresión del gen que codifica por PGC1 α , que es una diana conocida de CREB y p38-MAPK en otros sistemas celulares, se inducía en respuesta al tratamiento con Metrnl en los cardiomiocitos en cultivo (Fig 45).

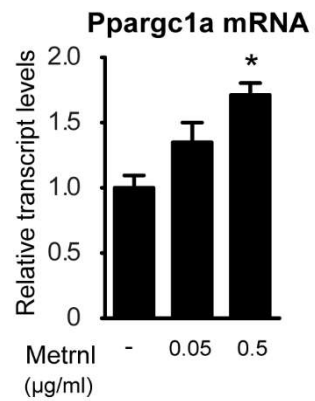


Figura 45. Niveles de expresión del ARNm de Ppargc1a (PGC1 α) en cardiomiocitos en cultivo tratados con Metrnl. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n=3 cultivos independientes). Análisis estadístico realizado con one-way ANOVA (*p<0,05 comparado con grupo control).

Colectivamente, estos resultados indican que Metrnl activa directamente las vías intracelulares de CREB y p38-MAPK, que a su vez regulan la transcripción de PGC1 α en las células cardíacas.

Discusión

El corazón es un órgano flexible, capaz de adaptarse a las demandas metabólicas del organismo en una amplia variedad de situaciones. Como se ha visto en las últimas décadas, su función no se limita exclusivamente al bombeo de la sangre hacia los órganos periféricos, sino que también es un órgano endocrino con capacidad para secretar hormonas o cardiocinas que regulan su propia función y pueden afectar a la del resto de tejidos.

En la presente tesis doctoral se ha descrito por primera vez el impacto de la proteína FGF21 en la regulación de la acumulación de lípidos a nivel cardíaco en un modelo de obesidad inducida por la dieta. Paralelamente, se ha descubierto por primera vez la función como cardiocina de la proteína Metrnl, demostrando su claro papel cardioprotector.

El papel de FGF21 en la acumulación cardíaca de lípidos

La función cardioprotectora de FGF21 fue descrita por primera vez por nuestro grupo (Planavila et al., 2013). FGF21 es una proteína secretable producida mayormente por el hígado, que actúa como un regulador metabólico relacionado con el control de la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a insulina, la cetogénesis y la activación termogénica (Badman et al., 2007; Gälman et al., 2008; Hondares et al., 2010; Inagaki et al., 2007; Kharitononkov et al., 2005).

En el estudio publicado por nuestro grupo se describió que el corazón es un tejido diana tanto del FGF21 sistémico como del producido a nivel local por los cardiomiocitos (Planavila et al., 2013). Los ratones deficientes en FGF21 presentan hipertrofia y otras alteraciones cardíacas en estado basal, que se ven exacerbadas en respuesta al tratamiento con el activador β -adrenérgico isoproterenol, llevando al desarrollo de hipertrofia excéntrica y disfunción cardíaca. El tratamiento con FGF21 es capaz de revertir estos efectos *in vivo* e *in vitro*.

Se ha descrito previamente que FGF21 tiene un papel protector frente a la obesidad, aumentando el gasto energético basal mediante un incremento de la actividad termogénica (Dunbar et al., 2008; Emanuelli et al., 2014). Sin embargo, aunque los niveles circulantes de FGF21 aumentan en la obesidad, la función de FGF21 en estas

condiciones se ve atenuada por la desensibilización y el desarrollo de resistencia a sus efectos (Gallego-Escuredo et al., 2015). En nuestras condiciones experimentales, la obesidad inducida por una dieta rica en grasas durante 16 semanas también aumentó los niveles circulantes de FGF21.

La dieta rica en grasas tuvo efectos sistémicos similares en los animales *Fgf21*^{-/-} y en los animales wt, coincidiendo con datos de estudios previos (Fisher et al., 2010). No se observaron cambios respecto al aumento del peso corporal, los niveles de glucosa y de ácidos grasos circulantes, reforzando los datos previos sobre la resistencia a los efectos de FGF21 desarrollada en los animales wt en estas condiciones. Precisamente esta resistencia impide que los altos niveles circulantes de esta hormona sean beneficiosos para el metabolismo global. Los niveles de insulina circulante tras la dieta HF fueron más bajos en los animales *Fgf21*^{-/-}, probablemente debido a que la media de la edad de los ratones era ligeramente menor en este grupo en comparación con los animales wt y no desarrollaron tanta resistencia a los efectos de la insulina en respuesta a la dieta.

A nivel cardíaco, los niveles de expresión de FGF21 también aumentaron en nuestro modelo de dieta HF. Sin embargo, los niveles de expresión del co-receptor β -klotho, necesario para la señalización de FGF21, se redujeron en los ratones wt alimentados con la dieta rica en grasas, en concordancia con la resistencia global a las acciones de FGF21 previamente descrita en condiciones de obesidad, y más concretamente a la resistencia observada en muestras cardíacas de ratas obesas (Patel et al., 2014; Tanajak et al., 2016).

Sin embargo, la ausencia de FGF21 exacerbó la hipertrofia cardíaca asociada con la obesidad en comparación con los ratones wt, a pesar de la reducción de los niveles de β -klotho que se observa en los mismos. Esto indica que la resistencia a los efectos de FGF21 inducida en el corazón en condiciones de obesidad no anula por completo los efectos protectores de esta cardiocina. Alternativamente, un estudio reciente realizado en tejido adiposo blanco plantea la posibilidad de que la resistencia a los efectos de FGF21 no esté mediada por la reducción de los niveles de β -klotho (Markan et al., 2017). En este caso, el rescate específico de la expresión del co-activador en el tejido adiposo blanco de ratones alimentados con dieta HF no fue capaz de rescatar la señalización de FGF21, como muestra la falta de fosforilación de ERK1/2, una de las principales vías activadas por esta hormona.

Por tanto, es posible que la reducción de los niveles de β -klotho que observamos en los ratones wt no tenga un impacto tan relevante sobre la vía de señalización de FGF21 en nuestras condiciones. Esto explicaría la falta de alteraciones graves en los ratones wt sometidos a la dieta HF, mientras que los ratones *Fgf21*^{-/-} sí que desarrollan hipertrofia y disfunción cardíaca al tener totalmente anulada la señalización por FGF21.

Cabe destacar que, a pesar de la falta de diferencias entre genotipos a nivel sistémico, el desarrollo de alteraciones cardíacas en los ratones *Fgf21*^{-/-} tanto en condiciones control como tras las 16 semanas de dieta rica en grasas refuerza el hecho de que los efectos de FGF21 sobre este órgano son directos. A pesar de que también se ha postulado que los efectos cardioprotectores asociados con FGF21 podrían ser indirectos y estar mediados por la adiponectina (Joki et al., 2015), los niveles circulantes de esta proteína no fueron significativamente diferentes entre grupos en nuestras condiciones experimentales. Esto sugiere que el papel cardioprotector de FGF21 es directo sobre los cardiomiocitos, en lugar de un efecto indirecto mediado por un aumento de los niveles de adiponectina.

La acumulación exacerbada de lípidos que observamos en el corazón de los animales *Fgf21*^{-/-} alimentados con la dieta rica en grasas es consistente con estudios previos, que muestran que la ausencia de esta proteína empeora la acumulación cardíaca de lípidos en modelos de diabetes (Yan et al., 2015; Zhang et al., 2015a). No obstante, en estos trabajos no se describen los mecanismos moleculares responsables de esta acumulación de lípidos en el corazón de los ratones *Fgf21*^{-/-}. Por otro lado, se conoce que en condiciones de obesidad se produce una reducción general de la actividad autofágica en tejidos como el hígado y el corazón (An et al., 2017; Castañeda et al., 2019; Hsu et al., 2016; Koga et al., 2010). Sin embargo, se desconoce la potencial relevancia de la lipofagia en estas condiciones, concretamente en relación con la disfunción cardíaca observada en los modelos de obesidad.

La acumulación anormal de gotas lipídicas en el corazón se considera un marcador característico de la cardiomiopatía provocada por la obesidad o la diabetes (Fukushima and Lopaschuk, 2016a). En estas condiciones, el metabolismo cardíaco sufre alteraciones que llevan a una mayor captación y consumo de ácidos grasos, con la consecuente acumulación de metabolitos lipídicos potencialmente tóxicos (Zhou et al.,

2000). Como consecuencia, la función mitocondrial se deteriora, se induce la apoptosis en los cardiomiocitos y finalmente se desarrolla disfunción cardíaca.

Varios estudios previos relacionan a la proteína FGF21 con la regulación de la autofagia cardíaca en un contexto de diabetes (Zhang et al., 2016) o con la regulación de la lipofagia en el hígado (Zhu et al., 2016). En ambos casos, el tratamiento con FGF21 promueve la activación de la autofagia y parece tener efectos beneficiosos sobre la función cardíaca. Sin embargo, la relación directa entre las acciones de FGF21 y la regulación de la lipofagia en el corazón se ha demostrado por primera vez en la presente tesis doctoral, en la que determinamos que la regulación de la lipofagia podría ser otro de los mecanismos cardioprotectores mediados por FGF21, con el objetivo de contrarrestar los efectos negativos de esta lipotoxicidad. En conjunto, los resultados obtenidos y publicados durante esta tesis indican que la falta de FGF21 provoca el bloqueo de la autofagia, y más concretamente de la lipofagia, llevando a una acumulación de lípidos exacerbada en respuesta a la dieta rica en grasas, con los consecuentes efectos adversos sobre la función cardíaca.

En nuestras condiciones experimentales, tras una dieta rica en grasas de larga duración (16 semanas) observamos una acumulación excesiva de lípidos en los animales *Fgf21*^{-/-}. Los animales wt no presentaron diferencias significativas en la cantidad de gotas lipídicas. Sin embargo, en ambos casos el exceso de grasa en la ingesta provocó una aceleración de la oxidación de ácidos grasos mitocondrial y signos de disfunción cardíaca, coincidiendo con estudios previos (Buchanan et al., 2005; Mazumder et al., 2004). En cambio, en contraste con resultados previos obtenidos en nuestro grupo en otros modelos de disfunción cardíaca (Planavila et al., 2013; Redondo-Angulo et al., 2017), en este caso no encontramos efectos debidos a la ausencia de FGF21 sobre la tasa de oxidación de ácidos grasos.

Existe todavía cierta controversia respecto a los efectos de la dieta rica en grasas sobre el corazón. Se cree que el aumento del uso de ácidos grasos como sustrato en estas condiciones es una consecuencia de los altos niveles de ácidos grasos circulantes y del aumento de la actividad de PPAR α , que determina la capacidad oxidativa de los cardiomiocitos mediante la regulación de la expresión de otros genes (Bugger and Abel, 2014). Sin embargo, la regulación de los niveles de expresión de PPAR α y de PGC1 α en

humanos no es tan clara, especialmente en pacientes que han desarrollado insuficiencia cardíaca (Kolwicz Jr et al., 2014). A esto se suma la llamada “paradoja de la obesidad”. La obesidad es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, aunque los individuos obesos con una enfermedad cardiovascular ya establecida tienen mejor pronóstico que los pacientes no obesos que desarrollan una (Fonarow et al., 2007). La composición de ácidos grasos de la dieta también juega un papel importante en las consecuencias que tendrá la alimentación con una dieta rica en grasas sobre la estructura y la función cardíaca (Van Bilsen and Planavila, 2014).

En nuestro caso, no observamos signos de hipertrofia cardíaca en los ratones wt alimentados con la dieta HF durante 16 semanas. Los efectos sobre la función cardíaca también fueron moderados. Aparentemente, estos resultados contrastan con la creencia establecida de que la obesidad predispone a la disfunción cardíaca, y de que una dieta rica en grasas provoca hipertrofia y finalmente insuficiencia cardíaca (Ceylan-Isik et al., 2013; Ouwens et al., 2005). Sin embargo, múltiples estudios han reportado que los efectos de la dieta rica en grasas sobre la función cardíaca son moderados, y no van necesariamente acompañados del desarrollo de hipertrofia (Yan et al., 2009). Factores como la composición y la duración de la dieta, o las diferencias entre especies, podrían explicar los resultados contradictorios entre distintas publicaciones (Bugger and Abel, 2014).

En definitiva, la conclusión de nuestro estudio es que la ausencia de FGF21 predispone al desarrollo de hipertrofia, dilatación y fibrosis cardíaca en respuesta a una dieta obesogénica. Ninguna de estas alteraciones se observa claramente en los ratones wt, lo que refuerza el papel crítico de la proteína FGF21 para un correcto funcionamiento cardíaco. En este caso, demostramos que FGF21 es un mediador clave para el mantenimiento de la función cardíaca en el contexto de la obesidad. Por primera vez, hemos establecido que FGF21 es un componente relevante en el conjunto de vías de señalización que regulan la autofagia durante el desarrollo de la cardiomiopatía asociada con la obesidad.

Las implicaciones biomédicas de nuestros resultados, así como los efectos de la dieta rica en grasas y la obesidad sobre la función cardíaca, son un campo abierto a tener en cuenta en próximos estudios.

Metrl: una nueva cardiomiocina con función protectora

Metrl fue descrita por primera vez como una proteína secretada por el músculo esquelético y por el tejido adiposo blanco en respuesta al ejercicio o a la exposición al frío, respectivamente. Los efectos de Metrl para el organismo son beneficiosos: aumenta el gasto energético basal y reduce la inflamación (Rao et al., 2014). A pesar de que en este mismo estudio ya se describieron niveles elevados de expresión de Metrl en el corazón, en comparación con el resto de los tejidos analizados, no se conoce hasta la fecha ningún estudio publicado sobre la función cardíaca de esta proteína.

En la presente tesis doctoral se ha identificado la proteína Metrl como una nueva cardiocina, demostrando por primera vez que los cardiomiocitos expresan y secretan Metrl en cantidades detectables, y que además este órgano es un tejido diana en el cual la función de Metrl es protectora.

La ausencia de Metrl se asocia con la presencia de alteraciones cardíacas, incluyendo una mayor incidencia de la hipertrofia, la fibrosis y la disfunción cardíaca. En el modelo de inducción de hipertrofia cardíaca *in vivo*, en el que tratamos a los animales con un agonista β -adrenérgico (ISO) durante 7 días, los ratones Metrl^{-/-} desarrollaron un patrón de hipertrofia diferente al de los animales wt. Mientras que los ratones wt desarrollaron hipertrofia en la pared del ventrículo izquierdo, en los ratones Metrl^{-/-} se engrosó más la pared del septo interventricular, dando lugar a un patrón de hipertrofia más asimétrico. Esto, en combinación con una fibrosis perivascular e intersticial más marcada, indica una peor respuesta y una remodelación patológica en respuesta a esta situación de estrés cardíaco.

Desconocemos los mecanismos mediante los cuales la ausencia de Metrl provoca el desarrollo de este patrón de hipertrofia asimétrica. El fenotipo cardíaco que observamos en los ratones Metrl^{-/-} recuerda al que desarrollan los pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, una de las principales causas de muerte súbita entre los jóvenes (Maron and Maron, 2013). En estos casos, la enfermedad está causada mayormente por mutaciones en proteínas estructurales de los sarcómeros. Puesto que hasta el momento los efectos de Metrl en corazón no habían sido estudiados, esta proteína podría tener alguna función más en los cardiomiocitos que no hemos identificado en este estudio,

quizá asociada con proteínas de la maquinaria contráctil. Por otra parte, se han descrito efectos directos de Metrnl sobre el crecimiento neuronal y el desarrollo en cerebro (Jørgensen et al., 2012). Esto nos lleva a pensar que tal vez Metrnl tenga alguna función relevante para el correcto desarrollo cardíaco, y que en su ausencia se producen alteraciones estructurales que se hacen más evidentes en presencia de un estrés cardíaco.

En concordancia con estos resultados, el rescate específico de la expresión cardíaca de Metrnl en los animales Metrnl^{-/-} previene el desarrollo del patrón de hipertrofia asimétrica observado en ausencia de Metrnl, cuando los animales se someten al mismo tratamiento pro-hipertrófico.

Los virus adeno-asociados utilizados, del subtipo AAV9, presentan un tropismo alto por el músculo cardíaco. Su especificidad fue comprobada en el laboratorio antes de realizar los experimentos de esta tesis. Una de las principales limitaciones del modelo en este contexto es que la recuperación de la expresión de Metrnl mediante virus adeno-asociados implica cierto grado de sobreexpresión de la proteína, aunque lo ideal sería recuperar los niveles fisiológicos presentes en los ratones wt. No obstante, los efectos de la recuperación de la expresión de la proteína Metrnl sobre el fenotipo observado en los animales Metrnl^{-/-} dejan claro que la ausencia de Metrnl causa ciertas alteraciones estructurales y funcionales en el corazón, que pueden ser revertidas al rescatar su expresión. La recuperación cardíaca de la expresión de Metrnl no solo evitó el desarrollo de hipertrofia del septo interventricular, sino que redujo significativamente el tamaño del corazón y la expresión de los marcadores de hipertrofia respecto a los animales Metrnl^{-/-} pero inyectados con el vector control.

Estos resultados se ven reforzados por los obtenidos en el modelo de cardiomiocitos primarios en cultivo. El tratamiento de los cardiomiocitos con Metrnl recombinante evita el desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida con el agonista α -adrenérgico fenilefrina (PE). En este caso, las concentraciones de Metrnl utilizadas para el tratamiento son similares a las concentraciones fisiológicas de la proteína, demostrando que Metrnl actúa directamente sobre las células cardíacas y protege frente a procesos hipertróficos. Además, los resultados obtenidos al inducir la sobreexpresión de Metrnl en los cardiomiocitos en cultivo, utilizando vectores adenovíricos, corrobora los

resultados observados en el modelo de sobreexpresión y recuperación *in vivo* y demuestra la protección directa frente a la hipertrofia por parte de Metrnl.

La capacidad de bloquear los efectos protectores de Metrnl sobre los cardiomiocitos, al añadir un anticuerpo específico contra esta proteína al medio de cultivo, indica que la propia Metrnl secretada por los cardiomiocitos tiene acciones autocrinas directas sobre este tejido, a parte de las acciones sistémicas. Además del potencial papel cardioprotector de la proteína Metrnl circulante, la secreción local de Metrnl en el contexto de daño cardíaco sirve como un sistema endógeno, autorregulado y cardioprotector. En los modelos de inducción de hipertrofia por infusión con isoproterenol, constricción de la aorta transversa e infusión con angiotensina II, los niveles de expresión cardíaca de Metrnl aumentan, posiblemente como un mecanismo a nivel local para tratar de evitar el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica. En conjunto, estos datos son consistentes con los cardiomiocitos siendo a la vez células productoras y diana de Metrnl, y con el papel protector de esta proteína.

Respecto a los mecanismos de regulación de la expresión de Metrnl, los datos obtenidos en los ratones deficientes en PPAR α , junto con los resultados de la sobre-expresión de este factor de transcripción y los efectos de su agonista sobre la expresión de Metrnl, indican que Metrnl se encuentra regulada a nivel transcripcional por PPAR α . Dado el reconocido papel protector de PPAR α en condiciones de daño cardíaco e hipertrofia, la inducción de la expresión de Metrnl por parte de este regulador transcripcional podría formar parte del conjunto de mecanismos que contribuyen a sus efectos.

En la actualidad, el receptor o receptores de Metrnl todavía no han sido identificados (Jørgensen et al., 2012), lo cual dificulta el estudio de las vías de señalización implicadas en las funciones de esta proteína. Realizamos un *screening* utilizando los kits de Milliplex MAP 9-plex, para detectar las posibles vías de señalización modificadas en respuesta a Metrnl. De todas las proteínas analizadas, Metrnl únicamente indujo la fosforilación de dos de ellas: la p38 MAPK y el factor de transcripción CREB. Se ha descrito que ambas cinasas están involucradas en la regulación transcripcional de PGC1 α en el corazón (Tuomainen and Tavi, 2017). En nuestros modelos, observamos una fuerte inducción de la expresión de PGC1 α en respuesta a la acción de Metrnl, tanto con la sobre-expresión *in vivo* como en los tratamientos *in vitro*. Mientras que la

función cardioprotectora de PGC1 α está ampliamente reconocida (Leone et al., 2005; Wöfl et al., 2009), tanto el papel de p38 MAPK como de CREB en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca es controvertido. Mientras algunas publicaciones indican que la activación de la p38 MAPK induce hipertrofia, otras refuerzan su posible implicación en vías cardioprotectoras (Braz et al., 2003). En cualquier caso, nuestros resultados muestran una relación directa entre las acciones de Metrnl sobre los cardiomiocitos y la inducción de la expresión de PGC1 α , probablemente un mediador relevante para los claros efectos cardioprotectores y anti-hipertróficos de Metrnl.

Cabe destacar que, pese a la evidente acción directa de Metrnl sobre los cardiomiocitos, los efectos protectores de Metrnl que observamos en nuestros modelos *in vivo* implican un patrón complejo de modificaciones en el miocardio, que incluyen la polarización de los macrófagos infiltrados hacia un fenotipo antiinflamatorio o M2. Estos cambios son consistentes con publicaciones previas que relacionan a la proteína Metrnl con la activación alternativa de macrófagos en el tejido adiposo (Rao et al., 2014). En nuestros animales no observamos las lesiones inflamatorias descritas por otros grupos en los ratones Metrnl $^{-/-}$ (Ushach et al., 2018), probablemente debido a que utilizamos animales relativamente jóvenes para nuestros experimentos.

Respecto a las alteraciones relacionadas con la fibrosis cardíaca, a pesar de que en los modelos *in vivo* observamos tanto una mayor incidencia de fibrosis en los animales Metrnl $^{-/-}$, como una gran recuperación de estas alteraciones cuando se rescata la expresión de Metrnl en estos animales, no hemos observado efectos protectores directos sobre los fibroblastos cardíacos. Los fibroblastos cardíacos en cultivo primario experimentan una transformación hacia miofibroblastos a medida que aumentan los pases en el cultivo celular. Como se ha mencionado anteriormente, los miofibroblastos proliferan en exceso, facilitan un ambiente inflamatorio y son en parte responsables de la remodelación patológica del corazón (Travers et al., 2017). El tratamiento con la proteína Metrnl no parece tener ningún efecto directo sobre esta diferenciación, por lo cual concluimos que sus efectos no son directos sobre los fibroblastos cardíacos sino posiblemente mediados por las acciones de esta proteína en otros tipos celulares presentes en el corazón. Al atenuar las señales inflamatorias y promover un perfil anti-

inflamatorio, Metrnl afecta indirectamente al desarrollo de la fibrosis en el miocardio y por tanto atenúa la remodelación patológica del corazón.

En esta tesis doctoral hemos demostrado el papel protector directo de Metrnl sobre los cardiomiocitos. Sin embargo, parece necesario profundizar en las acciones paracrinas de Metrnl sobre otros tipos celulares presentes en el entorno cardíaco, como las células inmunes o los fibroblastos.

Otro de los puntos que requiere más desarrollo es la contribución del corazón a los niveles circulantes de Metrnl. La inducción de hipertrofia mediante el tratamiento con fenilefrina aumenta la secreción de Metrnl por parte de los cardiomiocitos. Sin embargo, en el modelo *in vivo*, el tratamiento con isoproterenol a nivel sistémico aumenta la secreción de Metrnl por parte de otros tejidos, como el músculo esquelético. Por tanto, aunque se observa un aumento en los niveles circulantes de la proteína, sería necesaria una aproximación experimental distinta con tal de determinar la relevancia de la aportación del corazón a los niveles circulantes en respuesta al daño cardíaco y la hipertrofia. Se han publicado reportes en los que se describe la acción de otras cardiocinas (en concreto de los péptidos natriuréticos) sobre órganos distales (Bordicchia et al., 2012; Holtwick et al., 2002). Teniendo en cuenta que Metrnl tiene también funciones metabólicas y anti-inflamatorias, sería interesante determinar la aportación real del corazón en condiciones de daño cardíaco, y si esta podría ser suficiente para tener efectos protectores sobre otros órganos.

En el estudio realizado en colaboración con el Hospital Germans Trias i Pujol, hemos identificado por primera vez el potencial de la proteína Metrnl como marcador pronóstico en un contexto de patología cardíaca, más concretamente en una gran cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca. Nuestros resultados resaltan la relevancia de Metrnl como nueva cardiocina con implicaciones en el campo de la biomedicina. En el análisis realizado se observó que, dentro de una cohorte de pacientes con insuficiencia cardíaca, el aumento de los niveles circulantes de Metrnl era un fuerte predictor de mortalidad en general, y en concreto también de mortalidad por causas cardiovasculares, indicando una peor prognosis para estos pacientes.

Desde un punto de vista terapéutico, a parte del valor como biomarcador de Metrnl, cabe destacar su potencial utilidad en terapias génicas con virus adeno-asociados. Tal como muestran nuestros resultados, la sobreexpresión durante periodos prolongados de Metrnl en el corazón es capaz de revertir la hipertrofia cardíaca y la fibrosis, y podría tener un gran valor terapéutico. La terapia génica mediante virus adeno-asociados se ha aplicado ya en pacientes, con el primer tratamiento aprobado en la Unión Europea en 2012 (Glybera®). Sin embargo, todavía hay mucho que desconocemos sobre las vías de señalización activadas por Metrnl y sus posibles efectos, por lo que su aplicación terapéutica no es posible a corto plazo.

En conjunto, los resultados de esta tesis doctoral aportan nuevos conocimientos sobre la relevancia de dos cardiocinas: FGF21 y Metrnl. En la actualidad, resulta imposible entender el funcionamiento de los distintos órganos como entidades aisladas, por lo que cada vez adquiere más importancia el estudio de los factores que les permiten comunicarse entre ellos o preservar su propia función a nivel autocrino y paracrino. Desde el descubrimiento del potencial del corazón como órgano endocrino, el estudio de las cardiocinas se ha convertido en un nuevo campo de investigación con numerosas implicaciones biomédicas y un gran potencial terapéutico, dada la baja tasa de supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca y la poca eficiencia de las terapias actuales. El futuro de la cardiología molecular pasa por una mejor comprensión de estas interacciones con tal de tener una perspectiva más amplia del funcionamiento del corazón y de las enfermedades cardiovasculares.

Conclusiones

Parte 1: FGF21

1. La resistencia cardíaca a los efectos de FGF21 en ratones *wild type* desarrollada en respuesta a una dieta rica en grasas no es suficiente para provocar hipertrofia y disfunción cardíaca.
2. La ausencia total de FGF21 provoca una acumulación exacerbada de lípidos en el corazón y el desarrollo de hipertrofia cardíaca en ratones sometidos a una dieta rica en grasas.
3. El sistema FGF21 es necesario para una correcta regulación de la autofagia cardíaca en la obesidad. La ausencia de FGF21 provoca un bloqueo de la degradación autofágica de lípidos y su consecuente acumulación en el corazón.

En resumen, se ha identificado por primera vez el papel de la proteína FGF21 en la regulación de la autofagia cardíaca y su papel protector frente a la hipertrofia y la disfunción cardíaca en un contexto de obesidad.

Parte 2: Metrnl

4. Metrnl es una proteína producida y secretada por los cardiomiocitos. Su expresión se induce en respuesta a situaciones de daño cardíaco y está regulada por el factor de transcripción PPAR α .
5. La ausencia de Metrnl provoca el desarrollo de un patrón de hipertrofia asimétrica con un engrosamiento más acentuado del septo interventricular y una mayor incidencia de fibrosis en respuesta a estímulos pro-hipertróficos.
6. Metrnl tiene acciones autocrinas directas sobre los cardiomiocitos, pero no tiene efectos directos sobre los fibroblastos cardíacos.
7. Metrnl induce cambios en el perfil de activación de los macrófagos infiltrados en el tejido cardíaco. La sobre-expresión de Metrnl reduce el fenotipo M1 o pro-inflamatorio y promueve la activación alternativa de los macrófagos, con un perfil anti-inflamatorio.

8. Metrnl induce la activación de la p38 MAPK y CREB en los cardiomiocitos y promueve la expresión de PGC1 α , un co-activador transcripcional con potentes efectos cardioprotectores.
9. Metrnl es un potente biomarcador pronóstico en pacientes con insuficiencia cardíaca.

En resumen, se ha identificado por primera vez el papel de la proteína Metrnl como una nueva cardiocina con funciones protectoras frente a la hipertrofia y con un gran potencial como biomarcador de patología cardíaca.

Bibliografía

- Adams, A.C., Astapova, I., Fisher, F.M., Badman, M.K., Kurgansky, K.E., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., and Maratos-Flier, E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR α -dependent manner. *J. Biol. Chem.* *285*, 14078–14082.
- Akashi, Y.J., Springer, J., Lainscak, M., and Anker, S.D. (2007). Atrial natriuretic peptide and related peptides. *Clin. Chem. Lab. Med.* *45*, 1259–1267.
- Van Den Akker, F., De Jager, S.C.A., and Sluijter, J.P.G. (2013). Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: Immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors. *Mediators Inflamm.* *2013*.
- Álvarez-Guardia, D., Palomer, X., Coll, T., Davidson, M.M., Chan, T.O., Feldman, A.M., Laguna, J.C., and Vázquez-Carrera, M. (2010). The p65 subunit of NF- κ B binds to PGC-1, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc. Res.* *87*, 449–458.
- An, M., Ryu, D., Park, J.W., Choi, J.H., Park, E., Lee, K.E., Woo, M., and Kim, M. (2017). ULK1 prevents cardiac dysfunction in obesity through autophagy-mediated regulation of lipid metabolism. *1137–1147*.
- Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., Ahmad, F., Matsui, T., Chin, S., Wu, P.H., et al. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* *1*, 259–271.
- Arany, Z., Novikov, M., Chin, S., Ma, Y., Rosenzweig, A., and Spiegelman, B.M. (2006). Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10086–10091.
- Aubert, G., Vega, R.B., and Kelly, D.P. (2013). Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1833*, 840–847.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.
- Backs, J., Backs, T., Neef, S., Kreusser, M.M., Lehmann, L.H., Patrick, D.M., Grueter, C.E., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J.A., et al. (2009). The δ isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2342–2347.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab.* *5*, 426–437.
- Bae, J.Y. (2018). Aerobic Exercise Increases Meteorin-Like Protein in Muscle and Adipose Tissue of Chronic High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Biomed Res. Int.* *2018*, 1–8.
- Bär, C., De Jesus, B.B., Serrano, R., Tejera, A., Ayuso, E., Jimenez, V., Formentini, I., Bobadilla, M., Mizrahi, J., De Martino, A., et al. (2014). Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction. *Nat. Commun.* *5*, 1–14.
- Barger, P.M., Weinheimer, C.J., Kelly, D.P., Barger, P.M., Brandt, J.M., Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (2000). Deactivation of peroxisome proliferator – activated receptor- α during

cardiac hypertrophic growth Find the latest version : Deactivation of peroxisome proliferator – activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth. *105*, 1723–1730.

Barouch, L.A., Gao, D., Chen, L., Miller, K.L., Xu, W., Phan, A.C., Kittleson, M.M., Minhas, K.M., Berkowitz, D.E., Wei, C., et al. (2006). Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ. Res.* *98*, 119–124.

Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: Biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 235–253.

Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heide, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* (80-). *324*, 98–102.

Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., and McMullen, J.R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* *128*, 191–227.

Bhuiyan, S., Pattison, J.S., Osinska, H., James, J., Gulick, J., McLendon, P.M., Hill, J.A., Sadoshima, J., and Robbins, J. (2013). Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J. Clin. Invest.* *123*, 5284–5297.

Van Bilsen, M., and Planavila, A. (2014). Fatty acids and cardiac disease: Fuel carrying a message. *Acta Physiol.* *211*, 476–490.

Bobbert, T., Schwarz, F., Fischer-Rosinsky, A., Pfeiffer, A.F.H., Möhlig, M., Mai, K., and Spranger, J. (2013). Fibroblast growth factor 21 predicts the metabolic syndrome and type 2 diabetes in Caucasians. *Diabetes Care* *36*, 145–149.

Boengler, K., Schulz, R., and Heusch, G. (2009). Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc. Res.* *83*, 247–261.

Bookout, A.L., Groot, M.H.M. De, Owen, B.M., Lee, S., Lawrence, H.L., Ding, X., Elmquist, J.K., Joseph, S., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2014). on the Nervous System. *19*, 1147–1152.

Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., and Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J. Clin. Invest.* *122*, 1022–1036.

Bories, G.F.P., and Leitinger, N. (2017). Macrophage metabolism in atherosclerosis. *FEBS Lett.* *591*, 3042–3060.

Bowers, S.L.K., Banerjee, I., and Baudino, T.A. (2010). The extracellular matrix: At the center of it all. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 474–482.

Brahma, M.K., Adam, R.C., Pollak, N.M., Jaeger, D., Zierler, K.A., Pöcher, N., Schreiber, R., Romauch, M., Moustafa, T., Eder, S., et al. (2014). Fibroblast growth factor 21 is induced upon cardiac stress and alters cardiac lipid homeostasis. *J. Lipid Res.* *55*, 2229–2241.

Braz, J.C., Bueno, O.F., Liang, Q., Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Parsons, S., Braunwart, J., Glascock, B.J., Klevitsky, R., Kimball, T.F., et al. (2003). Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J. Clin. Invest.* *111*, 1475–1486.

Bruneau, B.G., Piazza, L.A., and De Bold, A.J. (1996). α 1-Adrenergic stimulation of isolated rat

atria results in discoordinate increases in natriuretic peptide secretion and gene expression and enhances Egr-1 and c-Myc expression. *Endocrinology* 137, 137–143.

Bruneau, B.G., Piazza, L.A., and De Bold, A.J. (2017). BNP gene expression is specifically modulated by stretch and ET-1 in a new model of isolated rat atria. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 273, H2678–H2686.

Buchanan, J., Mazumder, P.K., Hu, P., Chakrabarti, G., Roberts, M.W., Ui, J.Y., Cooksey, R.C., Litwin, S.E., and Abel, E.D. (2005). Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146, 5341–5349.

Bugger, H., and Abel, E.D. (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 57, 660–671.

Burchfield, J.S., Xie, M., and Hill, J.A. (2013). Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation* 128, 388–400.

Burelle, Y., Wambolt, R.B., Grist, M., Parsons, H.L., Chow, J.C.F., Antler, C., Bonen, A., Keller, A., Dunaway, G.A., Popov, K.M., et al. (2004). Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 287, 1055–1063.

Burgoyne, J.R., Mongue-Din, H., Eaton, P., and Shah, A.M. (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ. Res.* 111, 1091–1106.

Bush, E.W., Hood, D.B., Papst, P.J., Chapo, J.A., Minobe, W., Bristow, M.R., Olson, E.N., and McKinsey, T.A. (2006). Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 33487–33496.

Cantu, D., Schaack, J., and Patel, M. (2009). Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H₂O₂-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures. *PLoS One* 4, 3–11.

Castañeda, D., Gabani, M., Choi, S., Nguyen, Q.M., Chen, C., Mapara, A., Kassan, A., Gonzalez, A.A., Ait-Aissa, K., and Kassan, M. (2019). Targeting Autophagy in Obesity-Associated Heart Disease. *Obesity* 00, oby.22455.

Cereijo, R., Gavaldà-Navarro, A., Cairó, M., Quesada-López, T., Villarroya, J., Morón-Ros, S., Sánchez-Infantes, D., Peyrou, M., Iglesias, R., Mampel, T., et al. (2018). CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metab.* 28, 750-763.e6.

Ceriani, L., and Giovanella, L. (2007). Cardiac natriuretic peptides after myocardial infarction: Relationship with infarct size, left ventricular function and remodelling assessed by 99mTc-sestamibi gated-single photon emission tomography. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 226–231.

Ceylan-Isik, A.F., Kandadi, M.R., Xu, X., Hua, Y., Chicco, A.J., Ren, J., and Nair, S. (2013). Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 63, 4–13.

Chavez, A.O., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M.A., Folli, F., DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care* 32, 1542–1546.

- Che, Y., Wang, Z.P., Yuan, Y., Zhang, N., Jin, Y.G., Wan, C.X., and Tang, Q.Z. (2018). Role of autophagy in a model of obesity: A long-term high fat diet induces cardiac dysfunction. *Mol. Med. Rep.* 18, 3251–3261.
- Chen, C., Cheung, B.M.Y., Tso, A.W.K., Wang, Y., Law, L.S.C., Ong, K.L., Wat, N.M.S., Xu, A., and Lam, K.S.L. (2011). High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of type 2 diabetes: A 5.4-year population-based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care* 34, 2113–2115.
- Chen, C., Yang, S., Li, H., Yin, Z., Fan, J., Zhao, Y., Gong, W., Yan, M., and Wang, D.W. (2017). Mir30c Is Involved in Diabetic Cardiomyopathy through Regulation of Cardiac Autophagy via BECN1. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 7, 127–139.
- Chen, W., Hong, J., Gannon, J., Kakkar, R., and Lee, R.T. (2015). Myocardial pressure overload induces systemic inflammation through endothelial cell IL-33. *112*, 2–7.
- Chen, Y., Wang, Y., Chen, J., Chen, X., Cao, W., Chen, S., Xu, S., Huang, H., and Liu, P. (2012). Roles of transcriptional corepressor RIP140 and coactivator PGC-1 α in energy state of chronically infarcted rat hearts and mitochondrial function of cardiomyocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 362, 11–18.
- Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Huang, Y., Lewis, W., He, N., Evans, R.M., Schneider, M.D., Brako, F.A., Xiao, Y., et al. (2004). Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor- δ deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat. Med.* 10, 1245–1250.
- Chiba, A., Watanabe-Takano, H., Miyazaki, T., and Mochizuki, N. (2018). Cardiomyokines from the heart. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1349–1362.
- Chow, W.S., Xu, A., Woo, Y.C., Tso, A.W.K., Cheung, S.C.W., Fong, C.H.Y., Tse, H.F., Chau, M.T., Cheung, B.M.Y., and Lam, K.S.L. (2013). Serum fibroblast growth factor-21 levels are associated with carotid atherosclerosis independent of established cardiovascular risk factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2454–2459.
- Chun, Y.S., Hyun, J.Y., Kwak, Y.G., Kim, I.S., Kim, C.H., Choi, E., Kim, M.S., and Park, J.W. (2003). Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem. J.* 370, 149–157.
- Ciechanover, A. (2017). Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 30, 341–355.
- Cohn, J.N., Ferrari, R., and Sharpe, N. (2000). Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 569–582.
- Csige, I., Ujvárosy, D., Szabó, Z., Lorincz, I., Paragh, G., Harangi, M., Somodi, S., and Santulli, G. (2018). The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *J. Diabetes Res.* 2018.
- Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 269.
- Dadmanesh, M., Aghajani, H., Fadaei, R., and Ghorban, K. (2018). Lower serum levels of Meteorin-like/Subfatin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus are

- negatively associated with insulin resistance and inflammatory cytokines. *PLoS One* *13*, 1–10.
- Dai, D.F., Johnson, S.C., Villarín, J.J., Chin, M.T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D.J., Dorn, G.W., Kang, Y.J., Prolla, T.A., et al. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and gaq overexpression-induced heart failure. *Circ. Res.* *108*, 837–846.
- Delbridge, L.M.D., Mellor, K.M., Taylor, D.J., and Gottlieb, R.A. (2017). Myocardial stress and autophagy: mechanisms and interventional prospects. *Nat Rev Cardiol* *14*, 412–425.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* *20*, 649–688.
- Devereux, R.B., Roman, M.J., Paranicas, M., O’Grady, M.J., Lee, E.T., Welty, T.K., Fabsitz, R.R., Robbins, D., Rhoades, E.R., and Howard, B. V. (2000). Impact of diabetes on cardiac structure and function: The Strong Heart Study. *Circulation* *101*, 2271–2276.
- Díaz-Delfín, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., and Villarroya, F. (2012). TNF- α represses β -klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: Involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* *153*, 4238–4245.
- Divakaran, V., Adroque, J., Ishiyama, M., Entman, M.L., Haudek, S., Sivasubramanian, N., Mann, D.L., and Fail, C.H. (2009). Adaptive and Maladaptive Effects of SMAD3 Signaling in the Adult Heart After Hemodynamic Pressure Overloading.
- Doenst, T., Pytel, G., Schrepper, A., Amorim, P., Färber, G., Shingu, Y., Mohr, F.W., and Schwarzer, M. (2010). Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc. Res.* *86*, 461–470.
- Doenst, T., Nguyen, T.D., and Abel, E.D. (2013). Cardiac metabolism in heart failure: Implications beyond atp production. *Circ. Res.* *113*, 709–724.
- Douris, N., Stevanovic, D.M., Fisher, F.M., Cisu, T.I., Chee, M.J., Nguyen, N.L., Zarebidaki, E., Adams, A.C., Kharitonov, A., Flier, J.S., et al. (2015). Central fibroblast growth factor 21 browns white fat via sympathetic action in male mice. *Endocrinology* *156*, 2470–2481.
- Dunbar, J.D., Coskun, T., Chen, Y., Kharitonov, A., Moller, D.E., Bina, H.A., Hu, C.C., and Schneider, M.A. (2008). Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice. *Endocrinology* *149*, 6018–6027.
- Duncan, J.G., and Finck, B.N. (2008). The PPAR α -PGC-1 α axis controls cardiac energy metabolism in healthy and diseased myocardium. *PPAR Res.* *2008*.
- Dushay, J., Chui, P.C., Gopalakrishnan, G.S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F.M., Badman, M.K., Martínez-Chantar, M.L., and Maratos-Flier, E. (2010). Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *139*, 456–463.
- Dutchak, P.A., Katafuchi, T., Bookout, A.L., Choi, J.H., Yu, R.T., Mangelsdorf, D.J., and Kliewer, S.A. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* *148*, 556–567.
- Eaton, M., Granata, C., Barry, J., Safdar, A., Bishop, D., and Little, J.P. (2018). Impact of a single bout of high-intensity interval exercise and short-term interval training on interleukin-6, FNDC5, and METRN mRNA expression in human skeletal muscle. *J. Sport Heal. Sci.* *7*, 191–196.

- Eder, P., and Molkentin, J.D. (2011). TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 108, 265–272.
- El-Ashmawy, H.M., Selim, F.O., Hosny, T.A.M., and Almassry, H.N. (2019). Association of low serum Meteorin like (Metrnl) concentrations with worsening of glucose tolerance, impaired endothelial function and atherosclerosis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 150, 57–63.
- Emanuelli, B., Vienberg, S.G., Smyth, G., Cheng, C., Stanford, K.I., Arumugam, M., Michael, M.D., Adams, A.C., Kharitononkov, A., and Kahn, C.R. (2014). Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *J. Clin. Invest.* 124, 515–527.
- Fazlinezhad, A., Khadem Rezaeian, M., Yousefzadeh, H., Ghaffarzagdegan, K., and Khajedaluae, M. (2011). Plasma brain natriuretic peptide (BNP) as an indicator of left ventricular function, early outcome and mechanical complications after acute myocardial infarction. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 5, 77–83.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24–41.
- Fernández-Velasco, M., González-Ramos, S., and Boscá, L. (2014). Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. *Biochem. J.* 458, 187–193.
- Ferrer-Curriu, G., Redondo-Angulo, I., Guitart-Mampel, M., Ruperez, C., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., Garrabou, G., Villarroya, F., Fernández-Solà, J., and Planavila, A. (2019). Fibroblast growth factor-21 protects against fibrosis in hypertensive heart disease. *J. Pathol.* 248, 30–40.
- Fidziańska, A., Bilińska, Z.T., Walczak, E., Witkowski, A., and Chojnowska, L. (2010). Autophagy in transition from hypertrophic cardiomyopathy to heart failure. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 59, 181–183.
- Fisher, F.F., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitononkov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Fisher, F.M., Chui, P.C., Antonellis, P.J., Bina, H.A., Kharitononkov, A., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 59, 2781–2789.
- Fonarow, G.C., Srikanthan, P., Costanzo, M.R., Cintron, G.B., and Lopatin, M. (2007). An obesity paradox in acute heart failure: Analysis of body mass index and inhospital mortality for 108 927 patients in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry. *Am. Heart J.* 153, 74–81.
- Frangogiannis, N.G. (2012). Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair.
- Frati, G., Schirone, L., Chimenti, I., Yee, D., Biondi-zoccai, G., Volpe, M., and Sciarretta, S. (2017). An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy. 378–388.
- Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., and Hill, J.A. (2004). Review : Current Perspective Hypertrophy of the Heart A New Therapeutic Target ? 1580–1589.
- Frieler, R.A., and Mortensen, R.M. (2015). Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation* 131, 1019–1030.

- Fukuda, Y., Hirata, Y., Yoshimi, H., Kojima, T., Kobayashi, Y., Yanagisawa, M., and Masaki, T. (1988). Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *155*, 167–172.
- Fukushima, A., and Lopaschuk, G.D. (2016a). Cardiac fatty acid oxidation in heart failure associated with obesity and diabetes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1861*, 1525–1534.
- Fukushima, A., and Lopaschuk, G.D. (2016b). Acetylation control of cardiac fatty acid β -oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1862*, 2211–2220.
- Gallego-Escuredo, J.M., Gómez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giralt, M., Frühbeck, G., and Villarroya, F. (2015). Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int. J. Obes.* *39*, 121–129.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. *Cell* *159*, 1263–1276.
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, H.A., Eriksson, M., Hafström, I., Dahlin, M., Åmark, P., Angelin, B., and Rudling, M. (2008). The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR α Activation in Man. *Cell Metab.* *8*, 169–174.
- Ghosh, R., and Pattison, J.S. (2018). Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Heart Failure: The Known and the Unknown. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2018*.
- Glembotski, S.D. and C.C. (2011). The Cardiomyokine Story Unfolds: Investigating Stress-induced Protein Secretion in the Heart. *Trends Mol Med* *17*, 207–214.
- Goldfarb, M. (2005). Fibroblast growth factor homologous factors: Evolution, structure, and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 215–220.
- Gottlieb, R.A., and Mentzer, R.M. (2010). Autophagy During Cardiac Stress: Joys and Frustrations of Autophagy. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 45–59.
- Green, D.R., and Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell* *157*, 65–75.
- Gupta, M.P. (2007). Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *Circulation* *115*, 388–403.
- Häcker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE* *2006*, 1–20.
- Häcker, U., Nybakken, K., and Perrimon, N. (2005). Heparan sulphate proteoglycans: The sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 530–541.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 251–262.
- Harvey, P.A., and Leinwand, L.A. (2011). Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J. Cell Biol.* *194*, 355–365.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1032–1040.

Cell Biol. 11, 1433–1437.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.

Heineke, J., and Molkentin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 589–600.

Herron, T.J., and McDonald, K.S. (2002). Small amounts of α -myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circ. Res.* 90, 1150–1152.

Heymans, S., Hirsch, E., Anker, S.D., Aukrust, P., Balligand, J.L., Cohen-Tervaert, J.W., Drexler, H., Filippatos, G., Felix, S.B., Gullestad, L., et al. (2009). Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur. J. Heart Fail.* 11, 119–129.

Higuchi, Y., Otsu, K., Nishida, K., Hirotsu, S., Nakayama, H., Yamaguchi, O., Matsumura, Y., Ueno, H., Tada, M., and Hori, M. (2002). Involvement of Reactive Oxygen Species-mediated NF- κ B Activation in TNF- α -induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation* 105, 233–240.

Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T., and Taga, T. (1995). Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4862–4866.

Holtwick, R., Gotthardt, M., Skryabin, B., Steinmetz, M., Pothast, R., Zetsche, B., Hammer, R.E., Herz, J., and Kuhn, M. (2002). Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7142–7147.

Holtwick, R., Eickels, M. Van, Skryabin, B. V, Baba, H.A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M.D., Garbers, D.L., and Kuhn, M. (2003). *J Clin Invest.* 2003 ; 111(9) : 1399–1407.pdf. 111, 1399–1407.

Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Iglesias, R., and Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR α in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metab.* 11, 206–212.

Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., and Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990.

Hondares, E., Gallego-Escuredo, J.M., Flachs, P., Frontini, A., Cereijo, R., Goday, A., Perugini, J., Kopecky, P., Giralt, M., Cinti, S., et al. (2014). Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism.* 63, 312–317.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 937–947.

Hsieh, M.C.F., Das, D., Sambandam, N., Zhang, M.Q., and Nahlé, Z. (2008). Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J. Biol. Chem.* 283, 27410–27417.

- Hsu, H.C., Chen, C.Y., Lee, B.C., and Chen, M.F. (2016). High-fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy. *Eur. J. Nutr.* *55*, 2245–2254.
- Hsuchou, H., Pan, W., and Kastin, A.J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* *28*, 2382–2386.
- Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C., and Wang, X. (2018). FGF family: From drug development to clinical application. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* *5*, 415–425.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., et al. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell* *126*, 955–968.
- Itoh, N. (2010). Hormone-like (endocrine) Fgfs: Their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res.* *342*, 1–11.
- Itoh, N., and Ohta, H. (2013). Pathophysiological roles of FGF signaling in the heart. *Front. Physiol.* *4 SEP*, 2–5.
- Itoh, N., and Ornitz, D.M. (2011). Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* *149*, 121–130.
- Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitononkov, A., and Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* *582*, 3805–3810.
- Jahng, J.W.S., Song, E., and Sweeney, G. (2016). Crosstalk between the heart and peripheral organs in heart failure. *Exp. Mol. Med.* *48*, e217-11.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* *9*, 574–587.
- James, P.T., Rigby, N., and Leach, R. (2004). The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur. J. Prev. Cardiol.* *11*, 3–8.
- Jeckel, K.M., Miller, K.E., Chicco, A.J., Chapman, P.L., Mulligan, C.M., Falcone, P.H., Miller, M.L., Pagliassotti, M.J., and Frye, M.A. (2011). The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. *Lipids Health Dis.* *10*, 1–11.
- Jimenez, R.E., Kubli, D.A., and Gustafsson, Å.B. (2014). Autophagy and mitophagy in the myocardium: Therapeutic potential and concerns. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 1907–1916.
- Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L.T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 4627–4634.
- Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Ito, M., Matsuo, K., Kambara, T., Uemura, Y., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., et al. (2015). FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *459*, 124–130.

- Jørgensen, J.R., Thompson, L., Fjord-Larsen, L., Krabbe, C., Torp, M., Kalkkinen, N., Hansen, C., and Wahlberg, L. (2009). Characterization of Meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor. *J. Mol. Neurosci.* 39, 104–116.
- Jørgensen, J.R., Fransson, A., Fjord-Larsen, L., Thompson, L.H., Houchins, J.P., Andrade, N., Torp, M., Kalkkinen, N., Andersson, E., Lindvall, O., et al. (2012). Cometin is a novel neurotrophic factor that promotes neurite outgrowth and neuroblast migration in vitro and supports survival of spiral ganglion neurons in vivo. *Exp. Neurol.* 233, 172–181.
- Jung, T.W., Lee, S.H., Kim, H.C., Bang, J.S., Abd El-Aty, A.M., Hacımüftüoğlu, A., Shin, Y.K., and Jeong, J.H. (2018). METRNL attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance via AMPK or PPAR δ -dependent pathways in skeletal muscle of mice. *Exp. Mol. Med.* 50, 122.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Erratum: LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing (*EMBO Journal* (2000) 19 (5720-5728)). *EMBO J.* 22, 4577.
- Kanamori, H., Takemura, G., Goto, K., Tsujimoto, A., Mikami, A., Ogino, A., Watanabe, T., Morishita, K., Okada, H., Kawasaki, M., et al. (2015). Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes. *Autophagy* 11, 1146–1160.
- Kapoun, A.M., Liang, F., O'Young, G., Damm, D.L., Quon, D., White, R.T., Munson, K., Lam, A., Schreiner, G.F., and Protter, A.A. (2004). B-Type Natriuretic Peptide Exerts Broad Functional Opposition to Transforming Growth Factor- β in Primary Human Cardiac Fibroblasts: Fibrosis, Myofibroblast Conversion, Proliferation, and Inflammation. *Circ. Res.* 94, 453–461.
- Kawano, S., Kubota, T., Monden, Y., Kawamura, N., Tsutsui, H., Takeshita, A., and Sunagawa, K. (2005). Blockade of NF- κ B ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Cardiovasc. Res.* 67, 689–698.
- Kharitonkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635.
- Kharitonkov, A., Dunbar, J.D., Bina, H.A., Bright, S., Moyers, J.S., Zhang, C., Ding, L., Micanovic, R., Mehrbod, S.F., Knierman, M.D., et al. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by β Klotho. *J. Cell. Physiol.* 215, 1–7.
- Kiffin, R., Christian, C., Erwin, K., and Cuervo, A. (2004). Activation of Chaperone-mediated Autophagy during Oxidative Stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 5565–5573.
- Kim, H., Mendez, R., Zheng, Z., Chang, L., Cai, J., Zhang, R., and Zhang, K. (2014). Liver-enriched transcription factor CREBH interacts with peroxisome proliferator-activated receptor α to regulate metabolic hormone FGF21. *Endocrinology* 155, 769–782.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kimmel, A.R., and Sztalryd, C. (2016). The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 36, 471–509.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H.,

- Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222.
- Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J.* 24, 3052–3065.
- Kolwicz Jr, S.C., Purohit, S., and Tian, R. (2014). Cardiac Metabolism and Its Interactions with Contraction, Growth, and Survival of the Cardiomyocyte. *Circ. Res.* 113, 1–30.
- Korolchuk, V.I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F.H., Roberts, E.A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F.M., et al. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat. Cell Biol.* 13, 453–462.
- Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693–702.
- Koves, T.R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., Dohm, G.L., Yan, Z., Newgard, C.B., and Muoio, D.M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J. Biol. Chem.* 280, 33588–33598.
- Kubota, T., McTiernan, C.F., Frye, C.S., Demetris, A.J., and Feldman, A.M. (1997). Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J. Card. Fail.* 3, 117–124.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Klierer, S.A., and Kuro-O, M. (2007). Tissue-specific expression of β klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* 282, 26687–26695.
- Kwon, S.H., Pimentel, D.R., Remondino, A., Sawyer, D.B., and Colucci, W.S. (2003). H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 615–621.
- Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., and Schlessinger, J. (2004). The Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of an Indirect Mechanism for Fibroblast Growth Factor Stimulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Antiapoptotic Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5657–5666.
- Leask, A. (2015). New Insights Into Cardiac Fibrosis. 1269–1276.
- Lee, J.H., Kang, Y.E., Kim, J.M., Choung, S., Joung, K.H., Kim, H.J., and Ku, B.J. (2018). Serum Meteorin-like protein levels decreased in patients newly diagnosed with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 135, 7–10.
- Lehman, J.J., Boudina, S., Banke, N.H., Sambandam, N., Han, X., Young, D.M., Leone, T.C., Gross, R.W., Lewandowski, E.D., Abel, E.D., et al. (2008). The transcriptional coactivator PGC-1 α is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 295, 185–196.
- Lehnart, S.E., Maier, L.S., and Hasenfuss, G. (2009). Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail. Rev.* 14, 213–224.

- Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: Muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* *3*, 0672–0687.
- Li, L., Xu, J., He, L., Peng, L., Zhong, Q., Chen, L., and Jiang, Z. (2016). The role of autophagy in cardiac hypertrophy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *48*, 491–500.
- Li, Y., Wong, K., Walsh, K., Gao, B., and Zang, M. (2013). Retinoic acid receptor β stimulates hepatic induction of fibroblast growth factor 21 to promote fatty acid oxidation and control whole-body energy homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* *288*, 10490–10504.
- Li, Z., Wang, J., and Yang, X. (2015a). Functions of autophagy in pathological cardiac hypertrophy. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 672–678.
- Li, Z.Y., Zheng, S.L., Wang, P., Xu, T.Y., Guan, Y.F., Zhang, Y.J., and Miao, C.Y. (2014). Subfatin is a Novel Adipokine and Unlike Meteorin in Adipose and Brain Expression. *CNS Neurosci. Ther.* *20*, 344–354.
- Li, Z.Y., Song, J., Zheng, S.L., Fan, M.B., Guan, Y.F., Qu, Y., Xu, J., Wang, P., and Miao, C.Y. (2015b). Adipocyte metrnl antagonizes insulin resistance through pparg signaling. *Diabetes* *64*, 4011–4022.
- Lin, L., Tang, C., Xu, J., Ye, Y., Weng, L., Wei, W., Ge, J., Liu, X., and Zou, Y. (2014). Mechanical stress triggers cardiomyocyte autophagy through angiotensin II type 1 receptor-mediated p38MAP kinase independently of angiotensin II. *PLoS One* *9*, 1–8.
- Ling, H., Bers, D., Brown, J.H., Ling, H., Zhang, T., Pereira, L., Means, C.K., and Cheng, H. (2012). Requirement for Ca²⁺ / calmodulin – dependent kinase II in the transition from pressure overload – induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice Find the latest version : Requirement for Ca²⁺ / calmodulin – dependent kinase II in the transition. *119*.
- Linseman, J. V., and Bristow, M.R. (2003). Drug Therapy and Heart Failure Prevention. *Circulation* *107*, 1234–1236.
- Liu, K., and Czaja, M.J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ.* *20*, 3–11.
- Liu, S.Q., Tefft, B.J., Roberts, D.T., Zhang, L.Q., Ren, Y., Li, Y.C., Huang, Y., Zhang, D., Phillips, H.R., and Wu, Y.H. (2012). Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *303*, 1446–1458.
- Liu, S.Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S.M., Li, Y.C., Zhang, L.Q., and Wu, Y.H. (2013). Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci. Rep.* *3*.
- Löffler, D., Landgraf, K., Rockstroh, D., Schwartze, J.T., Dunzendorfer, H., Kiess, W., and Körner, A. (2017). METRNL decreases during adipogenesis and inhibits adipocyte differentiation leading to adipocyte hypertrophy in humans. *Int. J. Obes.* *41*, 112–119.
- Lucas, E., Vila-Bedmar, R., Arcones, A.C., Cruces-Sande, M., Cachofeiro, V., Mayor, F., and Murga, C. (2016). Obesity-induced cardiac lipid accumulation in adult mice is modulated by G protein-coupled receptor kinase 2 levels. *Cardiovasc. Diabetol.* *15*, 1–13.

- Ma, X., Lee, P., Chisholm, D.J., and James, D.E. (2015). Control of adipocyte differentiation in different fat depots; Implications for pathophysiology or therapy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. *6*, 1–8.
- Maejima, Y., Isobe, M., and Sadoshima, J. (2016). Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *95*, 19–25.
- Maillet, M., Berlo, J.H. Van, and Molkentin, J.D. (2015). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players Marjorie. *14*, 38–48.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 741–752.
- Maria, A., Frazier, S.O.H., and Buja, L.M. (2014). Fibrosis and heart failure. 173–185.
- Marin-Grez, M., Fleming, J.T., and Steinhausen, M. (1986). Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* *324*, 473–476.
- Markan, K.R., Naber, M.C., Small, S.M., Peltekian, L., Kessler, R.L., and Potthoff, M.J. (2017). FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue. *Mol. Metab.* *6*, 602–610.
- Maron, B.J., and Maron, M.S. (2013). Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* *381*, 242–255.
- Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M., and Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* *8*, 903–914.
- Matsui, T., Li, N., Wu, J.C., Cook, S.A., Nagoshi, T., Picard, M.H., Liao, R., and Rosenzweig, A. (2002). Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J. Biol. Chem.* *277*, 22896–22901.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: Roles of AMP-activated protein kinase and beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* *100*, 914–922.
- Matsushima, S., Ide, T., Yamato, M., and Matsusaka, H. (2006). Overexpression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial.
- Maulik, S.K., and Kumar, S. (2012). Oxidative stress and cardiac hypertrophy: A review. *Toxicol. Mech. Methods* *22*, 359–366.
- Mazumder, P.K., Neill, B.T.O., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Boudina, S., and Abel, E.D. (2004). Impaired Cardiac Efficiency and Increased Fatty Acid Oxidation in Insulin-Resistant ob/ob Mouse Hearts. *Diabetes* *53*, 2366–2374.
- McMullen, J.R., and Jennings, G.L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *34*, 255–262.
- Meléndez, G.C., McLarty, J.L., Levick, S.P., Du, Y., Janicki, J.S., and Brower, G.L. (2010). Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* *56*, 225–231.

- Mihaylova, M.M., and Shaw, R.J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1016–1023.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahimi, O.A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 107–137.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Muise, E.S., Azzolina, B., Kuo, D.W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J.R., Berger, J.P., and Wong, K.K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor γ and altered metabolic states. *Mol. Pharmacol.* *74*, 403–412.
- Munasinghe, P.E., Riu, F., Dixit, P., Edamatsu, M., Saxena, P., Hamer, N.S.J., Galvin, I.F., Bunton, R.W., Lequeux, S., Jones, G., et al. (2016). Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway. *Int. J. Cardiol.* *202*, 13–20.
- Nagaya, N., Nishikimi, T., Goto, Y., Miyao, Y., Kobayashi, Y., Morii, I., Daikoku, S., Matsumoto, T., Miyazaki, S., Matsuoka, H., et al. (1998). Plasma brain natriuretic peptide is a biochemical marker for the prediction of progressive ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* *135*, 21–28.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., et al. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* *13*, 619–624.
- Nakamura, M., and Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* *15*, 387–407.
- Nakamura, S., and Yoshimori, T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J. Cell Sci.* *130*, 1209–1216.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* *130*, 165–178.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart - An engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* *356*, 1140–1151.
- Nishida, K., and Otsu, K. (2016). Autophagy during cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *95*, 11–18.
- Nishino, J., Yamashita, K., Hashiguchi, H., Fujii, H., Shimazaki, T., and Hamada, H. (2004). Meteorin: A secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J.* *23*, 1998–2008.
- Ohtani, T., Mohammed, S.F., Yamamoto, K., Dunlay, S.M., Weston, S.A., Sakata, Y., Rodeheffer, R.J., Roger, V.L., and Redfield, M.M. (2012). Diastolic stiffness as assessed by diastolic wall strain is associated with adverse remodelling and poor outcomes in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.* *33*, 1742–1749.
- Ong, K.L., Januszewski, A.S., O'Connell, R., Jenkins, A.J., Xu, A., Sullivan, D.R., Barter, P.J., Hung,

- W.T., Scott, R.S., Taskinen, M.R., et al. (2015). The relationship of fibroblast growth factor 21 with cardiovascular outcome events in the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes study. *Diabetologia* 58, 464–473.
- Ordureau, A., Sarraf, S.A., Duda, D.M., Heo, J., Jedrykowski, M.P., Sviderskiy, V., Olszewski, J.L., Koerber, J.T., Xie, T., Sean, A., et al. (2015). Quantitative proteomics reveal a feed-forward model for mitochondrial PARKIN translocation and UB chain synthesis. *Mol. Cell* 56, 360–375.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors Gene organization and evolutionary history. 1–12.
- Ouwens, D.M., Boer, C., Fodor, M., De Galan, P., Heine, R.J., Maassen, J.A., and Diamant, M. (2005). Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* 48, 1229–1237.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Papáčková, Z., and Cahová, M. (2014). Important role of autophagy in regulation of metabolic processes in health, disease and aging. *Physiol. Res.* 63, 409–420.
- Park, J.M., Jung, C.H., Seo, M., Otto, N.M., Grunwald, D., Kim, K.H., Moriarity, B., Kim, Y.M., Starker, C., Nho, R.S., et al. (2016). The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* 12, 547–564.
- Park, J.M., Seo, M., Jung, C.H., Grunwald, D., Stone, M., Otto, N.M., Toso, E., Ahn, Y., Kyba, M., Griffin, T.J., et al. (2018). ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy* 14, 584–597.
- Patel, V., Adya, R., Chen, J., Ramanjaneya, M., Bari, M.F., Bhudia, S.K., Hillhouse, E.W., Tan, B.K., and Randeve, H.S. (2014). Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One* 9.
- Pattison, J.S., Osinska, H., and Robbins, J. (2011). Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ. Res.* 109, 151–160.
- Pellitero, S., Piquer-Garcia, I., Ferrer-Curriu, G., Puig, R., Martínez, E., Moreno, P., Tarascó, J., Balibrea, J., Lerin, C., Puig-Domingo, M., et al. (2018). Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery. *Int. J. Obes.* 42, 919–922.
- Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A., et al. (2016). Revisiting cardiac cellular composition. *Circ. Res.* 118, 400–409.
- Planavila, A., Laguna, J.C., and Vázquez-Carrera, M. (2005). Nuclear factor- κ B activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 280, 17464–17471.
- Planavila, A., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. (2011). Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 90, 276–284.

- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., van Bilsen, M., et al. (2013a). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* *4*, 2019.
- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L.A., Sitges, M., Giralt, M., Van Bilsen, M., et al. (2013b). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* *4*, 1–12.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., and Villarroya, F. (2015a). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* *106*, 19–31.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., and Villarroya, F. (2015b). FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. *6*, 133.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., and Villarroya, F. (2015c). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* *106*, 19–31.
- Planavila, A., Fernández-Solà, J., and Villarroya, F. (2017). Cardiokines as Modulators of Stress-Induced Cardiac Disorders. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* *108*, 227–256.
- Popescu, L.M., Gherghiceanu, M., Hinescu, M.E., Cretoiu, D., Ceafalan, L., Regalia, T., Popescu, A.C., Ardeleanu, C., and Mandache, E. (2006). Insights into the interstitium of ventricular myocardium: Interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J. Cell. Mol. Med.* *10*, 429–458.
- Porter, J.G., Arfsten, A., Palisi, T., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A., and Seilhamer, J.J. (1989). Cloning of a cDNA encoding porcine brain natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* *264*, 6689–6692.
- Powers, C.J., Wellstein, S.Wm., and A, W. (1997). Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem. Cell Biol.* *75*, 669–685.
- Prabhu, S.D., and Frangogiannis, N.G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After From Inflammation to Fibrosis. 91–113.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* *24*, 78–90.
- Rabar, S., Harker, M., O'Flynn, N., and Wierzbicki, A.S. (2014). Lipid modification and cardiovascular risk assessment for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Summary of updated NICE guidance. *BMJ* *349*, 1–6.
- Rainer, P.P., and Kass, D.A. (2016). Old dog, new tricks: Novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G. *Cardiovasc. Res.* *111*, 154–162.
- Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lou, J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., et al. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* *157*, 1279–1291.
- Rao, R.R., Long, J.Z., White, J.P., Svensson, K.J., Lokurkar, I., Jedrychowski, M.P., Ruas, J.L., Wrann, C.D., Lo, J.C., Camera, D.M., et al. (2015). NIH Public Access interactions to increase beige fat thermogenesis. *157*, 1279–1291.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W.,

- Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *90*, 1383–1435.
- Redondo-Angulo, I., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., Giralt, M., Villarroya, F., and Planavila, A. (2016). C/EBP β is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy. *Int. J. Cardiol.* *202*, 819–828.
- Redondo-Angulo, I., Mas-Stachurska, A., Sitges, M., Tinahones, F.J., Giralt, M., Villarroya, F., and Planavila, A. (2017). Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy. *Cardiovasc. Res.* *113*, 1574–1584.
- Redondo, J., Bishop, J.E., and Wilkins, M.R. (1998). Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* *124*, 1455–1462.
- Riehle, C., Wende, A.R., Zhu, Y., Oliveira, K.J., Pereira, R.O., Jaishy, B.P., Bevins, J., Valdez, S., Noh, J., Kim, B.J., et al. (2014). Insulin Receptor Substrates Are Essential for the Bioenergetic and Hypertrophic Response of the Heart to Exercise Training. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 3450–3460.
- Ritter, O., and Neyses, L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol. Med.* *9*, 313–321.
- Ross, R.S., and Borg, T.K. (2001). Integrins and the myocardium. *Circ. Res.* *88*, 1112–1119.
- Rowe, G.C., Jiang, A., and Arany, Z. (2010). PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ. Res.* *107*, 825–838.
- Ruas, J.L., White, J.P., Rao, R.R., Kleiner, S., Brannan, K.T., Harrison, B.C., Greene, N.P., Wu, J., Estall, J.L., Irving, B.A., et al. (2012). A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* *151*, 1319–1331.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* *15*, 741–750.
- Sadoshima, J., and Izumo, S. (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J.* *12*, 1681–1692.
- Sagnella, G.A. (2002). The heart as an endocrine organ. *Biologist* *49*, 275–279.
- Sakamoto, J., Barr, R.L., Kavanagh, K.M., and Lopaschuk, G.D. (2000). Contribution of malonyl-CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *278*, 1196–1204.
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zeriouh, M., Schmack, B., Farag, M., Popov, A.-F., Dohmen, P.M., Choi, Y.-H., Wahlers, T., et al. (2016). Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* *22*, 75–79.
- Sanada, S., Hakuno, D., Higgins, L.J., Schreiter, E.R., Mckenzie, A.N.J., and Lee, R.T. (2007). IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *117*.
- Sano, M., Wang, S.C., Shirai, M., Scaglia, F., Xie, M., Sakai, S., Tanaka, T., Kulkarni, P.A., Barger, P.M., Youker, K.A., et al. (2004). Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a

predisposition to heart failure. *EMBO J.* 23, 3559–3569.

Sarzani, R., Salvi, F., Dessì-Fulgheri, P., and Rappelli, A. (2008a). Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: An integrated view in humans. *J. Hypertens.* 26, 831–843.

Sarzani, R., Marcucci, P., Salvi, F., Bordicchia, M., Espinosa, E., Mucci, L., Lorenzetti, B., Minardi, D., Muzzonigro, G., Dessì-Fulgheri, P., et al. (2008b). Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int. J. Obes.* 32, 259–267.

Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976.

Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A.A., Lim, W.W., Moreno-Moral, A., DeLaughter, D.M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., et al. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552, 110–115.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26, 1749–1760.

Schiattarella, G.G., and Hill, J.A. (2015). Is inhibition of hypertrophy a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload? *Circulation* 131, 1435–1447.

Schirone, L., Forte, M., Palmerio, S., Yee, D., Nocella, C., Angelini, F., Pagano, F., Schiavon, S., Bordin, A., Carrizzo, A., et al. (2017). A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017.

Schulze, R.J., Sathyanarayan, A., and Mashek, D.G. (2017). Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 1178–1187.

Sciarretta, S., Paneni, F., Palano, F., Chin, D., Tocci, G., Rubattu, S., and Volpe, M. (2009). Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and inflammatory processes in the development and progression of diastolic dysfunction. *Clin. Sci.* 116, 467–477.

Sciarretta, S., Zhai, P., Shao, D., Zablocki, D., Nagarajan, N., Terada, L.S., Volpe, M., and Sadoshima, J. (2013). Activation of NADPH oxidase 4 in the endoplasmic reticulum promotes cardiomyocyte autophagy and survival during energy stress through the protein kinase RNA-activated-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic initiation factor 2 α /activating transcripti. *Circ. Res.* 113, 1253–1264.

Sciarretta, S., Volpe, M., and Sadoshima, J. (2014). Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ. Res.* 114, 549–564.

Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G., and Sadoshima, J. (2018). New insights into the role of mtor signaling in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 122, 489–505.

Seilhamer, J.J., Arfsten, A., Miller, J.A., Lundquist, P., Scarborough, R.M., Lewicki, J.A., and Porter, J.G. (1989). Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 650–658.

Semba, R.D., Crasto, C., Strait, J., Sun, K., Schaumberg, D.A., and Ferrucci, L. (2013). Elevated serum fibroblast growth factor 21 is associated with hypertension in community-dwelling adults. *J. Hum. Hypertens.* 27, 397–399.

- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Arencibia, M.G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* (80-). 332, 1429–1433.
- Shao, D., and Tian, R. (2016). Glucose transporters in cardiac metabolism and hypertrophy. *Compr. Physiol.* 6, 331–351.
- Shimano, M., Ouchi, N., and Walsh, K. (2012). Cardiokines: recent progress in elucidating the cardiac secretome. *Circulation* 126, e327-32.
- Shimizu, I., and Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 245–262.
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S., and Walsh, K. (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J. Clin. Invest.* 115, 2108–2118.
- Shiomi, T., Tsutsui, H., Matsusaka, H., and Murakami, K. (2004). Overexpression of Glutathione Peroxidase Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice. 544–549.
- Shirakabe, A., Ikeda, Y., Sciarretta, S., Zablocki, D.K., and Sadoshima, J. (2016). Aging and Autophagy in the Heart. *Circ. Res.* 118, 1563–1576.
- Siersbæk, R., Nielsen, R., and Mandrup, S. (2010). PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism - Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* 584, 3242–3249.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135.
- Singh, S.R., Zech, A.T.L., Geertz, B., Reischmann-Düsener, S., Osinska, H., Prondzynski, M., Krämer, E., Meng, Q., Redwood, C., Van Der Velden, J., et al. (2017). Activation of Autophagy Ameliorates Cardiomyopathy in Mybpc3-Targeted Knockin Mice. *Circ. Hear. Fail.* 10, 1–12.
- Siwik, D.A., and Colucci, W.S. (2004). Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail. Rev.* 9, 43–51.
- Smeets, P.J.H., Planavila, A., Van Der Vusse, G.J., and Van Bilsen, M. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: Take it to heart. *Acta Physiol.* 191, 171–188.
- Smeets, P.J.H., Teunissen, B.E.J., Planavila, A., De Vogel-Van Den Bosch, H., Willemsen, P.H.M., Van Der Vusse, G.J., and Van Bilsen, M. (2008a). Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPAR α and PPAR δ . *J. Biol. Chem.* 283, 29109–29118.
- Smeets, P.J.H., Teunissen, B.E.J., Willemsen, P.H.M., Van Nieuwenhoven, F.A., Brouns, A.E., Janssen, B.J.A., Cleutjens, J.P.M., Staels, B., Van Der Vusse, G.J., and Van Bilsen, M. (2008b). Cardiac hypertrophy is enhanced in PPAR α -/- mice in response to chronic pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 78, 79–89.
- Song, L., Su, M., Wang, S., Zou, Y., Wang, X., Wang, Y., Cui, H., Zhao, P., Hui, R., and Wang, J. (2014). MiR-451 is decreased in hypertrophic cardiomyopathy and regulates autophagy by targeting TSC1. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 2266–2274.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in

the Normal and Failing Heart. *Physiol. Rev.* 85, 1093–1129.

Strøm, C.C., Aplin, M., Ploug, T., Christoffersen, T.E.H., Langfort, J., Viese, M., Galbo, H., Haunsø, S., and Sheikh, S.P. (2005). Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy. *FEBS J.* 272, 2684–2695.

Sun, M., Chen, M., Dawood, F., Zurawska, U., Li, J.Y., Parker, T., Kassiri, Z., Kirshenbaum, L.A., Arnold, M., Khokha, R., et al. (2007). Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* 115, 1398–1407.

Tacer, K.F., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064.

Taegtmeyer, H., Sen, S., and Vela, D. (2010). Return to the fetal gene program: A suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1188, 191–198.

Takeda, N., and Manabe, I. (2011). Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int. J. Inflam.* 2011, 1–13.

Takimoto, E., Champion, H.C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E.R., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Wang, Y., and Kass, D.A. (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 11, 214–222.

Tanajak, P., Sa-Nguanmoo, P., Wang, X., Liang, G., Li, X., Jiang, C., Chattipakorn, S.C., and Chattipakorn, N. (2016). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) therapy attenuates left ventricular dysfunction and metabolic disturbance by improving FGF21 sensitivity, cardiac mitochondrial redox homeostasis and structural changes in pre-diabetic rats. *Acta Physiol.* 217, 287–299.

Tanaka, K., Honda, M., and Takabatake, T. (2001). Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J. Am. Coll. Cardiol.* 37, 676–685.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M.L., Blanz, J., Von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902–906.

Taneike, M., Yamaguchi, O., Nakai, A., Hikoso, S., Takeda, T., Mizote, I., Oka, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., et al. (2010). Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy* 6, 600–606.

Tate, M., Grieve, D.J., and Ritchie, R.H. (2017). Are targeted therapies for diabetic cardiomyopathy on the horizon? *Clin. Sci.* 131, 897–915.

Taylor, C.J., Ryan, R., Nichols, L., Gale, N., Richard Hobbs, F.D., and Marshall, T. (2017). Survival following a diagnosis of heart failure in primary care. *Fam. Pract.* 34, 161–168.

Testa, M., Yeh, M., Lee, P., Fanelli, R., Loperfido, F., Berman, J.W., and LeJemtel, T.H. (1996). Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 28, 964–971.

Teunissen, B.E.J., Smeets, P.J.H., Willemsen, P.H.M., De Windt, L.J., Van der Vusse, G.J., and Van Bilsen, M. (2007). Activation of PPAR δ inhibits cardiac fibroblast proliferation and the

- transdifferentiation into myofibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 75, 519–529.
- Tirziu, D., Giordano, F.J., and Simons, M. (2010). Basic Science for Clinicians Cell Communications in the Heart. 928–937.
- Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E., and Burns, C. (2017). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. - PubMed - NCBI. *Circ. Res.* 118, 1021–1040.
- Tuomainen, T., and Tavi, P. (2017). The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Exp. Cell Res.* 360, 12–18.
- Ucar, A., Gupta, S.K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., et al. (2012). The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* 3.
- Ushach, I., Burkhardt, A.M., Martinez, C., Hevezi, P.A., Gerber, P.A., Buhren, B.A., Schrumpp, H., Valle-Rios, R., Vazquez, M.I., Homey, B., et al. (2015). METEORIN-LIKE is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages. *Clin. Immunol.* 156, 119–127.
- Ushach, I., Arrevillaga-Boni, G., Heller, G.N., Pone, E., Hernandez-Ruiz, M., Catalan-Dibene, J., Hevezi, P., and Zlotnik, A. (2018). Meteorin-like/Meteorin- β Is a Novel Immunoregulatory Cytokine Associated with Inflammation. *J. Immunol.* 201, 3669–3676.
- Varma, U., Koutsifeli, P., Benson, V.L., Mellor, K.M., and Delbridge, L.M.D. (2018). Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes – Experimental insights. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1864, 1949–1959.
- Vellaichamy, E., Das, S., Subramanian, U., Maeda, N., and Pandey, K.N. (2014). Genetically altered mutant mouse models of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A exhibit the cardiac expression of proinflammatory mediators in a gene-dose-dependent manner. *Endocrinology* 155, 1045–1056.
- Velten, M., Duerr, G.D., Pessies, T., Schild, J., Lohner, R., Mersmann, J., Dewald, O., Zacharowski, K., Klaschik, S., Hilbert, T., et al. (2012). Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc. Res.* 96, 422–432.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . *Cardiovasc. Res.* 79, 208–217.
- Verma, S.K., Krishnamurthy, P., Barefield, D., Singh, N., Gupta, R., Lambers, E., Thal, M., Mackie, A., Hoxha, E., Ramirez, V., et al. (2012). Interleukin-10 Treatment Attenuates Pressure Overload – Induced Hypertrophic Remodeling and Improves Heart Function via Signal Transducers and Activators of Transcription 3 – Dependent Inhibition of Nuclear Factor- κ B. 418–429.
- Villarroya, J., Cereijo, R., and Villarroya, F. (2013). An endocrine role for brown adipose tissue? *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 305.
- Wang, E.Y., Biala, A.K., Gordon, J.W., and Kirshenbaum, L.A. (2012). Autophagy in the heart: Too much of a good thing? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60, 110–117.
- Wang, J., Chen, H., Seth, A., Mcculloch, C.A., Chen, H., Seth, A., and Mcculloch, C.A. (2019). Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. 8, 1871–1881.

- Wang, Y., Solt, L.A., and Burris, T.P. (2010). Regulation of FGF21 expression and secretion by retinoic acid receptor-related orphan receptor α . *J. Biol. Chem.* *285*, 15668–15673.
- Wen, B., Lampe, J.N., Roberts, A.G., Atkins, W.M., Rodrigues, A.D., and Nelson, S.D. (2007). FGF21 Acts Centrally to Induce Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure and Weight Loss. *Cell Metab.* *454*, 42–54.
- Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., and Kitsis, R.N. (2010). Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 19–44.
- Wöfl, M., Kuball, J., Eylich, M., Schlegel, P.G., and D, P. (2009). Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. *Cytometry* *73*, 1043–1049.
- Wu, Y.-S., Zhu, B., Luo, A.-L., Yang, L., and Yang, C. (2018). The Role of Cardiokines in Heart Diseases: Beneficial or Detrimental? *Biomed Res. Int.* *2018*, 1–14.
- Xu, X., Hua, Y., Nair, S., Bucala, R., and Ren, J. (2014). Macrophage migration inhibitory factor deletion exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy through mitigating autophagy. *Hypertension* *63*, 490–499.
- Yan, J., Young, M.E., Cui, L., Lopaschuk, G.D., Liao, R., and Tian, R. (2009). Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. *Circulation* *119*, 2818–2828.
- Yan, X., Chen, J., Zhang, C., and Zhou, S. (2015). FGF21 deletion exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating cardiac lipid accumulation. *19*, 1557–1568.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 124–131.
- Yin, F.C.P., Spurgeon, H.A., and Rakusan, K. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: Application in the aging rat. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* *12*, H941–H947.
- Zaha, V.G., and Young, L.H. (2012). AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart. *Circ. Res.* *111*, 800–814.
- Zech, A.T.L., Singh, S.R., Schlossarek, S., and Carrier, L. (2019). Autophagy in cardiomyopathies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1–14.
- Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M., and Sadoshima, J. (2011). Differential roles of gsk-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* *109*, 502–511.
- Zhang, Y., and Ren, J. (2016). Epigenetics and obesity cardiomyopathy: From pathophysiology to prevention and management. *Pharmacol. Ther.* *161*, 52–66.
- Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., Lu, X., Zhou, S., Wang, S., Shao, M., Zhang, F., Cheng, P., et al. (2015a). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway. *Diabetologia* *58*, 1937–1948.
- Zhang, J., Cheng, Y., Gu, J., Wang, S., Zhou, S., Wang, Y., Tan, Y., Feng, W., Fu, Y., Mellen, N., et al. (2016). Fenofibrate increases cardiac autophagy via FGF21/SIRT1 and prevents fibrosis and inflammation in the hearts of Type 1 diabetic mice. *Clin. Sci.* *130*, 625–641.

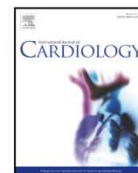
- Zhang, W., Chu, S., Ding, W., and Wang, F. (2015b). Serum level of fibroblast growth factor 21 is independently associated with acute myocardial infarction. *PLoS One* *10*, 1–9.
- Zhang, X., Yeung, D.C.Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z., Liu, F., Wong, R.L.C., Chow, W., Tso, A.W.K., and Lam, K.S.L. (2008). Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are in Humans. *Diabetes* *57*, 1246–1253.
- Zhao, L., Cheng, G., Jin, R., Afzal, M.R., Samanta, A., Xuan, Y.T., Girgis, M., Elias, H.K., Zhu, Y., Davani, A., et al. (2016). Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. *Circ. Res.* *118*, 1918–1929.
- Zheng, S.-L., Li, Z.-Y., Song, J., Liu, J.-M., and Miao, C.-Y. (2016). Metrnl: a secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol. Sin.* *37*, 571–579.
- Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., and Unger, R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1784–1789.
- Zhu, H., Tannous, P., Johnstone, J.L., Kong, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Le, V., Levine, B., Rothermel, B.A., and Hill, J.A. (2007). Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J. Clin. Invest.* *117*, 1782–1793.
- Zhu, S., Wu, Y., Ye, X., Ma, L., Qi, J., Yu, D., Wei, Y., Lin, G., Ren, G., and Li, D. (2016). FGF21 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by inducing autophagy. *Mol. Cell. Biochem.* *420*, 107–119.
- Zima, A. V, and Blatter, L.A. (2006). Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *71*, 310–321.
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., et al. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat. Cell Biol.* *6*, 499–506.

Apéndice



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard

Autophagic control of cardiac steatosis through FGF21 in obesity-associated cardiomyopathy



C. Rupérez^{a,b}, C. Lerin^c, G. Ferrer-Curriu^{a,b}, M. Cairo^{a,b}, A. Mas-Stachurska^d, M. Sitges^d, J. Villarroya^{a,b,e}, M. Giralt^{a,b}, F. Villarroya^{a,b}, A. Planavila^{a,b,*}

^a Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^b CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain

^c Endocrinology Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona 08950, Spain

^d Cardiology Department, Thorax Institute, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain

^e Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2017

Received in revised form 15 February 2018

Accepted 26 February 2018

Available online 5 March 2018

Keywords:

Lipid toxicity

Obesity

Gene expression

Autophagy

Metabolism

ABSTRACT

Objective: High-fat diet-induced obesity leads to the development of hypertrophy and heart failure through poorly understood molecular mechanisms. We have recently shown that fibroblast growth factor-21 (FGF21) is produced by the heart and exerts protective effects that prevent cardiac hypertrophy development and oxidative stress. The aim of this study was to determine the effects of FGF21 on the cardiomyopathy associated with obesity development.

Results: *Fgf21*^{-/-} mice showed an enhanced increase in the heart weight/tibia length (HW/TL) ratio in response to the high-fat diet. In keeping with this, echocardiographic measurements confirmed enhanced cardiac hypertrophy in *Fgf21*^{-/-} mice. At the cellular level, the area of cardiomyocytes was increased in *Fgf21*^{-/-} mice fed a high-fat diet. Furthermore, a high-fat diet induced fatty acid oxidation in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice accompanied by an increase in cardiac oxidative stress. Oil-red O staining revealed the presence of higher amounts of lipid droplets in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice fed a high-fat diet relative to wt mice fed this same diet. Finally, *Fgf21*^{-/-} mice fed a high-fat diet showed impaired cardiac autophagy and signs of inactive cardiac lipophagy, suggesting that FGF21 promotes autophagy in cardiomyocytes.

Conclusions: Our data indicate that a lack of FGF21 enhances the susceptibility of mice to the development of obesity-related cardiomyopathy. Furthermore, we demonstrate that this cardiac dysfunction is associated with deleterious lipid accumulation in the heart. An impaired ability of FGF21 to promote autophagy/lipophagy may contribute to lipid accumulation and cardiac derangements.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is reaching epidemic proportions virtually worldwide, and has been identified by the World Health Organization as a major global health challenge in coming years [1]. Obesity is one of the major risk factors that lead to heart failure, and there is concern that the growing population of obese individuals may lead to a dramatic increase in the prevalence of heart failure and disease [2,3].

In obese individuals, heart failure is characterized by early development of ventricular diastolic dysfunction, increased left ventricular mass (hypertrophy) and, ultimately, the potential development of ventricular

systolic dysfunction [4,5]. One pathway associated with obesity that is altered during the development of cardiac insufficiency is cardiac energy metabolism. Obesity produces dramatic changes in the energy metabolism of the heart, including increased oxidation of fatty acids [6]. Recent studies highlight the importance of the contribution of these changes in cardiac energy metabolism to the subsequent development of heart failure [7].

Fibroblast growth factor-21 (FGF21), an endocrine factor with known actions as a metabolic regulator, is involved in the control of glucose homeostasis, insulin sensitivity, and ketogenesis [8,9]. The liver is considered the main site of production and release of FGF21 into the blood [8,10,11], but extrahepatic tissues, such as white and brown adipose tissue and skeletal muscle, also express FGF21 [12–14]. Recent studies have demonstrated that FGF21 plays an important role in cardiac remodeling [15–20]. Notably, the heart is both a target and a source of FGF21: cardiac tissue expresses FGFR1 (fibroblast growth

* Corresponding author at: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: aplanavila@ub.edu (A. Planavila).

factor receptor 1) and β -klotho—the main molecular mediators of FGF21 action in cells—as well as FGF21 [15], the latter of which protects the heart against pathologic cardiac hypertrophy, oxidative stress, and myocardial infarction in mouse models [15,16,18].

Promising results have recently been obtained in initial pilot studies using treatment with FGF21 analogs in obese patients to ameliorate dyslipidemia and reduce body weight [21]. However, studies in both mice and humans have shown that obesity is paradoxically associated with elevated circulating levels of FGF21 and impaired FGF21 signaling [22]. Thus, obesity has been proposed to represent an FGF21-resistant state. This phenomenon of reduced FGF21 action in obesity has been attributed to the abnormal reduction in the expression of the FGF21 co-receptor, β -klotho, in white adipose tissue commonly observed in rodent models of obesity and in obese individuals [23]. This resistance phenomenon has also been described in cardiac samples from obese rats [24,25].

Here, we sought to determine the role of FGF21 in cardiac alterations during obesity. Our findings indicate that FGF21 may be a major mediator of cardiac function during obesity.

2. Methods

See Supplemental Material for an expanded Methods section.

Fgf21^{−/−} mice (B6N;129S5-*Fgf21*^{tm1Lex/Mmcd}) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center. Two-month old wild-type (wt) and *Fgf21*^{−/−} male mice were fed a standard chow diet or a diet in which 45% of calories are obtained from fat (D12451, Research Diets) for 16 weeks.

3. Results

3.1. *Fgf21* induction and β -klotho downregulation in cardiac tissue upon high fat feeding

To determine the role of FGF21 in the heart during obesogenic conditions, we subjected mice to a high-fat diet for 16 weeks (Fig. 1), a dietary regimen that has been previously reported to increase circulating FGF21 levels [23,26]. In accord with these reports, we found that plasma FGF21 levels were effectively increased by an obesogenic diet in our experimental setting (Fig. 1A). Next, we assessed the mRNA expression levels of *Fgf21*, *Fgfr1* (encoding the FGF21 receptor-1) and β -klotho, the co-receptor required for FGF21 action, in the hearts of these animals. We found a significant increase in cardiac *Fgf21* mRNA levels in mice fed a high-fat diet and no change in *Fgfr1* mRNA (Fig. 1B). We also observed a significant decrease in the expression of the coreceptor β -klotho, both at the mRNA and the protein level, in wt mice fed a high-fat diet (Fig. 1C). This result suggests some degree of cardiac FGF21 resistance, reminiscent of that proposed to occur in adipose tissues in obesity [22,23]. Next, in order to analyze the activation of the *Fgf21* intracellular pathway we measured ERK phosphorylation (Supplemental Fig. 2A). We found a significant decrease of P-ERK/ERK protein levels in *Fgf21*^{−/−} mice after high-fat feeding. Finally, we tested the direct effects of fatty acids in an *in vitro* system using primary cell cultures of rat neonatal cardiomyocytes (NCMs). We found that treatment of NCMs with oleate, or the combination of oleate and palmitate, for 24 h led to a robust increase in *Fgf21* mRNA levels, but did not alter expression of the coreceptor β -klotho (Fig. 1D). In summary, *Fgf21*

expression is upregulated upon high-fat diet feeding in the heart and in NCMs after fatty acid treatment.

3.2. *Fgf21*^{−/−} mice develop cardiac hypertrophy after a high-fat dietary regimen

To analyze the impact of systemic and cardiac FGF21 upregulation induced by an obesogenic diet, we subjected mice lacking *Fgf21* to a high-fat diet regimen. First, we analyzed the systemic alterations and cardiac consequences of feeding a high-fat diet or standard chow diet (control) in wt and *Fgf21*^{−/−} mice (Table 1). No significant differences in body weight were observed between wt and *Fgf21*^{−/−} mice on a control diet, and similar weight gains were attained after 16 weeks of treatment with a high-fat diet in both genotypes without differences in food intake. The circulating levels of glucose, insulin, and adiponectin were also unchanged. The levels of non-esterified fatty acids (NEFAs) were significantly reduced after the obesogenic diet, but no differences between wt and *Fgf21*^{−/−} mice were observed. This reduction in NEFAs levels could be ascribed to a deterioration of lipolysis in the white adipose tissue of wt mice caused by this long term diet, as previously described [27]. An analysis of the cardiac phenotype showed that the heart weight/tibia length ratio (HW/TL) was significantly increased after feeding a high-fat diet in wt mice. In *Fgf21*^{−/−} mice, both heart weight and HW/TL ratio were significantly increased after feeding an obesogenic diet, and the HW/TL ratio attained by high-fat diet-fed *Fgf21*^{−/−} mice was significantly higher than that in wt mice fed the same diet. Echocardiographic measurements (Table 1) revealed that end-diastolic and end-systolic left ventricular internal diameter (LVIDd and LVIDs, respectively), and end-diastolic and end-systolic volume (EDV and ESV), were all significantly higher in wt mice fed a high-fat diet compared with their counterparts on a control diet. No other echocardiographic measurements showed diet-dependent differences in wt animals. In *Fgf21*^{−/−} mice, LVIDd, LVIDs, EDV, ESV, internal ventricular septum in diastole (IVSd), and posterior wall thickness in diastole (PWTd) were significantly increased after a high-fat diet compared with their corresponding controls on a standard chow diet; these parameters were also significantly higher compared with those in wt animals fed a high-fat diet. The sphericity index was significantly reduced in *Fgf21*^{−/−} mice fed a high-fat diet, but not in wt mice fed a high-fat diet, indicating some degree of eccentric hypertrophy/dilatation in *Fgf21*^{−/−} mice in response to the obesogenic diet. No differences in the ejection fraction or fractional shortening were observed.

Together, these results indicate that, after high-fat diet-induced obesity, wt mice develop some signs of dilatation, but the response of *Fgf21*^{−/−} mice to the obesogenic diet is more intense, showing enhanced cardiac hypertrophy and chamber dilatation. However, no differences on cardiac contractility were observed in any of the groups.

Consistent with echocardiographic measurements, a histological examination of H&E-stained left ventricle tissue sections revealed that a high-fat diet significantly increased the cross-sectional area of cardiomyocytes in *Fgf21*^{−/−} mice, but not in wt mice (Fig. 1E).

Next, we examined mRNA expression of the hypertrophic marker gene, *Acta1* (α -skeletal actin) (Fig. 1F). The expression of this marker gene was already significantly increased in *Fgf21*^{−/−} mice under basal conditions. Feeding a high-fat diet caused an increase in *Acta1* mRNA

Fig. 1. Cardiac FGF21 system during obesity. Adult wt mice were fed either a standard chow diet (CT) or high-fat diet (HF) for 16 weeks. Plasma levels of FGF21 (A) and cardiac expression levels of *Fgf21* and *Fgfr1* mRNA (B). (C) Top: Representative immunoblot showing the levels of β -klotho protein in the heart. Bottom: Cardiac expression levels of β -klotho in the hearts of wt (black bars) and *Fgf21*^{−/−} (white bars) mice were fed either a standard chow diet (CT) or a high-fat diet (HF) for 16 weeks. (D) mRNA expression levels of *Fgf21* and β -klotho in NCMs after exposure to oleate (0.4 mM) or the combination of oleate (0.2 mM) and palmitate (0.2 mM) for 24 h. E-G, Adult wt (black bars) and *Fgf21*^{−/−} (white bars) mice were fed either a standard chow diet (CT) or a high-fat diet (HF) for 16 weeks. (E) Quantification of cardiomyocyte cross sectional area (CSA) in the left ventricular wall. (F) mRNA expression levels of the hypertrophy marker *Acta1* and the fibrosis markers *Mmp-9*, *Tgfb*, and *Col3a1*. (G) Determination of fibrosis in histological sections by Masson's Trichrome staining (magnification, 20 \times). Scale bar: 50 μ m. Arrows show fibrotic areas (blue). Results are expressed as means \pm SEMs ($n = 5$ mice/group). For NCM sections, each experiment was conducted in triplicate using at least two independent cardiomyocyte isolations. Data were analyzed by unpaired *t*-test (A, B, and C) or one-way ANOVA (D, E, and F) (* $P < 0.05$ compared with corresponding control [CT] mice or cells; $^{\#}P < 0.05$ compared with corresponding wt mice).

in wt mice, an effect that was sustained in *Fgf21*^{-/-} mice, possibly owing to the higher levels of this marker gene in basal conditions. To assess fibrosis markers, we evaluated the expression of mRNA for matrix metalloproteinase-9 (*Mmp9*), collagen-3 (*Col3a1*), and transforming growth factor- β (*Tgfb*). *Fgf21*^{-/-} mice showed significantly increased

cardiac *Mmp9* expression levels compared with wt mice in both control and high-fat dietary regimens. *Col3a1* and *Tgfb* mRNA levels tended to increase in *Fgf21*^{-/-} mice subjected to a high-fat diet, although these differences did not reach statistical significance. Finally, to assess cardiac fibrosis directly, we performed Masson's Trichrome staining. We found

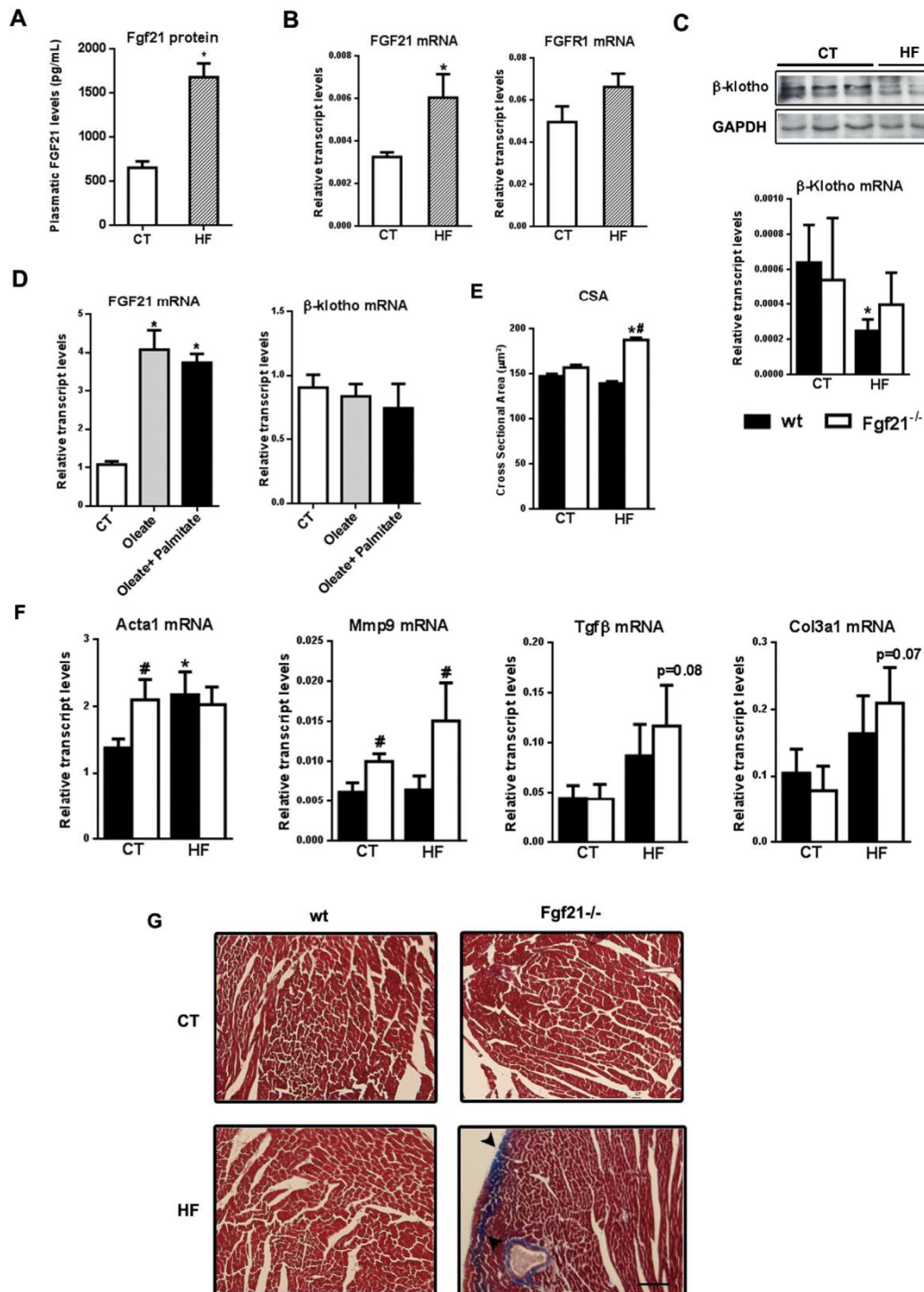


Table 1
Characterization of wild-type and FGF21^{-/-} mice after a high-fat diet feeding.

	Wild-type		FGF21 ^{-/-}	
	CT	HF	CT	HF
BW(g)	30.7 ± 1.5	42.3 ± 1.3*	26.9 ± 1.3	37.7 ± 0.7*
Food intake (kcal/mouse)	ND	1106 ± 170	ND	1307 ± 200
HW(mg)	151.8 ± 2.5	173.3 ± 4.7	150.4 ± 4.7	185.6 ± 8.0*
HW/TL(mg/mm)	8.7 ± 0.2	10.3 ± 0.3*	8.6 ± 0.3	11.2 ± 0.4*†
Glucose (mmol/L)	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.3	3.9 ± 0.3
NEFAs (mmol/L)	2.1 ± 0.5	1.2 ± 0.1*	2.15 ± 0.3	1.2 ± 0.1*
Insulin (mmol/L)	1.99 ± 0.9	15.4 ± 3.2	1.6 ± 0.7	9.2 ± 6.8
Adiponectin (µg/mL)	80.4 ± 7.5	79.4 ± 7.3	70.2 ± 7.3	74.6 ± 4.3
LVIDd (mm)	3.78 ± 0.13	4.06 ± 0.09*	3.88 ± 0.18	4.59 ± 0.03*†
LVIDs (mm)	2.47 ± 0.12	2.79 ± 0.12*	2.60 ± 0.15	3.18 ± 0.04*†
IVSd (mm)	0.69 ± 0.04	0.74 ± 0.04	0.68 ± 0.03	0.93 ± 0.03*†
IVSs (mm)	1.09 ± 0.09	1.16 ± 0.06	0.98 ± 0.05	1.26 ± 0.05*
PWTd (mm)	0.76 ± 0.07	0.75 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.90 ± 0.02*†
PWTs (mm)	1.07 ± 0.15	1.08 ± 0.05	0.89 ± 0.07	1.12 ± 0.03
EDV (mm ³)	61.50 ± 4.99	72.90 ± 3.92*	65.83 ± 7.85	96.62 ± 1.68*†
ESV (mm ³)	21.96 ± 2.67	29.73 ± 3.02*	25.21 ± 3.59	40.22 ± 1.17*†
H/R ratio	0.40 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.01
SI	2.17 ± 0.04	2.08 ± 0.03	2.14 ± 0.06	1.92 ± 0.01*†
EF (%)	69.75 ± 4.83	66.63 ± 3.01	66.57 ± 4.65	63.17 ± 1.88
FS (%)	34.88 ± 3.7	32.25 ± 2.43	32.14 ± 3.95	29.63 ± 1.09

Wild-type and FGF21^{-/-} mice were maintained on a control diet [CT] or a high-fat diet [HF] for 16 weeks. BW, body weight; HW, heart weight; HW/TL, heart weight/tibia length ratio; NEFA, non-esterified fatty acids. LVIDd and LVIDs, LV internal diameter during diastole and systole; IVSd and IVSs, internal ventricular septum during diastole and systole; PWTd and PWTs, posterior wall thickness during diastole and systole; EDV, end-diastolic volume; ESV, end-systolic volume; H/R ratio indicates eccentric versus concentric hypertrophy and is the ratio average of the left ventricular wall and septum thickness divided by one-half of the left ventricular diastolic dimension; SI, sphericity index; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening. All measurements are means ± S.E.Ms.

* $p < 0.05$ compared with corresponding control [CT] animals.

† $p < 0.05$ compared with corresponding wild-type animals.

no signs of fibrosis in wt mice under any dietary condition, but Fgf21^{-/-} mice fed a high-fat diet showed widespread fibrotic areas (Fig. 1G). Collectively, these findings indicate that, in the absence of FGF21, a high-fat diet promotes cardiac hypertrophy and sensitizes mice to hypertrophic stimuli and associated derangements such as fibrosis.

3.3. Lack of FGF21 impairs the cardiac antioxidant response to a high-fat diet

FGF21 is involved in the cardiac control of oxidative stress [28]. Therefore, we analyzed cardiac oxidative stress markers in wt and Fgf21^{-/-} mice after feeding a high-fat diet (Fig. 2). To assess the occurrence of oxidative stress in these hearts, we analyzed aconitase activity, which is known to be decreased under oxidative stress conditions [29]. We found that aconitase activity was not changed in wt mice under any dietary condition, but was significantly decreased in Fgf21^{-/-} mice fed a high-fat diet compared with Fgf21^{-/-} mice fed a standard chow diet (Fig. 2A). Finally, as a measure of oxidative stress we analyzed malondialdehyde (MDA) levels but no significant changes were observed in any of the conditions analyzed (Supplemental Fig. 2B).

Next, we examined cardiac genes encoding proteins involved in antioxidant pathways, including Ucp3, Cat (catalase), Gpx1 (glutathione peroxidase-1), Sod2 (superoxide dismutase 2), and Prdx5 (peroxiredoxin 5), under basal conditions and in response to a high-fat diet (Fig. 2B). We found no differences in the expression levels of

the studied genes between wt and Fgf21^{-/-} mice under basal conditions. However, after feeding a high-fat diet, the cardiac expression levels of Ucp3, Cat, Gpx1 and Prdx5 genes were markedly induced in wt mice, but were unchanged in high-fat diet-fed Fgf21^{-/-} mice. Finally, we analyzed the protein levels of UCP3 in these cardiac samples (Fig. 2C, Supplemental Fig. 3A). These analyses showed that UCP3 protein levels were increased upon high-fat diet feeding in wt mice, but not in Fgf21^{-/-} mice, suggesting a lower antioxidant capacity in these latter animals.

Collectively, these data suggest that, in the absence of FGF21, mouse hearts may fail to elicit an adaptive antioxidant response to confront an obesogenic diet.

3.4. Fgf21^{-/-} mice subjected to an obesogenic diet show lipid accumulation in the heart

Because one of the main causes of cardiac dysfunction during obesity may be the accumulation of lipids in the heart [6,30,31], we next analyzed the presence of lipid droplets in cardiac samples by Oil red O staining (Fig. 2D). We found no evidence for the presence of significant lipid droplets in hearts from wt animals fed either a standard chow or high-fat diet. However, lipid staining was dramatically increased in cardiac samples from Fgf21^{-/-} mice fed a high-fat diet.

Next, to determine the mechanism responsible for this lipid accumulation, we analyzed the molecular pathways involved in lipid management in the heart. To this end, we assessed mRNA expression levels of the genes Hsl (hormone-sensitive lipase) and Atgl (adipocyte triglyceride lipase), involved in lipolysis; Dgat (diacylglycerol acyltransferase), involved in triglyceride biosynthesis; and Lpl (lipoprotein lipase), involved in lipid uptake (Fig. 2E). Surprisingly, we found no differences in any of these genes under either standard chow or a high-fat diet conditions in wt or Fgf21^{-/-} mice. We also found no significant changes in the expression of the Pparg gene, encoding the adiposity-related protein PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma), or the Plin5 gene (perilipin-5), which is associated with lipid droplets in the heart, in wt mice under either dietary regimen. However, cardiac mRNA expression levels of Pparg and Plin5 were upregulated in Fgf21^{-/-} mice on a standard chow diet and remained high after feeding a high-fat diet.

Considering that a high-fat diet is known to induce fatty acid oxidation (FAO) in the heart [6,31], we examined FAO rates as well as the expression of FAO-associated genes. The FAO rate was significantly enhanced after a high-fat diet in both wt and Fgf21^{-/-} mice (Fig. 2F). However, no differences were found between wt and Fgf21^{-/-} mice under either basal or high-fat diet conditions. Moreover, transcript levels of the FAO-related genes, Pdk4 (pyruvate dehydrogenase kinase-4) and Acox (acyl-CoA oxidase) trended higher after a high-fat diet in wt and Fgf21^{-/-} mice, reaching statistical significance in wt mice (Fig. 2F). Collectively, these findings indicate that the lipid metabolic performance of the heart, as reflected in both lipid anabolic and catabolic pathways, was not essentially different between wt and Fgf21^{-/-} mice after feeding a high-fat diet.

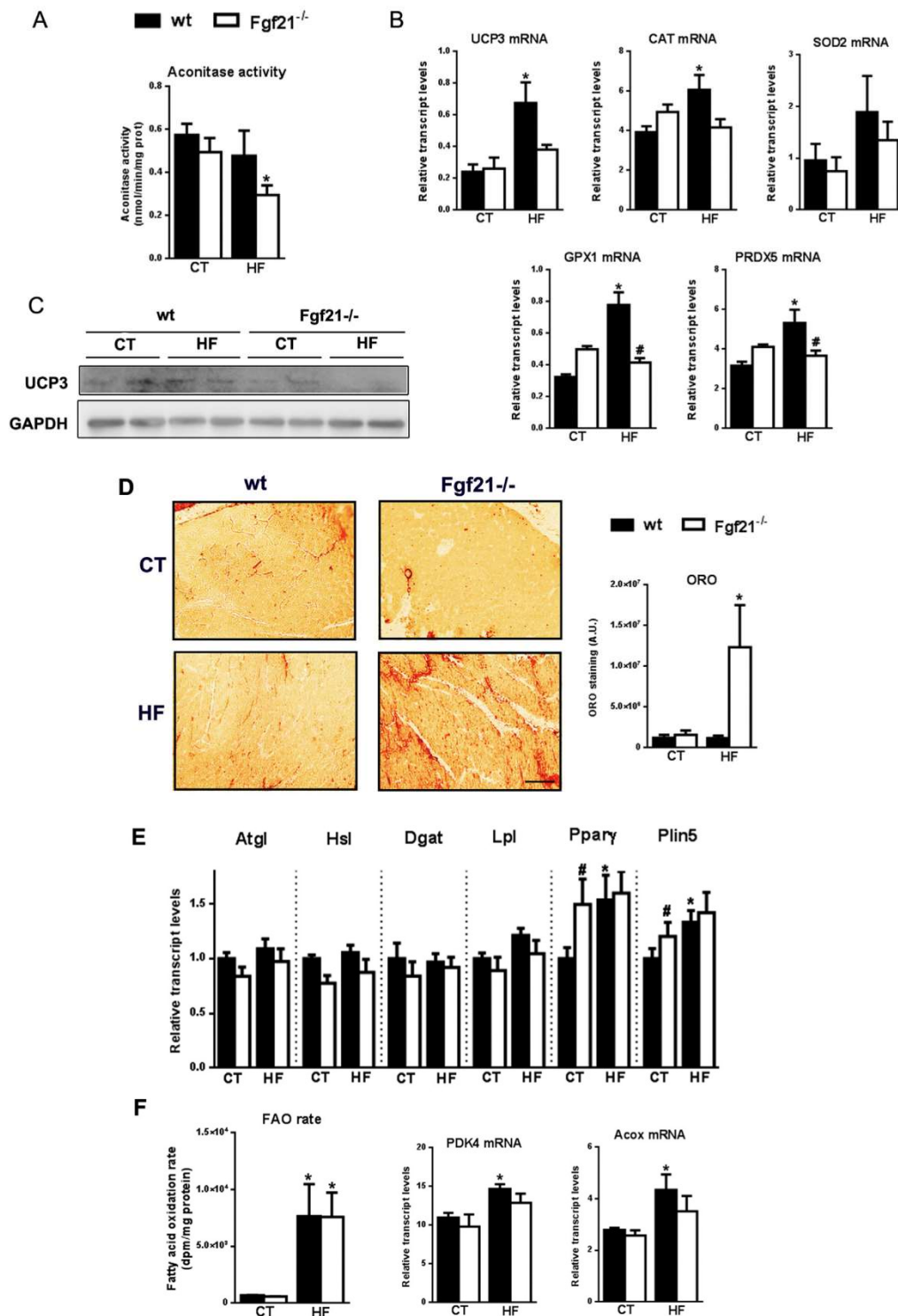
They further indicate that a high-fat diet causes Fgf21^{-/-} mice to accumulate high levels of lipids in the heart, which could contribute to the observed exacerbation of cardiac derangements. However, transcriptional regulation of the classical pathways of lipid droplet management or changes in FAO pathways cannot explain such lipid accumulation.

Fig. 2. Oxidative stress and fatty acid metabolism in hearts from wt and Fgf21^{-/-} mice: effects of a high-fat diet. Adult wt (black bars) and Fgf21^{-/-} (white bars) mice were fed either a standard chow diet (CT) or a high-fat diet (HF) for 16 weeks. (A) Aconitase activity (nmol/min/mg protein), determined from protein extracts from cardiac samples. (B) Cardiac mRNA expression levels of the antioxidant genes, Ucp3, Cat, Sod2, Gpx1, and Prdx5. (C) Western blot analysis of UCP3 protein levels in the heart. GAPDH and Ponceau staining (PS) were used as loading controls. (D) Left: Representative two-cardiac chamber (axial) histological sections of hearts stained with Oil red O (ORO; magnification, 20 \times). Scale bar: 50 μ m. Right: Quantification of ORO in the left ventricular wall. (E) Cardiac mRNA expression levels of genes involved in lipid management. (F) FAO rates in homogenates from freshly isolated hearts and mRNA expression levels of the lipid catabolism genes Pdk4 and Acox. Results are expressed as means \pm SEMs (n = 5 mice/group). Data were analyzed by one-way ANOVA (* $P < 0.05$ compared with corresponding control [CT] mice; # $P < 0.05$ compared with corresponding wt mice).

3.5. Cardiac autophagy is blocked in *Fgf21*-null mice subjected to a high-fat diet

Autophagy is a molecular mechanism responsible of degradation of intracellular components including lipid droplets, phenomena known

as lipophagy. In order to determine the molecular mechanism behind lipid accumulation in *Fgf21*-null mice we first analyzed autophagy-related genes such as *Atg7*, *Ulk1*, *Lc3b*, *Bnip3* and *Tfeb* (Fig. 3A). In wt mice, we found a significant increase of the autophagy-related genes, except *Tfeb*, in response to the high-fat diet treatment. However, this



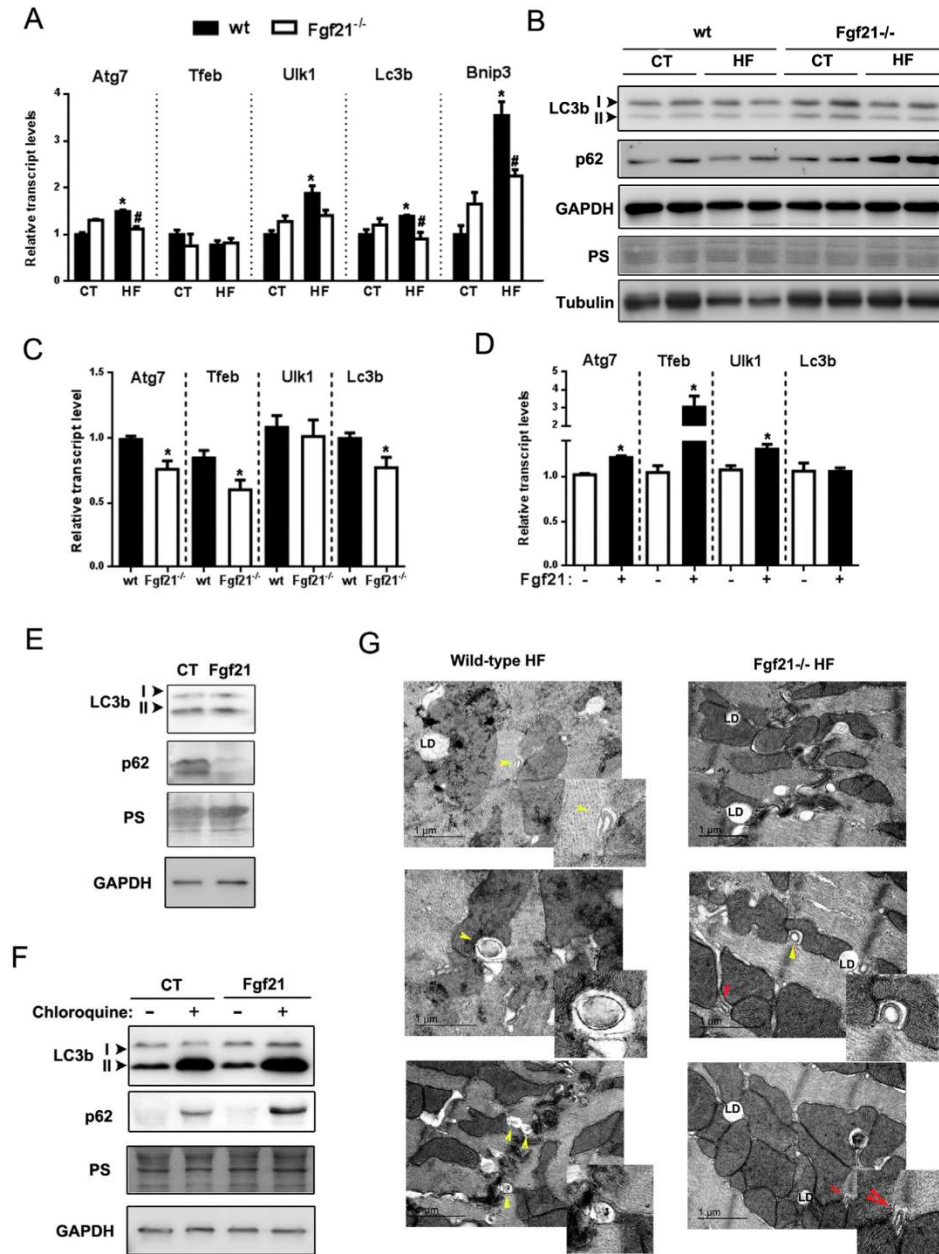


Fig. 3. FGF21 is involved in the cardiac control of autophagy. Adult wt (black bars) and *Fgf21*^{-/-} (white bars) mice were fed either a standard chow diet (CT) or a high-fat diet (HF) for 16 weeks. (A) Expression levels of the autophagic genes *Atg7*, *Tfeb*, *Ulk1*, *Lc3b*, and *Bnip3*. (B) Western-blot analysis of LC3B and p62 protein levels in the heart. GAPDH and Ponceau staining (PS) were used as loading controls. (C) Expression levels of autophagic genes in mNCMs from wt (black bars) and *Fgf21*^{-/-} (white bars) mice. (D) Expression levels of autophagic genes in NCMs in the presence or absence of FGF21 (50 nM). (E-F) Western blot analysis of LC3B and p62 protein levels in NCMs exposed to FGF21 for 24 h with or without chloroquine (50 μM), added 8 h before harvesting. Ponceau staining (PS) and GAPDH protein were used as loading controls. (G) Representative transmission electron microscopy images of hearts from wt and *Fgf21*^{-/-} mice fed a high-fat diet (HF) for 16 weeks. Yellow arrowheads indicate autophagosomes containing lipids. Red arrowheads indicate autophagosomes containing cytoplasmic substrates without lipids. LD: Lipid droplets. Results are expressed as means ± SEMs (n = 5 mice/group). Data were analyzed by one-way ANOVA (*P < 0.05 compared with corresponding control [CT] mice or cells; #P < 0.05 compared with corresponding wt mice).

up-regulation was impaired in *Fgf21*-null mice upon high-fat feeding. Next, in order to determine the autophagic activity, we examined the levels of the phosphatidylethanolamine-conjugated microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3B-II) [32] and the p62 levels (Fig. 3B, Supplemental Fig. 3A). Immunoblotting analyses showed no

significant changes in LC3B-I or LC3B-II and in p62 protein in heart from wt animals at any dietary condition. In basal conditions, *Fgf21*-null mice showed increased levels of LC3BII that might indicate some activation of autophagy, but this was not accompanied by a reduction in p62 levels. However, in high fat diet-fed *Fgf21*-null mice, we found

a dramatic accumulation of the autophagic substrate of degradation p62 which is statistically significant, consistent with a reduction in autophagy.

Next, we analyzed the mitophagy genes Pink1 and Parkin (Supplemental Fig. 3B). No significant changes either at the mRNA or protein levels (in the case of Parkin) were observed. Moreover, mitochondrial activity was preserved in all the conditions (Supplemental Fig. 3C).

In order to confirm a cardiac cell-autonomous role of *Fgf21* on autophagy, we first analyzed the expression levels of autophagy-related genes (*Atg7*, *Tfeb*, *Ulk1* and *Lc3b*) in mouse neonatal cardiomyocytes from wt and *Fgf21*-null mice (Fig. 3C). We found that the mRNA levels from the autophagy-related genes analyzed, (except *Ulk1*), were significantly decreased in mNCMs from *Fgf21*-null mice compared to mNCMs from wt mice. Next, we treated neonatal cardiomyocytes with *Fgf21* for 24 h and analyzed autophagy-related genes (Fig. 3D). We found that the expression levels of *Atg7*, *Ulk1* and specially *Tfeb*, were significantly increased after *Fgf21* treatment. Finally we analyzed the protein levels of *LC3b I/II* and *p62* in neonatal cardiomyocytes exposed to *Fgf21* (Fig. 3E). We found that treatment with *Fgf21* did not modify *LC3b II* protein levels whereas it caused a dramatic decrease in the *p62* protein levels, indicating that *Fgf21* induces autophagy in cardiomyocytes. In order to further confirm the activation of autophagic flux by *Fgf21*, we treated NCMs with *Fgf21* in the presence or absence of the autophagy inhibitor chloroquine (Fig. 3F). We found an accumulation of *LC3bII* and *p62* in the cells treated with chloroquine, indicating some extent of basal autophagic activity in cardiomyocytes in culture. However, in NCMs treated with *Fgf21* in the presence of chloroquine, the accumulation of *LC3bII* and *p62* protein levels was enhanced compared to the untreated cardiomyocytes therefore confirming the activation of the autophagic flux in response to *Fgf21* in cardiac cells.

Finally, we examined the subcellular structure of heart sections from wt or *Fgf21*-null mice subjected to a chow (data not shown) or a high-fat diet using transmission electron microscopy (Fig. 3G). In wt mice subjected to the obesogenic diet, we observed the presence of multiple degradation vesicles consistent with an autophagosome structure. Many of these vesicles contained small fat droplets or a big droplet, indicative of lipophagy. However, this type of lipid degradation vesicle was largely absent in images of *Fgf21*-null mice exposed to a high-fat diet.

4. Discussion

In the present study, we describe for the first time the impact of the FGF21 system at the cardiac level in diet-induced obesity in mice. We show that high-fat diet-induced obesity increases systemic levels of FGF21, in agreement with previous studies [23,26], but also elevates cardiac *Fgf21* expression levels. Moreover, high-fat diet-induced obesity reduced cardiac β -klotho levels in wt animals, suggesting some degree of cardiac resistance to FGF21 in obese mice, as previously reported in rats [24,25]. In accord with previous reports [22,33], high-fat diet feeding induced a similar response in wt and *Fgf21*^{-/-} mice in terms of body weight, glucose, and NEFAs, further supporting the phenomena of systemic resistance to FGF21. By contrast, no hyperinsulinemia was observed in *Fgf21*^{-/-} mice probably due to the lower age of mice. However, in cardiac tissue, an FGF21 insufficiency (*Fgf21*^{-/-} mice) further enhanced the cardiac hypertrophy associated with obesity, despite the reduced levels of β -klotho, indicating that cardiac resistance does not completely attenuate FGF21 actions in wt obese mice. Alternatively, the possibility that downregulation of β -klotho expression is not a major contributor to impaired FGF21 signaling cannot be ruled out, in agreement with a very recent study in white adipose tissue [34]. Furthermore, the lack of genotype-dependent systemic differences in the response to an obesogenic diet further supports the idea that the effects of FGF21 in cardiac tissue are direct rather than indirect. Although it has been reported that the cardioprotection associated with FGF21 could be indirect through adiponectin [18], the circulating levels of adiponectin

were not fundamentally different among our experimental groups, suggesting a direct protective role of FGF21 rather than an adiponectin-mediated effect.

Consistent with our results showing enhanced lipid accumulation in hearts of *Fgf21*^{-/-} obese mice, it has been reported that *Fgf21* deletion significantly aggravates cardiac lipid accumulation in mouse models of diabetes [35,36], but the underlying molecular mechanism remained unclear. Here, we identify autophagy/lipophagy as a new molecular mechanism involved in this cardiac lipid accumulation in response to FGF21. Although it is thought that there is a general reduction in autophagy in tissues such as liver and heart during obesity [37–40], to our knowledge, the potential involvement of lipophagy specifically during cardiac dysfunction has not been previously addressed. A few reports have described a role for FGF21 in the control of autophagy [41,42], but a specific role for FGF21 in lipophagy has not been investigated in a cardiac context. Accumulation of lipid droplets in the heart is a pathogenic event that is associated with lipotoxicity, and is ultimately responsible for cardiac dysfunction, remodeling and ultimately heart failure development [31]. Thus, FGF21-mediated control of lipophagy might be a protective mechanism that counteracts pathological lipotoxic events that lead to cardiac dysfunction during obesity. Collectively, these results indicate that FGF21 is involved in the control of autophagy in the heart and that the lack of FGF21 results in impaired cardiac autophagy with consequences for cardiac lipid accumulation under high-fat diet conditions.

In our model, the accumulation of lipids in cardiac muscle during obesity was also accompanied by accelerated myocardial FAO rates and some cardiac dysfunction, as previously reported [43,44]. By contrast with our previous studies in other models of cardiac dysfunction [15,19], we found that genetic ablation of *Fgf21* had no effect on the FAO rate.

There is still some debate regarding the cardiac consequences of a high-fat diet [45–47]. In wt animals, we observed mild effects of an obesogenic diet on cardiac function and saw no signs of hypertrophy. These data contrast with the commonly held belief that obesity predisposes to cardiac dysfunction and remodeling, and that a high-fat diet leads to cardiac hypertrophy and heart failure [48,49]. However, multiple studies have reported that high-fat feeding causes mild effects on cardiac function and no overt cardiac hypertrophy [50]. The type of diet, the duration of the treatment, and/or species differences might explain these apparently conflicting data [46]. What is clear from our study is that a FGF21 deficiency predisposes to the development of cardiac hypertrophy, dilatation and fibrosis after an obesogenic diet, further confirming the critical role of FGF21 for normal cardiac performance.

In summary, we here show that FGF21 is a key mediator of cardiac function during obesity. We also establish for the first time that FGF21 is a relevant component of the molecular machinery that controls autophagy during the development of the cardiomyopathy associated with obesity. These findings may have important biomedical implications for obesity-associated heart failure.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.02.109>.

Sources of funding

AP is supported by a RYC-2014-16,572 fellowship. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2014-55702-JIN and SAF2014-55725), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF); Generalitat de Catalunya (2014GR-141); Fundació la Marató de TV3; Sociedad Española de Cardiología (SEC); and Fundación BBVA.

Disclosures

None.

References

- [1] J.C. Seidell, Obesity, insulin resistance and diabetes—a worldwide epidemic, *Br. J. Nutr.* 83 (Suppl. 1) (March, 2000) S5–S8.
- [2] M.S. Lauer, K.M. Anderson, W.B. Kannel, D. Levy, The impact of obesity on left ventricular mass and geometry, *The Framingham heart study*, *JAMA* 266 (2) (July 10, 1991) 231–236.
- [3] H.B. Hubert, M. Feinleib, P.M. McNamara, W.P. Castelli, Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study, *Circulation* 67 (5) (May, 1983) 968–977.
- [4] R.B. Devereux, M.J. Roman, M. Paranicas, et al., Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study, *Circulation* 101 (19) (May 16, 2000) 2271–2276.
- [5] Y. Zhang, J. Ren, Epigenetics and obesity cardiomyopathy: from pathophysiology to prevention and management, *Pharmacol. Ther.* 161 (May, 2016) 52–66.
- [6] J. Sakamoto, R.L. Barr, K.M. Kavanagh, G.D. Lopaschuk, Contribution of malonyl-CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic heart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (4) (April, 2000) H1196–H1204.
- [7] W.C. Stanley, F.A. Recchia, G.D. Lopaschuk, Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart, *Physiol. Rev.* 85 (3) (2005 July) 1093–1129.
- [8] M.K. Badman, P. Pissios, A.R. Kennedy, G. Koukos, J.S. Flier, E. Maratos-Flier, Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states, *Cell Metab.* 5 (6) (2007 June) 426–437.
- [9] C. Galman, T. Lundasen, A. Kharitonov, et al., The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man, *Cell Metab.* 8 (2) (2008 August) 169–174.
- [10] T. Inagaki, P. Dutchak, G. Zhao, et al., Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21, *Cell Metab.* 5 (6) (2007 June) 415–425.
- [11] E. Hondares, M. Rosell, F.J. Gonzalez, M. Giral, R. Iglesias, F. Villarroya, Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat, *Cell Metab.* 11 (3) (March 3, 2010) 206–212.
- [12] E.S. Muijs, B. Azzolina, D.W. Kuo, et al., Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states, *Mol. Pharmacol.* 74 (2) (August, 2008) 403–412.
- [13] Y. Izumiya, H.A. Bina, N. Ouchi, Y. Akasaki, A. Kharitonov, K. Walsh, FGF21 is an Akt-regulated myokine, *FEBS Lett.* 582 (27) (November 12, 2008) 3805–3810.
- [14] E. Hondares, R. Iglesias, A. Giral, et al., Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue, *J. Biol. Chem.* 286 (15) (April 15, 2011) 12983–12990.
- [15] A. Planavila, I. Redondo, E. Hondares, et al., Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice, *Nat. Commun.* 4 (June 17, 2013) 2019.
- [16] A. Planavila, I. Redondo-Angulo, F. Ribas, et al., Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress, *Cardiovasc. Res.* 106 (1) (Apr 1, 2014) 19–31.
- [17] S.Q. Liu, D. Roberts, A. Kharitonov, et al., Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2767.
- [18] Y. Joki, K. Ohashi, D. Yuasa, et al., FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459 (1) (March 27, 2015) 124–130.
- [19] I. Redondo-Angulo, A. Mas-Stachurska, M. Sitges, et al., Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy, *Cardiovasc. Res.* 113 (13) (Nov 1, 2017) 1574–1584.
- [20] P. Tanajak, S.C. Chattipakorn, N. Chattipakorn, Effects of fibroblast growth factor 21 on the heart, *J. Endocrinol.* 227 (2) (November, 2015) R13–R30.
- [21] G. Gaich, J.Y. Chien, H. Fu, et al., The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes, *Cell Metab.* 18 (3) (September 3, 2013) 333–340.
- [22] F.M. Fisher, P.C. Chui, P.J. Antonellis, et al., Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state, *Diabetes* 59 (11) (November, 2010) 2781–2789.
- [23] J. Diaz-Delfin, E. Hondares, R. Iglesias, M. Giral, C. Caellas, F. Villarroya, TNF-alpha represses beta-klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway, *Endocrinology* 153 (9) (September, 2012) 4238–4245.
- [24] V. Patel, R. Adya, J. Chen, et al., Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts, *PLoS One* 9 (2) (2014), e87102.
- [25] P. Tanajak, P. Sa-Nguanmoo, X. Wang, et al., Fibroblast growth factor 21 (FGF21) therapy attenuates left ventricular dysfunction and metabolic disturbance by improving FGF21 sensitivity, cardiac mitochondrial redox homeostasis and structural changes in pre-diabetic rats, *Acta Physiol (Oxf.)* 217 (4) (August, 2016) 287–299.
- [26] P.A. Dutchak, T. Katafuchi, A.L. Bookout, et al., Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the anti-diabetic actions of thiazolidinediones, *Cell* 148 (3) (February 3, 2012) 556–567.
- [27] E. Lucas, R. Vila-Bedmar, A.C. Arcones, et al., Obesity-induced cardiac lipid accumulation in adult mice is modulated by G protein-coupled receptor kinase 2 levels, *Cardiovasc. Diabetol.* 15 (1) (November 10, 2016) 155.
- [28] A. Planavila, I. Redondo-Angulo, F. Ribas, et al., Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress, *Cardiovasc. Res.* 106 (1) (April 1, 2015) 19–31.
- [29] D. Cantu, J. Schaack, M. Patel, Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H2O2-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures, *PLoS One* 4 (9) (2009), e7095.
- [30] A. Fukushima, G.D. Lopaschuk, Acetylation control of cardiac fatty acid beta-oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure, *Biochim. Biophys. Acta* 1862 (12) (December, 2016) 2211–2220.
- [31] A. Fukushima, G.D. Lopaschuk, Cardiac fatty acid oxidation in heart failure associated with obesity and diabetes, *Biochim. Biophys. Acta* 1861 (10) (October, 2016) 1525–1534.
- [32] D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), *Autophagy* 12 (1) (2016) 1–222.
- [33] G. Singhal, F.M. Fisher, M.J. Chee, et al., Fibroblast growth factor 21 (FGF21) protects against high fat diet induced inflammation and islet hyperplasia in pancreas, *PLoS One* 11 (2) (2016), e0148252.
- [34] K.R. Markan, M.C. Naber, S.M. Small, L. Peltekian, R.L. Kessler, M.J. Potthoff, FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue, *Mol Metab* 6 (6) (June, 2017) 602–610.
- [35] X. Yan, J. Chen, C. Zhang, et al., FGF21 deletion exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating cardiac lipid accumulation, *J. Cell. Mol. Med.* 19 (7) (2015 Jul) 1557–1568.
- [36] C. Zhang, Z. Huang, J. Gu, et al., Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway, *Diabetologia* 58 (8) (2015 Aug) 1937–1948.
- [37] M. An, D.R. Ryu, P.J. Won, et al., ULK1 prevents cardiac dysfunction in obesity through autophagy-mediated regulation of lipid metabolism, *Cardiovasc. Res.* 113 (10) (Aug 1, 2017) 1137–1147.
- [38] C.W. Lin, H. Zhang, M. Li, et al., Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice, *J. Hepatol.* 58 (5) (May, 2013) 993–999.
- [39] H. Koga, S. Kaushik, A.M. Cuervo, Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion, *FASEB J.* 24 (8) (August, 2010) 3052–3065.
- [40] X. Xu, Y. Hua, S. Nair, Y. Zhang, J. Ren, Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation, *J. Mol. Cell Biol.* 5 (1) (February, 2013) 61–63.
- [41] S. Zhu, Y. Wu, X. Ye, et al., FGF21 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by inducing autophagy, *Mol. Cell. Biochem.* 420 (1–2) (September, 2016) 107–119.
- [42] J. Zhang, Y. Cheng, J. Gu, et al., Fenofibrate increases cardiac autophagy via FGF21/SIRT1 and prevents fibrosis and inflammation in the hearts of type 1 diabetic mice, *Clin. Sci. (Lond.)* 130 (8) (April, 2016) 625–641.
- [43] P.K. Mazumder, B.T. O'Neill, M.W. Roberts, et al., Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts, *Diabetes* 53 (9) (September, 2004) 2366–2374.
- [44] J. Buchanan, P.K. Mazumder, P. Hu, et al., Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity, *Endocrinology* 146 (12) (December, 2005) 5341–5349.
- [45] B.M. van, A. Planavila, Fatty acids and cardiac disease: fuel carrying a message, *Acta Physiol (Oxf.)* 211 (3) (July, 2014) 476–490.
- [46] H. Bugger, E.D. Abel, Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy, *Diabetologia* 57 (4) (April, 2014) 660–671.
- [47] S.C. Kolwicz Jr., S. Purohit, R. Tian, Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes, *Circ. Res.* 113 (5) (August 16, 2013) 603–616.
- [48] A.F. Ceylan-Isik, M.R. Kandadi, X. Xu, et al., Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 63 (October, 2013) 4–13.
- [49] D.M. Owens, C. Boer, M. Fodor, et al., Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats, *Diabetologia* 48 (6) (June, 2005) 1229–1237.
- [50] J. Yan, M.E. Young, L. Cui, G.D. Lopaschuk, R. Liao, R. Tian, Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity, *Circulation* 119 (21) (June 2, 2009) 2818–2828.