

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Rol de la policistina-1 en la muerte de los
cardiomiocitos y su asociación con BCL-2/NIX”**

Cristian Alejandro Espinoza Calvo

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN FISIOLÓGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dra. Zully Pedrozo Cibils

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

CRISTIAN ALEJANDRO ESPINOZA CALVO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 5 de octubre del 2017

Prof. Dra. Zully Pedrozo Cibils

Directora de Tesis

Programa de Fisiología y Biofísica

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Manuel Estrada H.

Prof. Dr. Rodrigo Castillo P.

Prof. Dra. Julia Guerrero P.

Presidente Comisión

Este trabajo va dedicado a ti, mi amada Anita, ¿A quién más sino a ti? Si fuiste tú quien siempre estuvo conmigo en las buenas, en las malas y en las aún más malas, quien me amó y me soportó durante todo el duro proceso de terminar esta tesis, quien siempre me impulsó a caminar aun cuando ya me había dado por vencido...

Sin ti... este documento jamás habría existido.

Agradecimientos

Este trabajo lo he conseguido gracias al apoyo de mucha gente que ha estado conmigo incluso desde antes de ingresar al programa de Magíster.

Agradezco profundamente a Claudio Suárez, quien me dio el empujón final para entrar en el programa, a Rodrigo Cornejo y Juan Pablo Miranda, ambos médicos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, quienes me dieron su apoyo y sus cartas de recomendación. A mis colegas del turno 1 y del turno 3 del Intermedio Médico, quienes siempre me ayudaron con la difícil misión de gestionar mis turnos, y me animaron a seguir adelante pese a lo difícil que fue todo el proceso.

Agradezco muy encarecidamente a mi tutora, Zully Pedrozo, quien me acogió desde que comencé con esta tesis, quien me dio su paciencia, su confianza, y un espacio donde desarrollarme, aun a sabiendas de que el trabajo de laboratorio me fuese algo completamente desconocido. Agradezco la amabilidad y el apoyo desinteresado de Pablo Aránguiz, Adriana Cordova-Casanova, Ivonne Olmedo y Magdalena Gonzalez, ya que, sin ustedes, este trabajo no se podría haber terminado.

A todos a quienes he mencionado, y algunos más que se me escapan, les agradezco enormemente por darme la oportunidad para permitir que mi sueño de convertirme en un científico se haya hecho una realidad.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Tipos de muerte celular y desarrollo de patologías cardiacas.....	10
Muerte celular inducida por apoptosis y la vía BCL-2 y BNIP3L/NIX.....	11
Policistina como mecanosensor	13
Policistina-1 y su función en el tejido cardiaco	14
Relación entre policistina-1 y BCL-2	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Modelo animal y grupos de estudio.....	18
2. Cultivo de cardiomiocitos neonatos y transfecciones	18
3. Obtención de corazones de ratones C57BL/6	19
4. Modelo de estrés mecánico.....	19
5. Medición de la actividad lactato deshidrogenasa	20
6. Western blot	20
7. Aislamiento y cuantificación del RNA mensajero por RT-PCR cuantitativa	21
8. Citometría de Flujo	22
9. Reactivos.....	22
10. Análisis estadístico y cálculo del tamaño de muestras	22
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN	33
BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

Introducción: La muerte de los cardiomiocitos induce la pérdida de función del corazón y el desarrollo de diferentes patologías, sin embargo, se desconoce a cabalidad los mecanismos implicados. La poliestireno-1 (PC1) es un mecanosensor presente en los cardiomiocitos, clave en la función cardíaca, por lo que su presencia en los cardiomiocitos podría implicar la protección de los mismos ante un estrés celular. La necrosis y la apoptosis son dos principales tipos de muerte celular. Durante la apoptosis diferentes vías de señalización son reguladas, donde BCL-2 es una proteína clave como anti-apoptótica mientras NIX es pro-apoptótica. Las variaciones entre ellas son importantes para determinar las vías implicadas en la apoptosis. Debido a que la PC1 es un mecanosensor, en este proyecto se propuso estudiar el papel de la PC1 en la protección de los cardiomiocitos ante procesos de muerte celular, especialmente el ligado a la apoptosis inducida por estrés hiposmótico.

Hipótesis: La ausencia de la poliestireno-1 induce la muerte del tejido cardíaco en condiciones basales y predispone a la muerte de los cardiomiocitos en cultivo sometidos a estrés mecánico, asociado a una disminución de la relación BCL-2/NIX.

Materiales y métodos: Se utilizaron cardiomiocitos de ventrículo de ratas neonatas en cultivo, silenciadas para la PC1 (siPC1), en condiciones basales y sometidas a estrés mecánico con un medio hipo-osmótico (HS) y muestras de tejido cardíaco de ratones jóvenes y seniles, controles y *knockout* para la PC1 (PC1 KO) en los cardiomiocitos.

Resultados: La deficiencia de PC1 en los cardiomiocitos (siPC1) induce la muerte por apoptosis de los mismos mientras aumenta la muerte posterior a un estrés hiposmótico. La relación BCL-2/NIX disminuye en los cardiomiocitos siPC1 sometidos a estrés mecánico, debido principalmente a la disminución del contenido de BCL-2 en condiciones basales. Por otro lado, los animales PC1 KO no muestran diferencias en el contenido de BCL-2 o NIX, pero sí muestran un aumento del contenido de Bax, otra proteína pro-apoptótica.

Conclusión: Nuestros datos indican que la PC1 tiene un papel regulador de la apoptosis en los cardiomiocitos, aún en condiciones basales y, al menos en parte, por evitar la disminución del contenido de proteínas pro-apoptóticas como BCL-2 y el aumento de NIX ante un estrés hiposmótico.

ABSTRACT

Background: Cardiomyocyte death leads to the loss of the heart function and the development of different pathologies; however, the implied mechanisms are poorly understood. Polycystin-1 (PC1) is a mechanosensor present in the cardiomyocytes, key in the heart function, so its presence in cardiomyocytes may involve the protection of them against a cellular stress. Necrosis and apoptosis are the two major classes of cellular death. During apoptosis, different signaling pathways are regulated, where BCL-2 is a key anti-apoptotic protein whereas NIX is pro-apoptotic. The variations between them are relevant to determinate the implied pathways in the apoptosis. Since PC1 is a mechanosensor, this project aims to study the role of PC1 in the protection of the cardiomyocytes against the processes of cellular death, especially the one linked to apoptosis induced by hiposmotic stress.

Hypothesis: The absence of Polycystin-1 induces the death of the cardiac tissue in basal conditions and predisposes to the death the cardiomyocytes in culture subjected to mechanical stress, associated with a decrease in the BCL-2/NIX ratio.

Materials and methods: Neonatal rat ventricular cardiomyocytes, PC-1 silenced (siPC1), where used, in basal conditions and subjected to mechanical stress with a hypo-osmotic medium (HS), and samples of young and senile rat cardiac tissue, control and knockout for PC1 (PC1 KO) in the cardiomyocyte.

Results: PC1 deficiency in cardiomyocytes (siPC1) induces death by apoptosis of them while increasing death following hypo-osmotic stress. The BCL-2/NIX ratio decreases in siPC1 cardiomyocytes subjected to mechanical stress, mainly due to the decrease in BCL-2 content at baseline conditions. Conversely, PC1 KO animals do not show differences in BCL-2 or NIX content, but they do show an increase in the content of Bax, another pro-apoptotic protein.

Conclusion: Our data suggest that PC1 has a regulatory role for apoptosis in the cardiomyocytes, even under basal conditions and, at least in part, to avoiding the reduction of the pro-apoptotic protein content as BCL-2, and the increase in NIX content to a hypo-osmotic stress.

INTRODUCCIÓN

El corazón está formado por diferentes tipos de células, las que contribuyen a sus propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas. Entre ellas, las células endoteliales se encuentran en el revestimiento de los vasos sanguíneos, en el endocardio y en las válvulas cardíacas. Las células musculares lisas contribuyen en el flujo de entrada y salida de las arterias coronarias. Células precursoras de vasos coronarios y fibroblastos cardíacos se encuentran en el epicardio y las células marcapasos y las fibras de Purkinje generan y conducen los impulsos eléctricos (1). Por último, las células musculares cardíacas o cardiomiocitos llevan a cabo la función de contracción del corazón y la consecuente eyección de la sangre hacia los tejidos periféricos. Debido a que los cardiomiocitos son células terminalmente diferenciadas, cualquier proceso que induzca la muerte de los mismos puede constituir una causa de disminución de la función cardíaca y el desarrollo de diferentes patologías.

En cada ciclo cardíaco, el corazón se encuentra sometido a un proceso fisiológico de estiramiento mecánico, donde las fuerzas internas como la contracción y relajación, o la deformación de la membrana celular, son sensadas a través de receptores llamados mecanosensores, los cuales transforman la señal mecánica en química, permitiendo su integración río abajo para regular la sobrevivencia celular, entre otros (2).

Un estiramiento sostenido o mayor al fisiológico se define como estrés mecánico (EM), el cual es capaz de modular, a su vez, el crecimiento, remodelamiento eléctrico y cambios en la expresión génica que derivan en la sobrevivencia o la muerte (apoptosis, por ejemplo), de los cardiomiocitos (2), entre otras cosas. El EM ha sido señalado como una de las primeras causas del daño y el desarrollo de diferentes patologías, como la hipertrofia cardíaca o el aumento de la muerte de los cardiomiocitos durante el infarto del miocardio (isquemia/reperfusión, IR), producido por la disminución del aporte de oxígeno y nutrientes a las células.

En el caso de la IR, el EM es producido por el aumento del volumen celular durante la reperfusión a causa del incremento de osmolaridad celular durante la isquemia (3, 4). Más aún, dicha muerte puede verse exacerbada ante una sobrecarga de presión previa a la IR (3). No obstante, en controversia con lo anterior, algunos estudios sugieren que, si el estrés mecánico es desarrollado previo a un infarto del miocardio, este confiere protección al tejido cardíaco (5). En cuanto a la hipertrofia cardíaca, la misma puede ser dividida en fisiológica, básicamente cuando no está asociada a falla cardíaca y patológica, cuando efectivamente lleva a un deterioro mantenido en la función, relacionado entre otros al incremento crónico en la carga hemodinámica con asociación a la muerte de los cardiomiocitos, disfunción sistólica y diastólica (6).

Por otro lado, fisiológicamente el envejecimiento cardíaco es caracterizado por un deterioro progresivo tanto a nivel de estructura (fibrosis, pérdida del número de cardiomiocitos por apoptosis o necrosis y aumento del tamaño de los cardiomiocitos sobrevivientes), como de la función (disminución en el volumen expulsivo y en la fracción de eyección) (7). Como una consecuencia del aumento de rigidez en la aorta, el corazón, especialmente el ventrículo izquierdo, se ve expuesto a un estrés mecánico cada vez mayor debido a la necesidad de generar una presión que supere la resistencia de la aorta. Esta rigidez condiciona la aparición de hipertensión sistólica, hipertrofia ventricular izquierda e isquemia miocárdica ocasionada por el deterioro en el suministro de sangre en el miocardio, lo que conlleva al deterioro estructural y funcional antes mencionado (8). Hasta el momento se desconoce las consecuencias del envejecimiento en la capacidad de estiramiento propiamente de los cardiomiocitos.

Pese a la importancia del EM en la fisiología cardíaca se desconoce en su totalidad la identidad de los mecanosensores expresados en los cardiomiocitos y las vías fisiológicas y patológicas que los mismos regulan en dicho tejido.

Reportes previos de nuestro laboratorio describen a la policistina-1 (PC1) como un mecanosensor clave en la función cardíaca (9). Ratones deficientes para la expresión de dicha proteína en los cardiomiocitos (PC1 KO), presentan una disminución de la contractilidad del corazón, sin embargo, aún no está clara la causa de la misma. Hasta el momento, no ha sido estudiado el rol de la PC1 en la supervivencia de los cardiomiocitos, ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas.

Tipos de muerte celular y desarrollo de patologías cardíacas

Hasta el momento se acepta la idea de que los cardiomiocitos, al ser células terminalmente diferenciadas, no conservan la capacidad de dividirse. Debido a que el corazón es un órgano sometido a diferentes y continuos tipos de estrés, las vías de supervivencia en dichas células cobran suma importancia para mantener una función cardíaca adecuada. Así, la pérdida masiva de cardiomiocitos conlleva al remodelamiento cardíaco y frecuentemente a la disminución de su función (10). Debido a esto, la muerte de los cardiomiocitos constituye un punto clave en el desarrollo de diferentes enfermedades como las cardiomiopatías dilatadas, el infarto del miocardio y la hipertrofia cardíaca (10).

La necrosis y apoptosis constituyen dos de los principales tipos de muerte celular. Una tercera forma la constituye la autofagia. Estas tres se han descrito como involucradas en el desarrollo de diferentes enfermedades cardíacas (10) (11).

La necrosis se considera un tipo de muerte no programada, en el cual la membrana celular se daña liberando el material intracelular al medio externo, lo cual induce un aumento del daño y muerte de las células vecinas (11). Por otra parte, la apoptosis es un tipo de muerte celular programada en el cual, ya sea a través de una vía intrínseca o extrínseca, induce la activación de proteasas llamadas caspasas que llevan a la degradación de proteínas y material genético conduciendo a la muerte celular (11). Por último, la macroautofagia es un proceso celular basal que puede llevar a la supervivencia o muerte celular dependiendo del grado de activación de la misma (12). Se caracteriza por la formación de vacuolas autofágicas

que contienen material citoplasmático, el cual se degrada posteriormente en los lisosomas por la fusión de los mismos con las vacuolas autofágicas (12).

Diferentes patologías cardíacas cursan con muerte de los cardiomiocitos. Así, durante el infarto del miocardio, las células mueren principalmente por necrosis en el área de infarto, sin embargo, se encuentra descrita una muerte masiva por apoptosis en las áreas colindantes con la misma (13). Por otra parte, la apoptosis de los cardiomiocitos es observada frecuentemente durante la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión (estrés mecánico), lo que conlleva a una disminución en el grosor de la pared y dilatación (14). Se conoce menos sobre la muerte por autofagia en estas patologías y los datos son más controversiales.

Hasta el momento, las vías generales que inducen la muerte de los cardiomiocitos, como el aumento desmesurado de las especies reactivas de oxígeno o la sobrecarga del ión calcio (Ca^{2+}) en el citoplasma durante ciertos procesos patológicos como la IR son conocidas, sin embargo, se sabe menos sobre las vías río arriba que regulan a los mismos. En esta tesis estamos interesados en el estudio de la muerte de los cardiomiocitos regulada por la PC1, específicamente la mediada por necrosis y apoptosis.

Muerte celular inducida por apoptosis y la vía BCL-2 y BNIP3L/NIX

La apoptosis puede ser iniciada por la activación de cualquiera de dos vías: la extrínseca y/o la intrínseca. En los cardiomiocitos, al igual que en otras células, los estímulos apoptóticos pueden conducir a la activación de cualquiera o de ambas vías (15).

La vía extrínseca supone la activación de receptores de superficie y posteriormente y de manera secuencial, la activación de diferentes cisteína-proteasas llamadas caspasas. La vía intrínseca, por su parte, involucra a la mitocondria y el retículo endoplasmático y a la activación de una serie de proteínas englobadas dentro de la familia BCL-2, además de las caspasas efectoras (15).

La familia BCL-2 (gen de la leucemia/linfoma de células B) de proto-oncogenes juega un rol central en la regulación de la muerte celular programada mediante la supresión (BCL-2 o BCL-XL, por ejemplo) o la promoción (BAX, BAK, BCL-Xs, por ejemplo) de la apoptosis, siendo BCL-2 la proteína principal y más estudiada de esta familia (16).

Por su parte, otro sub-grupo de la familia de proteínas BCL-2, llamado “BNip” (BNip1, BNip2, BNip3, y BNip3L o NIX), cuyo nombre proviene del inglés “Proteínas de interacción 3 de adenovirus E1B 19 kDa y BCL-2”, se distingue funcionalmente por la inducción de la muerte celular (tanto apoptosis como necrosis), y estructuralmente por un dominio BH3 atípico, innecesario para efectos de promoción de la muerte (17).

Mientras que BNip1 y BNip2 se expresan en la envoltura nuclear, BNip3 y NIX se expresan en la mitocondria y el retículo sarcoplasmático. Específicamente a nivel cardíaco, BNip3 es inducido por hipoxia (vía HIF-1 α) y es un importante mediador de la muerte celular ante isquemia cardíaca (18, 19), mientras que NIX parece estar más asociado con señales de hipertrofia cardíaca, como la inducida por sobrecarga de presión y específicamente con las señales que involucran a la subunidad α de la proteína Gq y la proteína quinasa C, las cuales inducen un aumento de su expresión (14, 19, 20).

La sobrecarga de presión induce la apoptosis de las células del tejido cardíaco debido a la sobreexpresión de NIX (19), lo que contribuye a la transición de la hipertrofia concéntrica a cardiomiopatía dilatada (14). Esto ha sido corroborado además cuando se utiliza un estímulo patológico como la constricción aórtica transversa (TAC), donde se disminuye la luz de la aorta generando un modelo que induce la hipertrofia cardíaca por sobrecarga de presión (21). Por el contrario, la deficiencia de NIX protege de la muerte celular, fibrosis, del remodelamiento de la cardiomiopatía mediada por sobrecarga de presión y de la posterior falla cardíaca (14, 17, 22). En contraposición a todo esto, BCL-2 y BCL-XL protegen de dichos eventos (19).

La expresión genética es la principal vía de regulación de NIX (21) y a diferencia de otros tejidos, NIX se expresa en forma constitutiva en el corazón (23, 24,25). A nivel funcional, se ha demostrado que tanto BNip3 como NIX inducen la muerte celular, mediante la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP, por sus siglas en inglés), fundamental en la inducción de la apoptosis, en forma dependiente de BAX y BAK (26, 27), o directamente mediante el incremento del ingreso del Ca^{2+} mitocondrial (17). La apertura del MPTP es crucial para la liberación de citocromo-c y formación del apoptosoma que activa las caspasas efectoras y la apoptosis propiamente (11). La unión de BCL-2 a BNIP-3 o NIX cesa la actividad pro-apoptótica de las últimas (21).

Si bien la sobreexpresión de NIX en roedores adultos no incrementa la mortalidad hasta al menos la octava semana de vida, sí implica un aumento en la actividad apoptótica, lo que se traduce en una menor contractilidad ocasionada por la muerte de los cardiomiocitos y la progresión hacia la falla cardiaca (25).

Policistina como mecanosensor

Las policistinas son una familia de proteínas transmembrana cuyos integrantes más estudiados son la policistina-1 (PC1) y la policistina-2 (PC2). Se expresan en corazón, hígado, huesos y glándulas endocrinas, pero su función ha sido caracterizada principalmente en los cilios primarios de las células renales (28), dado que la mutación del gen *PKD1* o *PKD2*, quienes codifican para PC1 y PC2 respectivamente, son los causantes de la enfermedad poliquística renal autosómica dominante (29). Mientras que la PC2 es un canal de Ca^{2+} no específico, tanto de membrana como de retículo endoplasmático, PC1 es un mecanosensor capaz de regular la función de la PC2 o ejercer su función de mecanosensor en forma independiente de esta última (28).

La PC1 es una proteína de 450 kDa y posee un gran dominio N-terminal extracelular (~3000 aminoácidos), 11 dominios transmembrana (~1000 aminoácidos) y una pequeña cola C-terminal intracelular (~300 aminoácidos) que participa en la señalización intracelular (30).

A nivel de epitelio renal, la PC1 actúa como un mecanosensor del flujo de orina mediante su dominio N-terminal, activando, vía proteína G, canales de Ca^{2+} (31). También se encuentra reportado que la PC1 podría estar implicada en procesos de proliferación, adhesión y diferenciación celular; pero las vías de señalización para estos eventos no son claras (32).

Policistina-1 y su función en el tejido cardiaco

A nivel cardiaco, nuestro laboratorio reportó recientemente que la PC1 también es un mecanosensor en los cardiomiocitos, donde estaría involucrada en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por estrés mecánico *in vitro* (modelo de estrés hipo-osmótico), y por una sobrecarga de presión *in vivo* (TAC), (9). Así, ratones deficientes para la expresión de la PC1 en los cardiomiocitos (PC1 KO) sometidos a TAC no desarrollaron hipertrofia ni fibrosis del tejido cardiaco.

Por otra parte, los ratones PC1 KO (7-11 semanas de edad), presentaron una disminución de un 25 % de la fracción de acortamiento y un aumento del diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole medido por ecocardiografía (9) sin desarrollo de hipertrofia compensatoria en estado basal. A pesar de lo anterior, datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que estos ratones tienen una sobrevida disminuida con respecto a los controles (9 meses en promedio) y un desarrollo de cardiomiopatía dilatada en las fases finales de su vida (Anexo 1).

Hasta el momento, desconocemos las causas y vías a través de las cuales la PC1 regula la función cardiaca, así como las vías que finalmente llevan al desarrollo de la insuficiencia cardiaca.

Se ha descrito previamente que la muerte de los cardiomiocitos conlleva a una disminución de la función cardiaca contráctil (25) y que los mecanosensores pueden transducir señales tanto de sobrevida como de muerte celular (26). Este trabajo propone estudiar si la ausencia de la PC1 determina la inducción de la muerte de los cardiomiocitos

tanto en muestras provenientes del tejido cardiaco como de cardiomiocitos de rata neonata en cultivo.

Relación entre policistina-1 y BCL-2

La PC1 es capaz de inhibir la apoptosis a través de la regulación positiva de los niveles de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (33). Más aún, se ha encontrado que el C-terminal de la PC1 interactúa e inhibe a la subunidad $\alpha 12$ de la proteína Gq, impidiendo que al ser estimulada aumente la apoptosis mediante la degradación de BCL-2 y la estimulación de JNK (34). Lo anterior explicaría, al menos en parte, que la sobreexpresión de la PC1 en células renales en cultivo, las vuelva resistentes frente a un estímulo apoptótico (34). Sin embargo, desconocemos si la misma vía puede ser regulada en los cardiomiocitos.

Debido a lo expuesto anteriormente proponemos que la ausencia de la PC1 induce a la muerte del tejido cardiaco proveniente de ratones PC1 KO en condiciones basales y predispone a la muerte de los cardiomiocitos de rata neonata en cultivo sometidos a estrés mecánico, lo cual estaría asociado a una disminución de la relación BCL-2/NIX. Esto ocurriría debido, al menos en parte, a que la disminución de los niveles de PC1 conlleva a una disminución de los niveles de BCL-2, aumentando la muerte celular por apoptosis; el cual se vería exacerbado ante un estrés de tipo mecánico, dado que PC1 un mecanosensor.

HIPÓTESIS

La ausencia de la policistina-1 induce la muerte del tejido cardiaco en condiciones basales y predispone a la muerte de los cardiomiocitos en cultivo sometidos a estrés mecánico, asociado a una disminución de la relación BCL-2/NIX.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de la policistina-1 en la muerte del tejido cardiaco en condiciones basales y de los cardiomiocitos en cultivo posterior a estrés mecánico, asociados a cambios en la expresión de BCL-2 y NIX.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la muerte de los cardiomiocitos de ratas neonatas en cultivo sometidos a estrés mecánico.

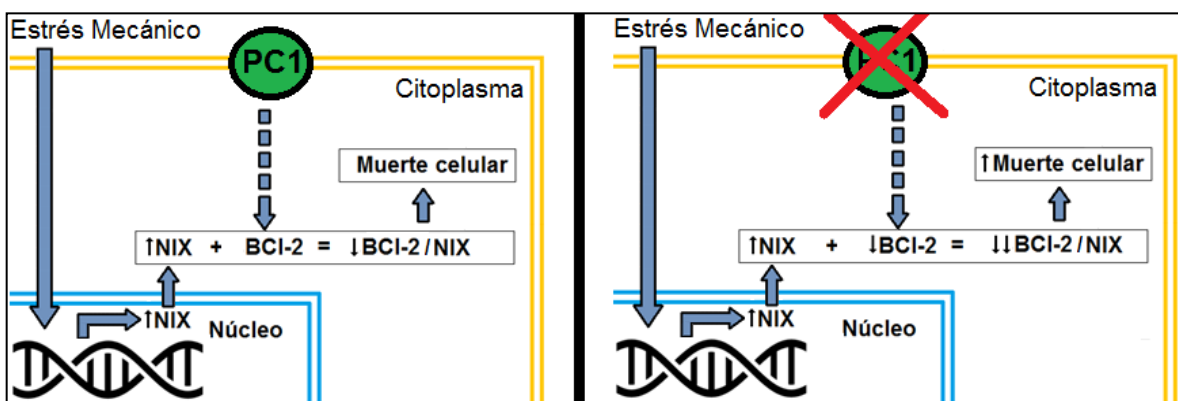
Este objetivo nos permitirá estudiar el papel de la PC1 en la muerte de los cardiomiocitos de rata neonata en cultivo. Utilizaremos como modelo de estrés el mecánico y se evaluó la apoptosis y necrosis de las células.

2. Determinar cambios en la relación BCL-2/NIX en cultivo de cardiomiocitos de rata neonata sometidos a estrés mecánico.

Este objetivo nos permitirá conocer si la ausencia de la PC1 en los cardiomiocitos en cultivo sometidos a estrés mecánico altera la relación BCL-2/NIX, lo cual podría estar asociado a cambios en la muerte de los cardiomiocitos.

3. Determinar los niveles de apoptosis y el contenido de BCL-2, NIX y Bax en los corazones provenientes de ratones *knockout* para la PC1.

Este estudio nos permitirá conocer el papel de la PC1 de los cardiomiocitos en el daño y la muerte del tejido cardiaco en condiciones basales. Utilizamos ratones PC1 KO y controles en dos estadios de la vida; jóvenes y seniles.



Esquema de la hipótesis. Tanto en condiciones basales como de estrés mecánico la policistina-1 (PC1) mantiene el contenido proteico de BCL-2 (anti-apoptótica) dentro de rangos fisiológicos, lo cual mantiene la relación BCL-2/NIX en niveles normales, disminuyendo la probabilidad de muerte del cardiomiocito. Por el contrario, en condiciones donde la PC1 se encuentra disminuida o ausente (derecha), los niveles de BCL-2 se encuentran disminuidos, con lo cual la relación BCL-2/NIX disminuye notoriamente, induciendo la muerte del cardiomiocito.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo animal y grupos de estudio

Se utilizaron ratones (C57BL/6) silenciados para la expresión del gen de la PC1 (*Pkd1*) específicamente en los cardiomiocitos, *knockout* para la PC1 (PC1 KO). De acuerdo con lo descrito previamente (9), los ratones PC1 KO se obtuvieron a través de la cruce entre ratones modificados genéticamente para portar un gen para la recombinasa Cre, cuya expresión es controlada por el promotor de la cadena pesada de la α -miosina (α MHC Cre), y ratones que poseen los alelos del gen de la PC1 flanqueados por sitios LoxP (PC1^{F/F}). Como controles se utilizaron tanto los ratones α MHC-Cre como los PC1^{F/F}.

Para los experimentos con cardiomiocitos en cultivo se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley, 1-3 días de edad, de ambos sexos.

Esta tesis utilizó los siguientes grupos de estudio:

- **Objetivo 1:** a) ratones controles y PC1 KO de 9-11 semanas de edad (jóvenes) y b) 7-11 meses de edad (seniles).
- **Objetivo 2 y 3:** cardiomiocitos controles y *knockdown* para la PC1 basales y sometidos a estrés mecánico.

La mantención y manipulación de estos animales se realizaron de acuerdo con las normas éticas establecidas para animales de experimentación “*Guide for the care and use of laboratory animals*” (National Institutes of Health, EEUU, 2011). Protocolo de bioética CBA #0907 FMUCH.

2. Cultivo de cardiomiocitos neonatos y transfecciones

El cultivo de cardiomiocitos neonatos se realizó de acuerdo con lo descrito previamente (9). Brevemente, las ratas neonatas se decapitaron y se procedió rápidamente a la extracción de los corazones y separación de los atrios de los ventrículos. Estos últimos fueron cortados y se realizaron digestiones sucesivas con pancreatina (Sigma-Aldrich) en concentración de 0,1

g/100 mL PBS 1X (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences). Las células obtenidas de dichas digestiones fueron extendidas en placas de plástico a 37 °C en un incubador de CO₂ (5 % CO₂, 95 % O₂) por 1 hora en presencia de medio de incubación (DMEM:M199 4:1; 10 % suero fetal bovino; 5 % suero equino). Posterior al tiempo indicado, el sobrenadante que contiene a los cardiomiocitos fue separado. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y se procedió a la siembra de los cardiomiocitos en placas de plástico previamente recubiertas con gelatina. Los cardiomiocitos se mantuvieron en medio de mantención: DMEM:M199 (4:1); suero fetal bovino 10 %, penicilina:estreptomicina (100 unidades/mL:100 µg/mL), bromodesoxiuridina 100 µmol/L.

Para disminuir la expresión de PC1 en los cardiomiocitos, los mismos fueron transfectados durante toda la noche con un siRNA de secuencia específica (siPC1, Sigma-Aldrich), a una concentración de 120 nM, de acuerdo con lo descrito previamente (9). Los experimentos que involucraron células *knockdown* para la PC1 se llevaron a cabo 16 horas post-transfección.

3. Obtención de corazones de ratones C57BL/6

Los ratones fueron expuestos a isofluorano USP al 0,1 % (1 mg/L; dosis correspondiente a la de eutanasia) en un recipiente de vidrio herméticamente sellado (Baxter Healthcare). Una vez evidenciados signos de sedo-analgésia profunda se realizó la apertura del tórax para extraer el corazón completo. Posteriormente los ventrículos fueron separados de los atrios. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido, trituradas en un mortero y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

4. Modelo de estrés mecánico

El estrés mecánico fue inducido de acuerdo con lo descrito previamente (9, 35). Brevemente, los cardiomiocitos fueron expuestos a una solución hiposmótica, (medio de mantención diluido 1:2) por 48 horas.

5. Medición de la actividad lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es liberada desde el citoplasma celular solo en casos de permeabilización de la membrana plasmática, un evento característico de la muerte por necrosis (36). Para cuantificar los niveles de necrosis de los cardiomiocitos en cultivo, el sobrenadante de las células en cultivo fue obtenido posterior a los estímulos realizados y las células que aún permanecieron en la placa de cultivo fueron lisadas (células vivas posterior al estímulo). Se midieron los niveles de LDH tanto en el sobrenadante como en las muestras provenientes del lisado celular. La suma de ambas mediciones se refiere como el LDH total de las células contenidas en la placa del experimento y el LDH del sobrenadante se expresa como el porcentaje del total y se refiere como el porcentaje de necrosis obtenido de la placa correspondiente. Es decir:

$$\frac{\text{LDH SN}}{\text{LDH SN} + \text{LDH LS}} = \% \text{ liberación de LDH al medio}^*$$

LDH SN: LDH Sobrenadante
LDH LS: LDH Lisado Celular

*Considerando LDH 100% = LDH SN + LDH LS

Para la medida del LDH se utilizó el kit CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), según indicaciones del fabricante.

6. Western blot

6.1 Preparación de homogeneizados

Los cardiomiocitos en cultivo o las muestras de corazones de ratón (jóvenes y seniles), se homogeneizaron en presencia de un tampón de lisis comercial (T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific), conteniendo inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets EASY packs, Roche) y fosfatasa (PhosSTOP-Phosphatase inhibitor cocktail tablets, Roche). Los lisados fueron centrifugados a 10.000 x g a 4 °C y los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados a -80 °C hasta su uso posterior.

6.2 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de los cardiomiocitos en cultivo o las muestras de corazones de ratón (jóvenes y seniles) fueron determinadas por el método de Bradford,

utilizando el reactivo Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.3 Detección de proteínas

Las proteínas obtenidas previamente fueron separadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas a una membrana de soporte de PVDF (Difluoruro de polivinilideno, Immobilon[®]-P_{sq}, Merck), y expuestas a anticuerpos específicos para caspasa-3, NIX, BCL-2 y Bax (Santa Cruz Biotechnology). Luego, fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano y la señal se recogió a través del equipo Chemidoc™ XRS System (Bio-Rad). La cuantificación de los niveles de GAPDH fueron utilizados como control de carga. La cuantificación de todas estas proteínas fue realizada a través del programa Image Lab y los resultados han sido expresados como la razón entre la proteína estudiada y el GAPDH.

7. Aislamiento y cuantificación del RNA mensajero por RT-PCR cuantitativa

Los RNA mensajeros de las muestras de ventrículo cardiaco de ratones controles y PC1 KO (jóvenes y seniles) fueron aislados. Brevemente, las muestras fueron lisadas con trizol (Purezol, Bio-Rad) y posterior a la incubación en presencia de cloroformo (Merck), la fase acuosa fue obtenida. El RNA fue precipitado con isopropanol al 75 % (Merck) a -80 °C por 1 hora y posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. El pellet obtenido fue diluido 10 veces con H₂O libre de DNAsas y RNAsas (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), a una concentración final de 1,5 ng/μL. La obtención de los cDNA fue realizada por transcripción reversa utilizando el iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación de los diferentes genes a estudiar una PCR en tiempo real fue realizada (QRT-PCR) utilizando el reactivo Brilliant III SYBR[®] MM (Agilent Technologies) y partidores específicos (Tabla 1). El método del Δ Ct fue utilizado para el cálculo de la

abundancia del transcrito. Los datos fueron corregidos por los niveles del 18S rRNA respectivo de cada muestra.

8. Citometría de Flujo

Para evaluar apoptosis mediante citometría de flujo, el sobrenadante del cultivo celular para cada condición fue recolectado (este medio contenía células que se habían despegado durante el experimento). Las células adheridas fueron lavadas con 200 μ L de PBS 1X (Hyclone) y luego fueron expuestas a tripsina (34). La suspensión de células obtenidas posteriormente, junto con el sobrenadante antes obtenido se mezclaron y centrifugaron a 250 x g por 5 minutos. El pellet obtenido fue re-suspendido en un tampón de unión el cual contenía Anexina-V-FITC 1 μ L/mL (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Abcam) durante 15 minutos en oscuridad, de acuerdo con lo indicado por el fabricante. Posteriormente, las células fueron nuevamente suspendidas en un tampón de unión que contenía yoduro de propidio (IP) 1 μ L/mL contenido en el mismo Kit. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSCantoA (BD Biosciences). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa CYFLOGIC; los histogramas obtenidos se dividieron en cuatro cuadrantes: en el cuadrante inferior izquierdo aparecieron las células viables, en el inferior derecho aparecieron las células en apoptosis temprana, en el superior derecho necroptosis y en el superior izquierdo necrosis.

9. Reactivos

DMEM, M199, suero fetal bovino, suero equino y solución de penicilina:estreptomina fueron provistos por Hyclone, GE Healthcare Life Sciences. Bromodesoxiuridina fue obtenido de Sigma-Aldrich.

10. Análisis estadístico y cálculo del tamaño de muestras

Para la detección de cambios entre los grupos de estudio, de por lo menos un 20 %, con un $\alpha= 0,05$ y un poder del 90 %, se necesitaron un mínimo de 6 experimentos independientes para cada grupo a analizar por tipo de experimentos, ya sea para los experimentos de western blot o de QRT-PCR. El análisis estadístico se realizó a través de un t-Test no pareado

para comparar dos grupos experimentales o un test de ANOVA de una vía, seguido del post-test de Tukey para la comparación de más de 2 grupos experimentales. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando se presente un $P < 0,05$.

Tabla 1.- Partidores utilizados para qRT-PCR (ratón)		
Gen	Secuencia <i>Forward</i>	Secuencia <i>Reverse</i>
NIX	AAGAGGCAGTTCGCACTGTGACA	TCTACAATTCTTCTTCTGACTGAGAGCTG
BCL2	TGAGTACCTGAACCGGCATCT	TTCAGAGACAGCCAGGAGAAA
Bax	CTGGATCCAAGACCAGGGTG	GTGAGGACTCCAGCCACAAA
18S	CGGACAGGATTGACAGATTG	CAAATCGCTCCACCAACTAA

RESULTADOS

La expresión deciente de la Policistina-1 (PC1) aumenta la muerte de los cardiomiocitos de ratas neonatas sometidas a estrés mecánico *in vitro*

La necrosis y la apoptosis son los dos tipos de muerte celular más ampliamente descritos y estudiados. Para determinar el papel de la PC1 en la muerte de los cardiomiocitos neonatos en cultivo, controles y deficientes para la expresión de la PC1 (siPC1), fueron expuestos a un medio hiposmótico (HS) por 48 horas como modelo de estrés mecánico. Nuestros resultados indican que la deficiencia de la PC1 induce un aumento de la necrosis de los cardiomiocitos cuando los mismos son sometidos a un estrés hiposmótico, mientras que la sola deficiencia de esta proteína parecería no aumentarla (Figura 1). Estos resultados en su conjunto sugieren que la presencia de la PC1 en los cardiomiocitos los protegería de la necrosis inducida por estrés mecánico.

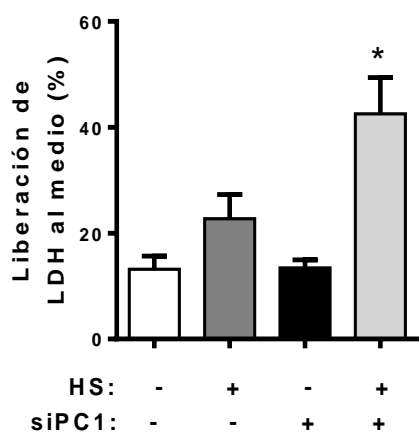


Figura 1.- Cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo. Cardiomiocitos controles o disminuidos en la expresión para la PC1 con un siRNA específico (siPC1) fueron expuestos a estrés hiposmótico (HS) por 48 horas. Los valores se muestran como promedios \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido por un post-test de Tukey (n=9). * $P < 0,05$ vs. C, HS y siPC1.

Para determinar el grado de apoptosis que presentaban estos cardiomiocitos, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo posterior a los estímulos. Si bien nuestros datos no son significativos, muestran una clara tendencia que sugiere que la sola disminución de la expresión de la PC1 en los cardiomiocitos induce su muerte de los mismo vía apoptosis, al contrario de lo observado con la necrosis, donde las células siPC1 no presentan diferencias

con respecto al control. Una vez estimuladas con HS, las células siPC1 no presentaban diferencias respecto a las que provenían de condiciones basales (Figura 2).

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que la PC1 tiene un efecto protector ante la muerte de los cardiomiocitos. Frente al estrés hiposmótico en el caso de la necrosis y al parecer incluso en condiciones basales frente a la apoptosis, describiendo a la PC1 como un nuevo regulador de muerte de los cardiomiocitos.

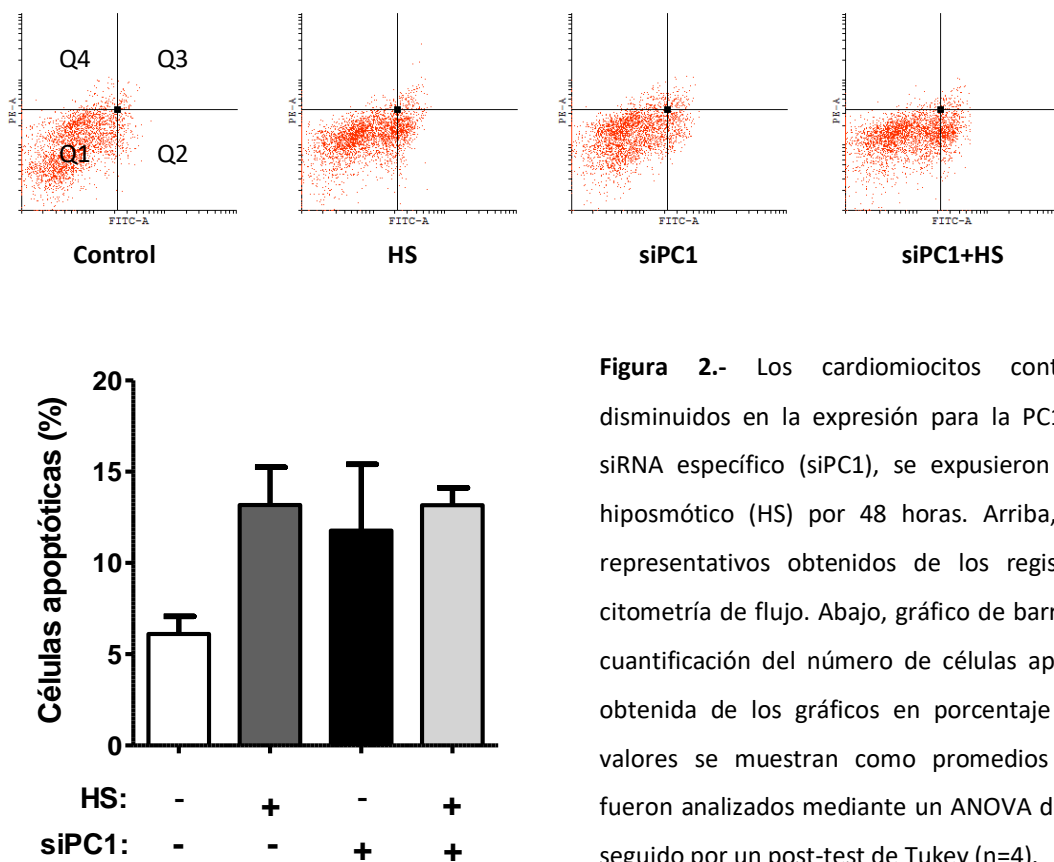


Figura 2.- Los cardiomiocitos controles o disminuidos en la expresión para la PC1 con un siRNA específico (siPC1), se expusieron a estrés hiposmótico (HS) por 48 horas. Arriba, gráficos representativos obtenidos de los registros por citometría de flujo. Abajo, gráfico de barras con la cuantificación del número de células apoptóticas obtenida de los gráficos en porcentaje (%). Los valores se muestran como promedios \pm SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido por un post-test de Tukey (n=4).

La deficiencia de la PC1 en los cardiomiocitos en cultivo se relaciona con un aumento de NIX y una reducción de BCL-2 y Bax posterior al estrés mecánico.

Para analizar si las proteínas involucradas en las vías apoptóticas; NIX, BCL-2 y BAX están alteradas al reducir la expresión de la PC1, cardiomiocitos en cultivo, controles y siPC1, fueron expuestos a HS, y se analizó el contenido de dichas proteínas.

Nuestros datos indican que las células deficientes en PC1 presentan un aumento de la proteína pro-apoptótica NIX cuando son expuestas al HS (Figura 3A), sin embargo, el contenido proteico de Bax (pro-apoptótica) y BCL-2 (anti-apoptótica), presentan una disminución (Figura 3B y 3C, respectivamente). Por otro lado, mientras el contenido de Bax disminuye por la sola exposición de las células al HS, sugiriendo que la PC1 podría no estaría implicada en dicha disminución, las células siPC1 en estado basal presentan una disminución en los niveles de BCL-2, sugiriendo que la presencia de la PC1 es necesaria para mantener los niveles de esta proteína. Nuestros datos indican además que la relación BCL-2/NIX disminuye en todas las condiciones estudiadas con respecto al control (Figura 3D), en tanto la relación BCL-2/Bax no presentó variaciones estadísticamente significativas (Figura 3E).

Estos datos, en su conjunto, sugieren que la disminución proteica de la PC1 frente al estrés mecánico podría inducir los niveles de NIX y la disminución de BCL-2, más aún, la deficiencia de PC1 induciría por sí sola la disminución de BCL-2, lo que podría relacionarse con el aumento en la apoptosis como quedó demostrado por el experimento antes descrito (34).

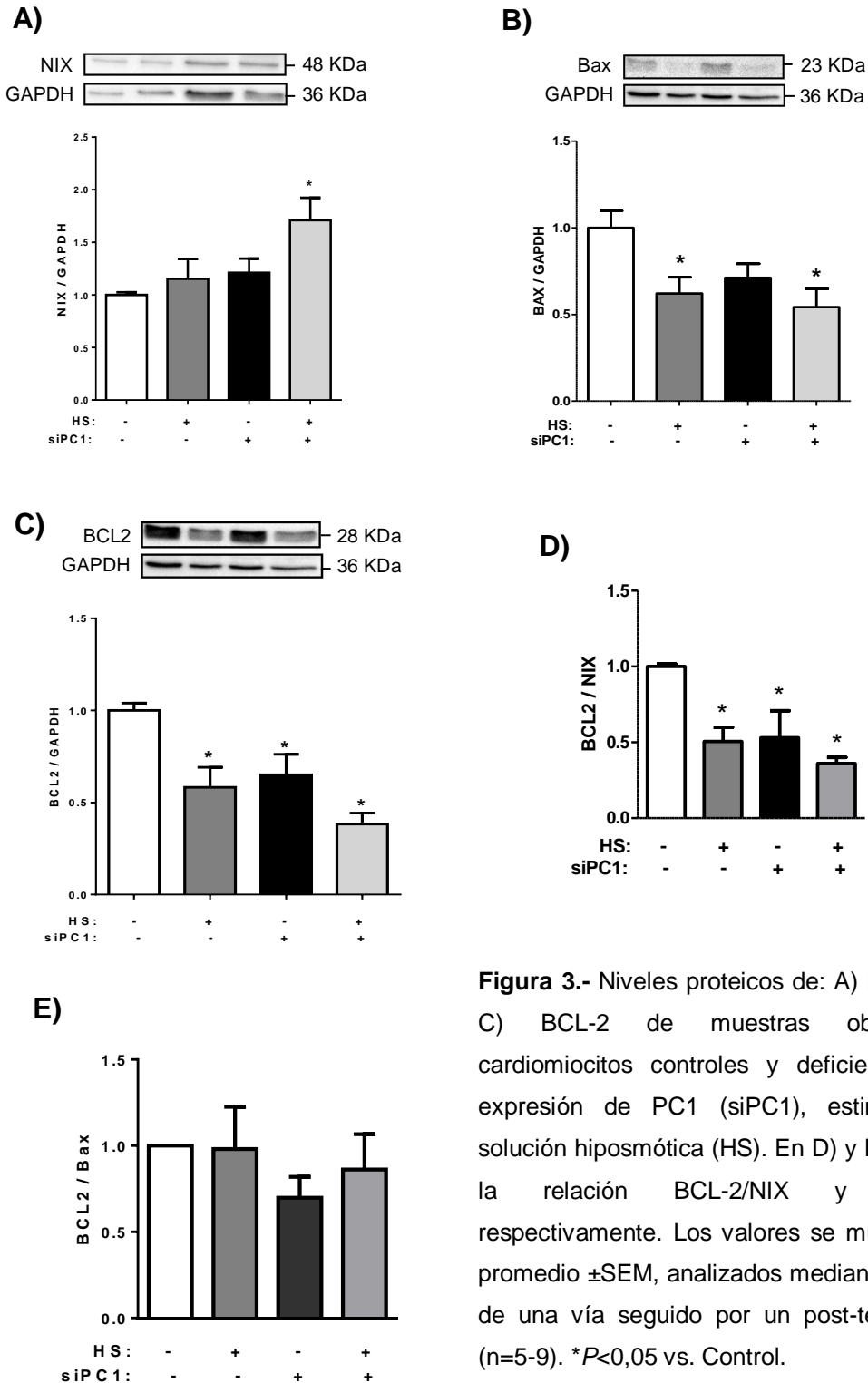


Figura 3.- Niveles proteicos de: A) NIX, B) Bax y C) BCL-2 de muestras obtenidas de cardiomiocitos controles y deficientes para la expresión de PC1 (siPC1), estimuladas con solución hiposmótica (HS). En D) y E) se muestra la relación BCL-2/NIX y BCL-2/Bax, respectivamente. Los valores se muestran como promedio \pm SEM, analizados mediante un ANOVA de una vía seguido por un post-test de Tukey (n=5-9). * P <0,05 vs. Control.

Para determinar si las variaciones observadas en los niveles proteicos de NIX y BCL-2 se debían a diferencias en el contenido del mRNA de estas proteínas, se cuantificaron los mRNA respectivos por QRT-PCR. Como se observa en las figuras 4A y 4B, con la cantidad de experimentos realizados no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones estudiadas. De acuerdo con lo anterior, el conjunto de los resultados obtenidos sugiere que el aumento proteico de NIX (en condiciones de cardiomiocitos siPC1 sometidos a HS) y la disminución de BCL-2 (cardiomiocitos siPC1) se deberían a cambios a nivel proteico más que de expresión del gen.

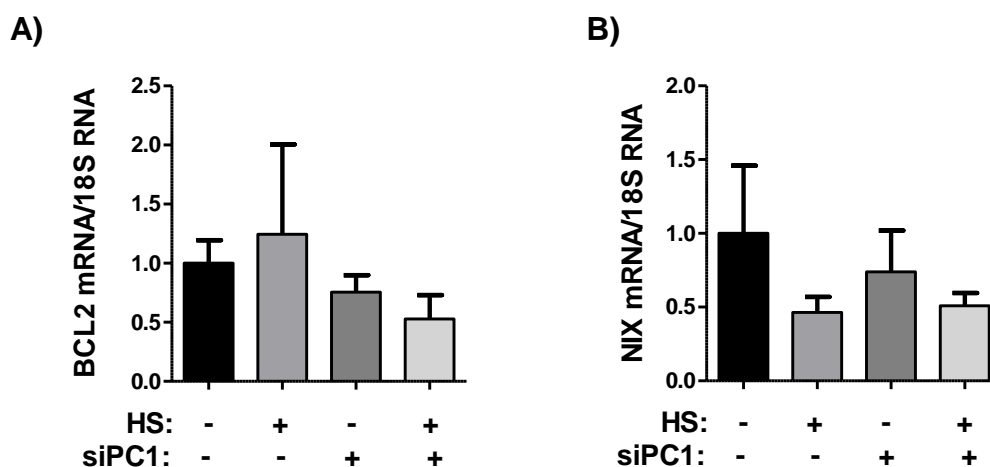


Figura 4.- Cuantificación del contenido de mRNA de BCL-2 (A), y NIX (B), desde muestras de cardiomiocitos controles o disminuidos en la expresión para la PC1 con un siRNA específico, expuestos a estrés hiposmótico (HS) por 48 horas. Los datos se presentan como promedios \pm SEM, n=2-4.

El tejido cardiaco de ratones *knockout* para la PC1 presenta cambios en los niveles de las proteínas implicadas en la vía apoptótica.

Tanto la función cardiaca como la supervivencia de los ratones *knockout* para la PC1 en los cardiomiocitos (PC1 KO), se encuentra disminuida con respecto a los controles respectivos (9) (Anexo 1), sin embargo, desconocemos si la ausencia de la PC1 determina un aumento de la muerte de los cardiomiocitos, lo cual podría explicar, aunque sea en parte, la disminución de

la función cardíaca y la sobrevida observada. Para analizar si las vías implicadas en la apoptosis se encuentran alteradas en el tejido cardíaco en ausencia de la PC1, analizamos el contenido proteico de NIX, Bax y BCL2, tanto en ratones PC1 KO jóvenes (9-11 semanas) como en los seniles (8 meses en promedio, con síntomas de insuficiencia cardíaca).

Los resultados obtenidos indican que el contenido proteico de NIX en el tejido cardíaco de los ratones PC1 KO de los jóvenes no varía (Figura 5A), en tanto presentan un aumento significativo en las muestras provenientes de ratones seniles (Figura 5B). Por otro lado, los niveles de Bax se encuentran aumentados tanto en las muestras provenientes de tejidos de ratones jóvenes como seniles (Figura 5C y 5D, respectivamente). En cuanto a la proteína anti-apoptótica BCL-2, sus niveles no se ven alterados ya sea en muestras de ratones jóvenes (Figura 5E) como seniles (Figura 5F).

En cuanto a las relaciones de las proteínas pro-apoptóticas (NIX y Bax) y la anti-apoptótica, BCL2, las muestras provenientes del tejido cardíaco de ratones jóvenes PC1 KO no muestran diferencias con respecto al control en la relación BCL-2/NIX (Figura 5G), pero presentan una disminución en la relación BCL-2/Bax (Figura 5I). Por otro lado, los ratones seniles presentan una disminución en la relación BCL-2/NIX (Figura 5H) y BCL-2/Bax (Figura 5J).

Estos resultados en su conjunto sugieren que la ausencia de la PC1 en los cardiomiocitos podría inducir la apoptosis en el tejido cardíaco obtenido, debido al aumento de la proteína pro-apoptótica Bax, llevando a una relación BCL2/Bax disminuida. El aumento de NIX en los animales seniles podría deberse tanto a la causa como a la consecuencia de la insuficiencia cardíaca que presentan estos ratones.

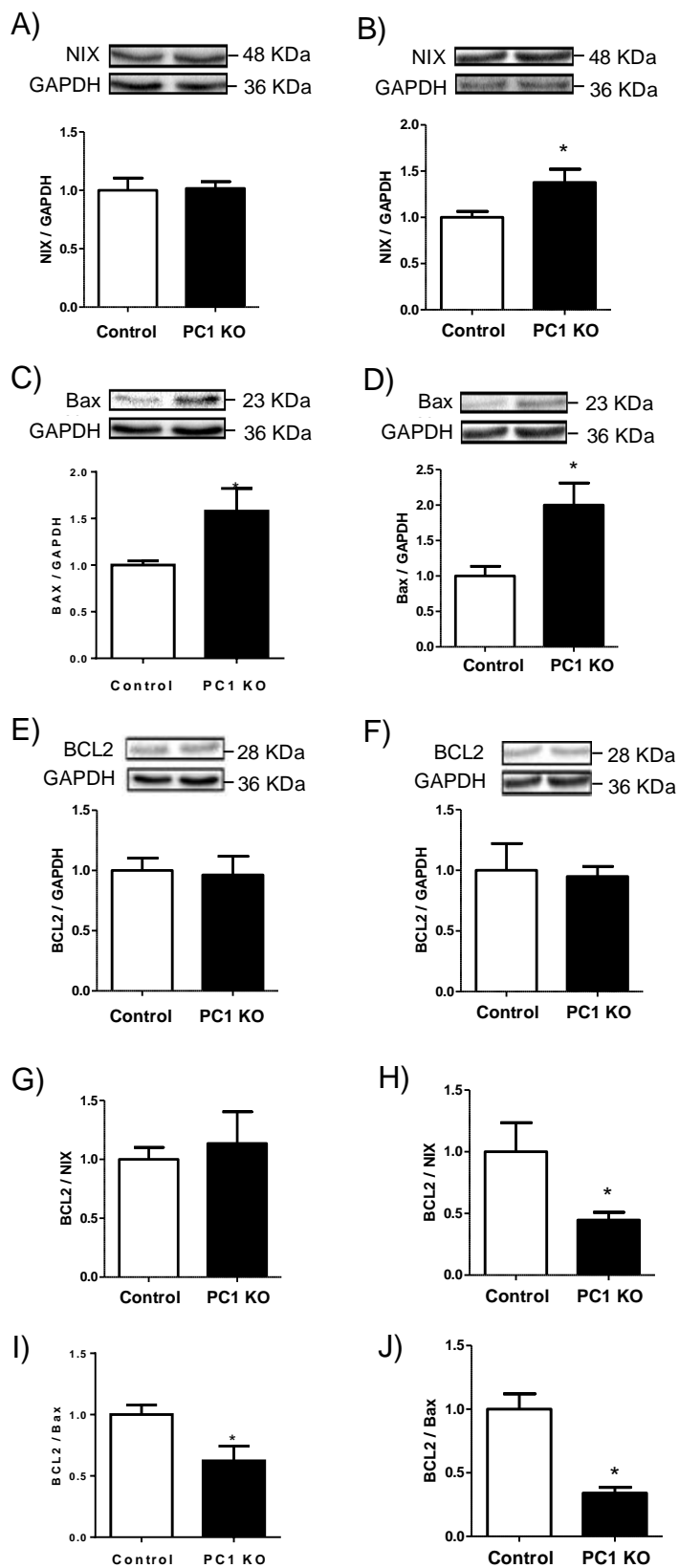


Figura 5.- A la izquierda (jóvenes) y derecha (seniles), se observan los western blots representativos y gráficos de barras que representan los niveles proteicos de NIX (A y B), Bax (C y D) y BCL-2 (E y F) desde muestras de tejidos cardiacos obtenidos de ratones controles y PC1 KO. En los gráficos G) y H) se observa la relación BCL-2/NIX y en I) y J) la relación BCL-2/Bax. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un t-test no pareado, y se presentan como promedios \pm SEM. Jóvenes: NIX y BCL-2 n=7, BAX n=5. Seniles n=7. * $P < 0,05$ vs. Control.

La ausencia de la PC1 en el tejido cardiaco de ratones jóvenes se acompaña de la disminución del mRNA de NIX y Bax y aumento del mRNA de BCL-2 en los tejidos cardiacos de ratones seniles.

Para determinar si los cambios observados en el contenido de las proteínas de las vías apoptóticas estudiadas se relacionan con cambios en el contenido de mRNA, los mismos se analizaron a través de QRT-PCR.

Los resultados obtenidos indican que tanto el contenido de mRNA de NIX como Bax (pro-apoptóticos) se encuentran disminuidos en el tejido cardiaco obtenido de animales jóvenes (Figura 6A y 6C respectivamente), mientras no muestran diferencias significativas respecto al control en los animales seniles (Figura 6B y 6D, respectivamente). Por el contrario, el mRNA de BCL-2 no muestra diferencia con respecto al control en el tejido obtenido de animales jóvenes (Figura 6E), pero muestra un aumento significativo en las muestras obtenidas de animales seniles (Figura 6F).

Si bien estos resultados indican cambios en los niveles del contenido de mRNA de estos genes, los mismos podrían explicarse, al menos en parte, por un mecanismo de compensación ante los cambios del contenido de sus respectivas proteínas, especialmente si se tiene en cuenta que los datos fueron obtenidos desde el tejido cardiaco de animales constitutivos para la modificación genética del gen de la policistina-1.

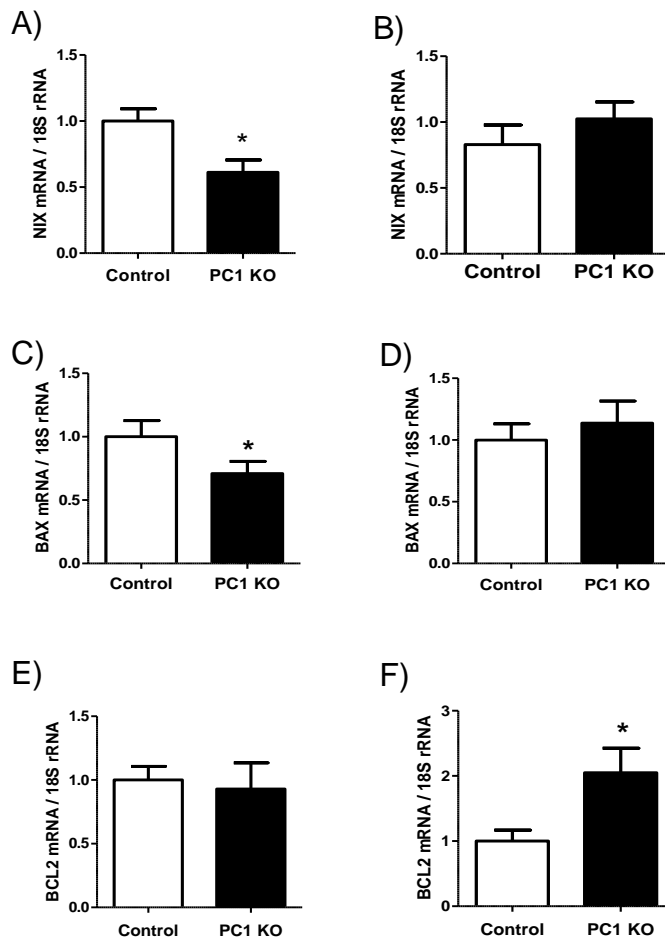


Figura 6.- A la izquierda (jóvenes) y derecha (seniles), se observan gráficos de barras de las cuantificaciones del contenido de mRNA de: NIX (A y B), Bax (C y D) y BCL2 (E y F) desde muestras de tejidos cardiacos obtenidos de ratones controles y PC1 KO. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un t-test no pareado, y se presentan como promedios ± SEM. n=6-8. *P<0,05 vs. Control.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el papel de la proteína policistina-1 (PC1) en los cardiomiocitos como regulador positivo de la supervivencia celular. Se esperaba que la deficiente expresión de esta proteína, un mecanosensor de membrana, induciría la muerte de los cardiomiocitos y explicaría, al menos en parte, la disminución de la función cardíaca que se observa en los animales *knockout* para la misma (9).

El corazón se encuentra sometido a un estrés mecánico constante, el cual se incrementa en la insuficiencia cardíaca (6). Los ratones deficientes para la expresión de la PC1 (PC1 KO) presentan una contractilidad cardíaca disminuida medida por ecocardiografía entre las 7-11 semanas de vida (9). Más aún, datos no publicados de nuestro laboratorio indican que estos ratones progresan hacia una insuficiencia cardíaca (Anexo 1), con aumento de frecuencia respiratoria, disminución de la actividad física y muerte aproximadamente a los 8 meses de edad. Sin embargo y hasta el momento se desconocen los mecanismos a través de los cuales la PC1 mantiene la función cardíaca evitando la progresión hacia una insuficiencia cardíaca en estos ratones. En este trabajo se propuso estudiar el papel de la PC1 en la muerte de los cardiomiocitos, en especial la ligada a la apoptosis.

Debido a que la PC1 es un mecanosensor, se estudió su papel en la muerte de los cardiomiocitos tanto a nivel basal como en cardiomiocitos sometidos a estrés hiposmótico. El modelo del estrés hiposmótico (HS), induce el incremento en el diámetro celular debido al ingreso de agua hacia el intracelular por osmosis, lo cual induce el estiramiento de la membrana celular y simula un estrés mecánico (35). En condiciones patológicas, el caso de estrés mecánico descrito debido a cambios en la osmolaridad sería el primer periodo de la reperfusión, donde ocurre una alteración en el funcionamiento de la bomba Na^+/H^+ , favoreciendo la entrada de sodio hacia la célula y arrastrando agua consigo (4). Pese a lo anterior, es un modelo de estiramiento mecánico fácilmente reproducible, ampliamente descrito y utilizado, incluso por nuestro laboratorio anteriormente, lo cual nos permite comparar los resultados obtenidos en este proyecto con los de la literatura (9, 35, 37, 38, 39).

Nuestros datos de LDH sugieren que la deficiente expresión de la PC1 (siPC1) induce un aumento de la muerte de los cardiomiocitos en cultivo, vía necrosis, cuando éstas son expuestas a HS. Por otro lado, y si bien los datos no son significativos, la tendencia de nuestros resultados sugiere que la PC1 también estaría protegiendo a las células de la muerte inducida por apoptosis, ya que cardiomiocitos deficientes para la PC1 muestran una tendencia al aumento de la apoptosis medida por citometría de flujo. Estos datos estarían en concordancia con reportes previos donde se indica a la PC1 como un protector de ante la muerte inducida por isquemia/reperfusión inducida en tejido renal (40).

Por otra parte, nuestros resultados indican un incremento del contenido proteico de NIX en células siPC1 sometidas a HS y una disminución de la proteína anti-apoptótica BCL-2 incluso en condiciones basales. Los cambios en el contenido de estas proteínas parecerían ser a nivel proteico ya que no se observaron variaciones en la abundancia de los mRNA respectivos. Trabajos previos realizados en células renales reportan que la ausencia de la PC1 induciría la degradación de la proteína BCL-2 y por tanto se induciría la apoptosis en estas condiciones (34). Nuestros datos no sólo se encuentran en congruencia con estos trabajos, sino que además demuestran por primera vez que la PC1 regula el contenido proteico de BCL-2 en los cardiomiocitos, además de regular los niveles de NIX. Así, nuestros datos sugieren que la PC1 es una proteína capaz de regular la apoptosis en los cardiomiocitos.

Por otro lado, las muestras de tejido cardiaco provenientes de animales PC1 KO jóvenes sugieren la activación de las vías apoptóticas por aumento de la proteína Bax. Se encuentra reportado la importancia de esta proteína en el inicio de la apoptosis por vía intrínseca (13), por tanto, nuestros datos sugieren la presencia de apoptosis celular en estas muestras en ausencia de la PC1 de los cardiomiocitos. Debido que la insuficiencia cardiaca transcurre con un aumento de la vía apoptótica, nuestras observaciones resultan concordantes con este hecho, dado que demostramos un aumento de los niveles de Bax y NIX en las muestras provenientes de los animales PC1 KO, quienes presentan síntomas y signos de esta patología.

El contenido de BCL2 en las muestras de tejidos de ratones PC1 KO no muestran diferencias respecto a los controles, resultado que también observamos en cardiomiocitos en cultivo. Esta aparente discrepancia podría deberse a que los ratones utilizados son constitutivamente *knockout* para la PC1 y por tanto pueden generar mecanismos compensatorios en la expresión proteica.

El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo sugiere que PC1 cumple un rol en la regulación de la muerte en los cardiomiocitos, el cual consistiría, al menos en parte, en favorecer la presencia de niveles fisiológicos de proteínas contra-regulatorias durante el proceso de muerte celular. Se requiere de futuros experimentos para describir toda la vía implicada, tanto en apoptosis como en necrosis, dependiente de la ausencia de PC1, y de las vías de señalización involucradas.

BIBLIOGRAFÍA

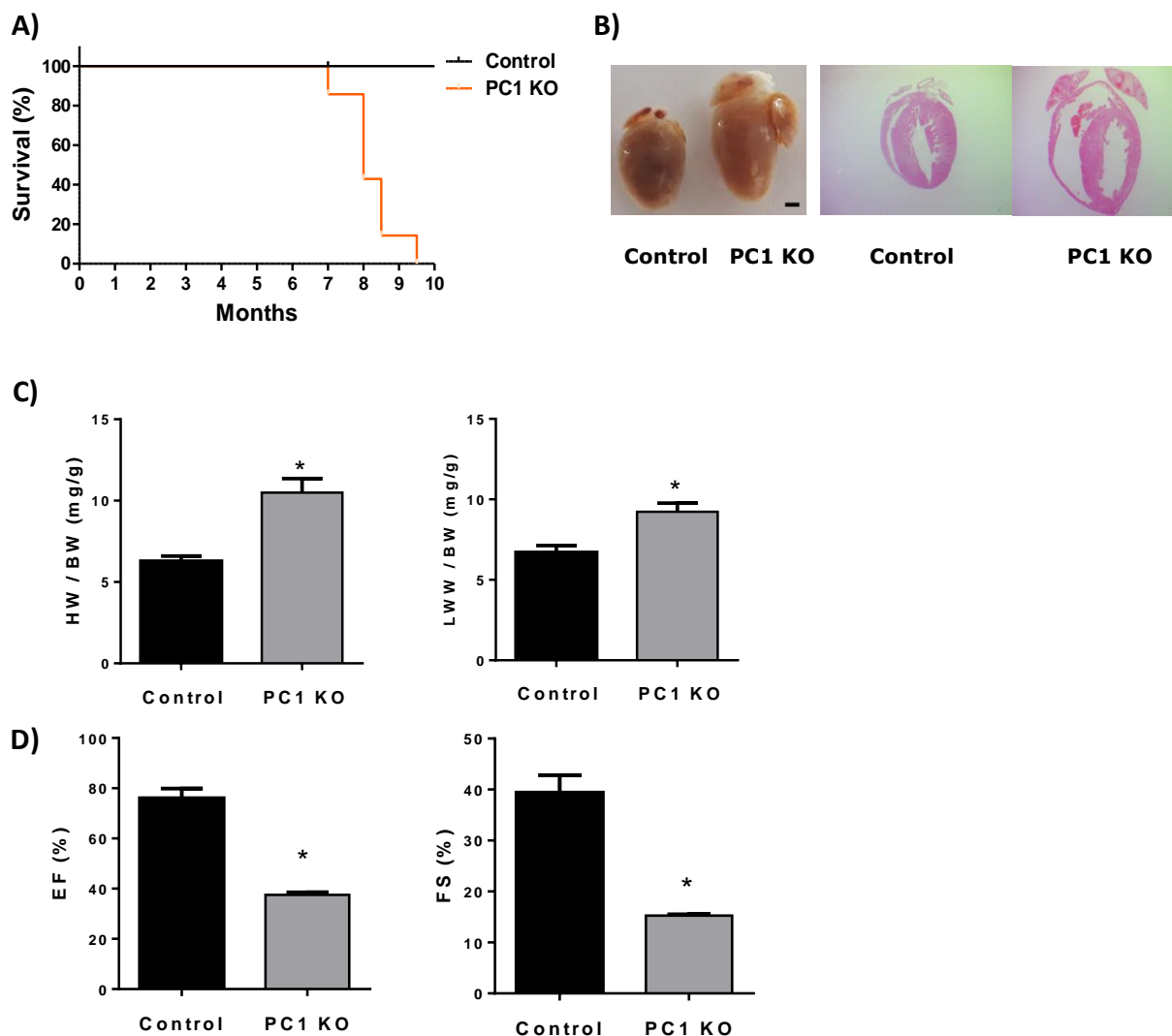
1. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R (2013). Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 14: 529–541.
2. Shyu KG (2009). Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes. *Clin Sci*, 116: 377–389.
3. Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, Baban B (2013). Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis*, 3: 180–196.
4. Ruiz-Meana M, García-Dorado D (2009). Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*, 62: 199–209.
5. Hao J, Kim HS, Choi W, Ha TS, Ahn HY, Kim CH (2010). Mechanical Stretch-Induced Protection against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Involves AMP-Activated Protein Kinase. *Korean J Physiol Pharmacol*, 14: 1–9.
6. Kehat I, Molkentin J (2010). Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiologic stimulation. *Circulation*, 122: 2727-2735.
7. Kwak H (2013). Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *J Exerc Rehabil*, 9: 338-347.
8. Kim S, Bae J, O'Rourke M (2015). Vasculopathy of Aging and the Revised Cardiovascular Continuum. *Pulse*, 3: 141-147.
9. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernández C, Jiang N, Luo X, Somlo S, Rothermel B, Gillete T, Lavandero S, Hill JA (2015). Polycystin-1 is a cardiomyocyte mechanosensor that governs L-type Ca^{2+} channel protein stability. *Circulation*, 131: 2131–2142.
10. Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibacache M, Criollo A, Namchenko A, Hill JA, Lavandero S (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease*, 2 (12): e244.
11. Whelan R, Kaplinskiy V, Kitsis R (2010). Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annu. Rev. Physiol*, 72: 19-44.

12. Lavandero S, Troncoso R, Rothermel B, Martinet W, Sadoshima J, Hill JA (2013). Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy*, 9(10): 1455-1466.
13. Krijnen PAJ, Nijmeijer R, Meijer, CJLM., Visser, CA., Hack, CE., Niessen, HWM. (2002). Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol*, 55, 801–811.
14. Diwan A, Wansapura J, Syed FM, Matkovich SJ, Lorenz JN, Dorn GW (2008). Nix-mediated Apoptosis Links Myocardial Fibrosis, Cardiac Remodeling, and Hypertrophy Decompensation. *Circulation*, 117: 396–404.
15. Movassagh M, Foo RSY (2007). Simplified apoptotic cascades. *Heart Failure Rev*, 13: 111–119.
16. An J, Lv J, Li A, Qiao J, Fang L, Li Z, Li B, Zhao W, Chen H, Wang L (2015). Constitutive expression of Bcl-2 induces epithelial-Mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *BMC Cancer*, 15: 476.
17. Chen Y, Lewis W, Diwan A, Cheng EHY, Matkovich SJ, Dorn GW (2010). Dual autonomous mitochondrial cell death pathways are activated by Nix/BNip3L and induce cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 9035-9042.
18. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA (2002). Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 12825-12830.
19. Zhang J, Ney PA (2009). Role of bnip3 and nix in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ*, 16: 939–946.
20. Yussman MG, Toyokawa T, Odley A, Lynch RA, Wu G, Colbert MC, Aronow BJ, Lorenz JN, Dorn GW II (2002). Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat Med*, 8: 725–730.
21. Dorn GW II (2011). Nix Nought Nothing: Fairy Tale or Real Deal. *J Mol Cell Cardiol*, 51: 497-500.
22. Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD, Greenberg H (2000). The *C. elegans* orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3- and caspase-independent mechanism. *Oncogene*, 19: 5453-5463.

23. Galvez AS, Brunskill EW, Marreez Y, Benner BJ, Regula KM, Kirshenbaum LA, Dorn GW II (2006). Distinct Pathways Regulate Proapoptotic Nix and BNIP3 in Cardiac Stress. *J Biol Chem*, 281: 1442-1448.
24. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB (2008). BNIP3 subfamily BH3-only proteins - mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*, 27: 114-127.
25. Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, Kundu M, Opferman JT, Cleveland JL, Miller JL, Ney PA (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 19500-19505.
26. Dlamini Z, Tshidino SC, Hull R (2015). Abnormalities in alternative splicing of apoptotic genes and cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci*, 16: 27171-27190.
27. Liu W, Xie CC, Zhu Y, Li T, Sun J, Cheng Y, Ewing CM, Dalrymple S, Turner AR, Sun J, Isaacs JT, Chang BL, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J (2008). Homozygous Deletions and Recurrent Amplifications Implicate New Genes Involved in Prostate Cancer. *Neoplasia*, 10: 897-907.
28. Chapin HC, Caplan MJ (2010). The cell biology of polycystic kidney disease. *J Cell Biol*, 191: 701-710.
29. Mekahli D, Sammels E, Luyten T, Welkenhuyzen K, van den Heuvel LP, Levtchenko EN, Gijbbers R, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L (2012). Polycystin-1 and polycystin-2 are both required to amplify inositol-trisphosphate-induced Ca^{2+} release. *Cell Calcium*, 51: 452-458.
30. Paul BM, van den Heuvel GB (2014). Kidney – Polycystic Kidney Disease. *WIREs Dev Biol*, 3: 465-487.
31. Retailleau K, Duprat F (2014). Polycystins and partners: proposed role in mechanosensitivity. *J Physiol*, 592: 2453-2471.
32. Dalagiorgou G, Basdra EF, Papavassiliou AG (2010). Polycystin-1: Function as a mechanosensor. *J Biochem Cell Biol*, 42: 1610-1613.
33. Yu W, Ritchie BJ, Su X, Zhou J, Meigs TE, Denker BM (2011). Identification of polycystin-1 and $G\alpha_{12}$ binding regions necessary for regulation of apoptosis. *Cell Signal*, 23: 213-221.

34. Yu W, Kong T, Beaudry S, Tran M, Negoro H, Yamadala V, Denker BM (2010). Polycystin-1 protein level determines activity of the G α 12/JNK apoptosis pathway. *J Biol Chem*, 285: 10243–10251.
35. Tang W, Strachan RT, Lefkowitz RJ, Rockman HA (2014). Allosteric modulation of beta-arrestin-biased angiotensin II type 1 receptor signaling by membrane stretch. *J Biol Chem*, 289: 28271–28283
36. Ka-Ming F, Moriwaki K, De Rosa MJ. (2013) Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol Biol*, 979: 65–70.
37. Moench I, Meekhof KE, Cheng LF, Lopatin AN (2013). Resolution of hypo-osmotic stress in isolated mouse ventricular myocytes causes sealing of t-tubules. *Exp Physiol*; 98(7): 1164–1177.
38. Guo Y, Yang Lu, Haught K, Scarlata S (2015). Osmotic Stress Reduces Ca²⁺ Signals through Deformation of Caveolae. *J Biol Chem*, 290 (27): 16698–16707.
39. Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, Stan R, Butler-Browne G, Védie B, Johannes L, Morone N, Parton R, Raposo G, Sens P, Lamaze C, Nassoy P (2010). Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell*; 144(3): 402–413.
40. Bastos A, Piontek K, Silva AM, Martini D, Menezes LF, Fonseca JM, Fonseca II, Germino GG, Onuchic LF (2009). Pkd1 Haploinsufficiency Increases Renal Damage and Induces Microcyst Formation following Ischemia/Reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 20(11): 2389–2402.

Anexo 1.- Datos no publicados, pertenecientes al Laboratorio de Mecanotransducción en la Fisiopatología Cardíaca, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de Chile. **Insuficiencia cardíaca inducida por la ausencia de PC1 en los cardiomiocitos.**



A) Análisis de supervivencia (Kaplan Meier) de ratones controles (n=12) y PC1 KO (n=16). **B)** Imágenes (izquierda) y tinción con hematoxilina/eosina de cortes obtenidos (derecha) de corazones controles y PC1 KO. **C)** Parámetros morfométricos donde se indican en los gráficos de barras el peso del corazón con respecto al peso del cuerpo (HW/BW, izquierda) y el peso del pulmón húmedo con respecto al peso del cuerpo (LWW/BW, derecha), n=8. **D)** Fracción de eyección (izquierda) y de acortamiento (derecha) obtenida por ecocardiografía n=2-4. Los resultados han sido analizados mediante un t-test no pareado y se presentan como el promedio \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Control.