



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevos factores implicados en las adaptaciones fisiológicas y cardiacas de la gestación

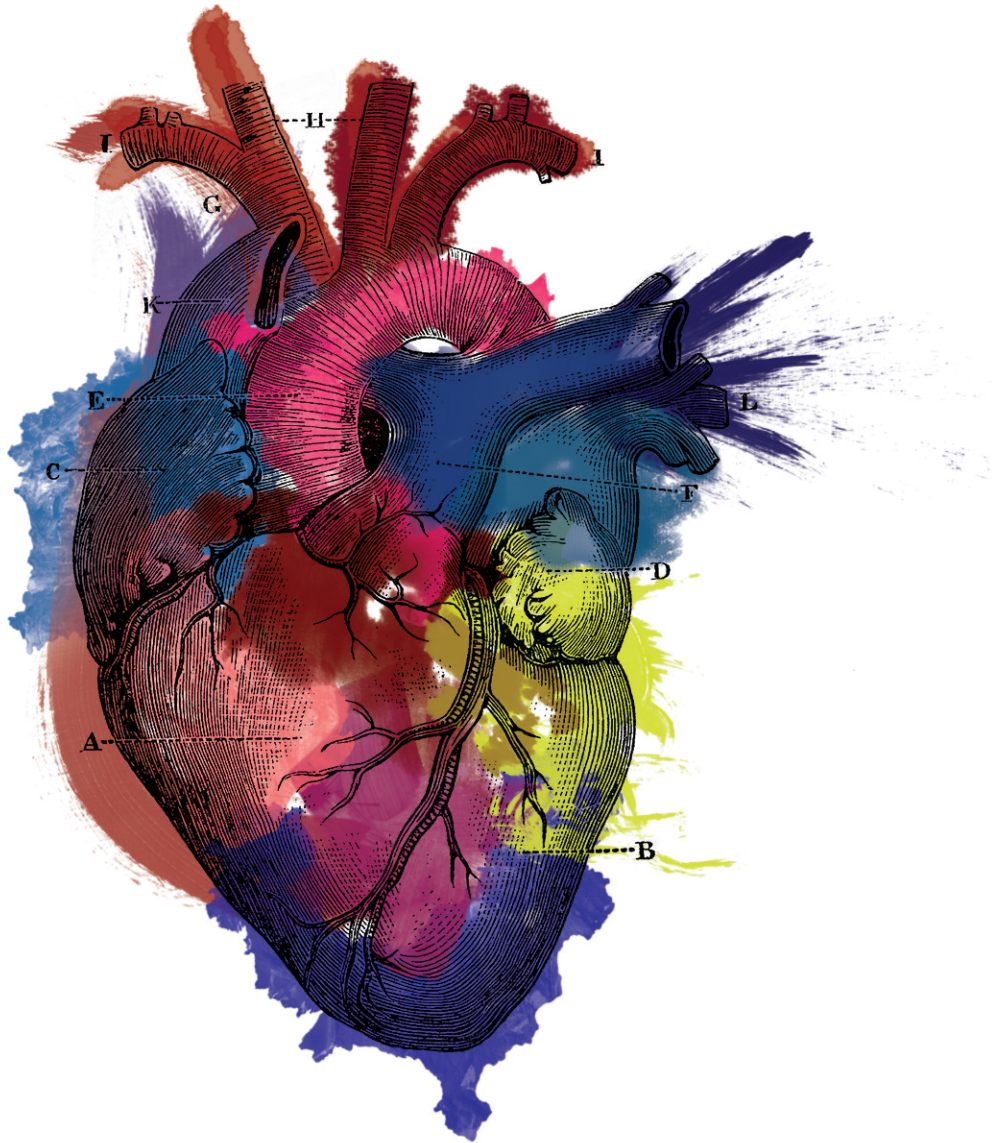
Ibon Redondo Angulo

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.

Nuevos factores implicados en las adaptaciones fisiológicas y cardiacas de la gestación



Ibon Redondo Angulo

2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Nuevos factores implicados en las adaptaciones fisiológicas y
cardiacas de la gestación.**

Ibon Redondo Angulo

2015

Grupo de Genética y Biología Molecular de
Proteínas Mitocondriales y Patologías Asociadas
—
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

Nuevos factores implicados en las adaptaciones fisiológicas y cardiacas de la gestación.

Memoria presentada por

Ibon Redondo Angulo

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Firma de los directores

Dr. Francesc Villarroya Gombau

Dra. Anna Planavila Porta

Barcelona, 2015

Aita, Ama eta Olartiar



Contenido

La presente tesis doctoral se estructura acorde a la normativa vigente en lo que respecta al formato de tesis “como compendio de publicaciones” establecido por la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, por lo tanto consta de la siguiente estructura:

1. Índice
2. Lista de Figuras y Tablas
3. Lista de Abreviaturas
4. Introducción general
5. Objetivos
6. Informe de los directores sobre los artículos publicados
7. Publicaciones que conforman la tesis
 1. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice
 2. Cardioprotective role of FGF21 during pregnancy
 3. C/EBP β is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy
8. Resumen de resultados y discusión global
9. Conclusiones
10. Bibliografía
11. Apéndice
 4. FGF21 and Cardiac Physiopathology



Índice

Contenido

Índice	1
Lista de Figuras y tablas	7
Lista de abreviaturas	11
Introducción	15
- La Gestación	17
Cambios metabólicos durante la gestación	19
Metabolismo de Carbohidratos	20
Metabolismo de Proteínas	22
Metabolismo de Lípidos	22
Cambios cardiovasculares durante la gestación	25
Cambios hemodinámicos	26
Output Cardíaco	26
Cambios en el volumen de sangre y plasma	27
Cambios anatómicos	29
- La Hipertrofia Cardíaca	31
Marcadores de hipertrofia cardíaca	33
α -MHC y β -MHC	34
ANF y BNP	34
Estímulos desencadenantes de la hipertrofia cardíaca	38
Receptores de estrés biomecánico	38
Vías de señalización implicadas en la aparición de la hipertrofia cardíaca	41
1. Receptores acoplados a proteína G	43
1.1 Señalización a través de $G\alpha$	43
1.1.1 A través de $G\alpha_q$	43
1.1.2 A través de $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$	44
1.2 Señalización a través de $G\beta\gamma$	45
2. PI3K/Akt/GSK-3 β	45
3. Calcineurina/NFAT	47
4. La vía de las MAPK	48
4.1 Señalización a través de ERK	49
4.2 Señalización a través de p38 y JNK	50
5. NF- κ B (Nuclear factor κ B)	51
6. Estrógenos	53
Hipertrofia cardíaca fisiológica	56
Hipertrofia cardíaca gestacional	57
Metabolismo cardíaco	60
Metabolismo cardíaco normal	60
Metabolismo cardíaco durante la gestación	63

- Los Fibroblast Growth Factors (FGFs)	67
FGFs en vertebrados	68
Clasificación funcional	69
Características estructurales	70
Receptores de FGFs	71
Interacción con los proteoglicanos	73
Cofactor β -Klotho	73
Dimerización del receptor	75
Mecanismo de acción de FGF21	75
FGF21	77
Distribución y expresión	77
Efectos fisiológicos de FGF21	78
FGF21 en el hígado	78
FGF21 en el tejido adiposo blanco	80
FGF21 en el tejido adiposo marrón	82
FGF21 en el corazón	84
Otras funciones	84
FGF21 en el crecimiento	84
Incremento del lifespan	85
Inhibición de la osteoblastogénesis	85
FGF21 en humanos	86
FGF21 como tratamiento terapéutico	87
- Los Factores de Transcripción C/EBP	90
Familia bZIP	90
Subfamilia C/EBP	91
C/EBP α	92
C/EBP δ	94
C/EBP β	95
Regulación de C/EBP β	96
Regulación transcripcional génica	96
Regulación postranscripcional	97
Regulación postraducciona	97
Unión de C/EBP β a elementos reguladores génicos	98
Homodímeros	100
Heterodímeros con C/EBPs	100
Heterodímeros con bZIPs	101
Desarrollo de ratones C/EBP $^{-/-}$	101
Efectos fisiológicos de C/EBP β	102
Diferenciación adipocitaria	102
Activación de macrófagos	103
C/EBP β en corazón	106

Objetivos	111
Informe de los directores de tesis los artículos publicados que conforman la tesis.	115
Publicaciones que conforman la tesis	119
- Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice	121
- Cardioprotective Role of FGF21 during pregnancy	135
- C/EBP β is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy	169
Resumen de resultados y discusión global	183
Conclusiones	203
Bibliografía	207
Apéndice	251
- FGF21 and Cardiac Physiopathology	253



Figuras y Tablas


Figuras:	Página
Figura 1	Ganancia de peso en los diferentes compartimentos en la gestación 18
Figura 2	Tasa metabólica basal durante la gestación humana 20
Figura 3	Redistribución de los sustratos metabólicos a lo largo de la gestación 21
Figura 4	Distribución de sustratos metabólicos durante la gestación tardía 23
Figura 5	Ciclo de Randle o de la glucosa-ácidos grasos 25
Figura 6	Cambios en el ritmo cardíaco materno a lo largo de la gestación 27
Figura 7	Cambios en el ritmo cardíaco materno a lo largo de la gestación 28
Figura 8	Cambios morfológicos del corazón y pulmones durante el embarazo 30
Figura 9	Esquema del sistema circulatorio 31
Figura 10	Alteraciones en el uso de sustrato en las hipertrofias 36
Figura 11	Geometrías de la hipertrofia cardíaca 37
Figura 12	Maquinaria mecanosensora de los cardiomiocitos 40
Figura 13	Vías de señalización de la respuesta hipertrofica cardíaca 42
Figura 14	Señalización a través de G α s en la contracción cardíaca 44
Figura 15	Vía de señalización calcineurina-NFAT. 48
Figura 16	Cascada de señalización de las MAPK 49
Figura 17	Vías de señalización de los estrógenos 55
Figura 18	Diferencias entre las hipertrofias fisiológica y patológica 56
Figura 19	Red metabólica cardíaca 62
Figura 20	Señalización intracelular de los ácidos grasos y la insulina 63
Figura 21	Relación filogenética entre los miembros de los FGFs 68
Figura 22	Estructura proteica de los FGFs 70
Figura 23	Organización de los dominios de un receptor de FGFs 71
Figura 24	<i>Splicing</i> que da lugar a las isoformas b y c de los FGFRs 71
Figura 25	Organización de los dominios de β -Klotho 74
Figura 26	Dimerización de los FGFRs 75
Figura 27	Mecanismo de acción de FGF21 sobre el complejo receptor 76
Figura 28	Regulación transcripcional de FGF21 79
Figura 29	Esquema de las vías y los efectos fisiológicos de FGF21 83
Figura 30	Esquema de interacción de un dímero bZIP con DNA 91
Figura 31	La familia de factores de transcripción C/EBP 92
Figura 32	Mapa de inicio de traducción en el mRNA de C/EBP β 95
Figura 33	C/EBP β en la activación de macrófagos M2 104
Figura 34	Comunicación inter e intraorgánica de FGF21 durante la gestación 192

Tablas:		Página
Tabla 1	Acontecimientos maternos principales en las fases de la gestación	19
Tabla 2	Cambios fisiológicos de la gestación en el sistema cardiovascular	26
Tabla 3	Características de las hipertrofias patológicas y fisiológicas	32
Tabla 4	División de los Fgfs propuesta por Popovici et al. en el 2005	68
Tabla 5	Especificidad de ligando-receptor entre los FGF-FGFR	72
Tabla 6	Nuevas estrategias farmacológicas en desarrollo basadas en FGF21	89
Tabla 7	Fosforilaciones postraduccionales de C/EBP β	98
Tabla 8	Genes y su motivos de unión de promotor a C/EBP β	99
Tabla 9	Tipos de macrófagos y sus vías de activación asociadas	104

The background of the page is a large, expressive, dark blue brushstroke that starts from the bottom left and sweeps across the bottom half of the page towards the right. The stroke has a textured, slightly grainy appearance, suggesting it was made with a brush. The top half of the page is plain white.

Abreviaturas

α-MHC	Alpha myosin heavy chain	LIP	Liver-enriched transcriptional inhibitory protein
α-SKA	Alpha skeletal actinin	LPS	Lipopolisacárido
AG	Ácido graso	MAPK	Mitogen activated protein kinase
AGL	Ácidos grasos libres	MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
Akt	Protein kinase B	MI	Infarto de miocardio. Miocardial infarction
ANF	Atrial natriuretic factor	mRNA	Messenger RNA
Ang II	Angiotensinogeno II	NCM	Neonatal cardiomyocyte
ARG1	Arginasa 1	NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
ATP	Adenosin trifosfato	NF-κB	Nuclear factor κ B
β-MHC	Beta myosin heavy chain	NLC	Nuclear localization signal
BAT	Tejido adiposo marrón. Brown adipose tissue	NO	Óxido nítrico. Nitric oxide
BMR	Tasa metabólica basal. Basal metabolic rate	PAI-1	Plasminogen activator inhibitor type 1
BNF	Brain natriuretic factor	PE	Fenilefrina
bZIP	Basic leucine zipper	PGC	Placental growth factor
C/EBP	CCAAT enhancer binding protein	PGC1α	PPAR γ coactivator 1 α
cAMP	Cyclic AMP	PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
CO	Gasto cardiaco. Cardiac output	PKA	Protein kinase A
CREB	cAMP responsive element binding protein	PKB	Protein kinase B
CRT	Calreticulina	PKC	Protein kinase C
CSA	Cross-sectional area	PLC	Phospholipase C
cTM	Cardiac tissue macrophage	PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
DAG	Diacilglicerol	ROS	Reactive oxygen species
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
E2	17 β -estradiol, estrógeno	SV	Volumen sistólico. Systolic volume
EF	Fracción de eyección. Ejection fraction	TAC	Constricción aórtica. Transverse aortic constriction
eNOS	Endotelial nitric oxide synthase	TG	Triglicérido
ER	Receptor de estrógeno. Estrogen receptor	TL	Longitud tibial. Tibial lenght
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	TNFα	Tumor necrosis factor alpha
ERR	Estrogen related receptor	UCP1	Uncoupling protein 1
FGF	Fibroblast growth factor	VEGF	Vascular endotelial growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor	WAT	Tejido adiposo blanco. White adipose tissue
GLUT1	Glucose transporter type 1	Wt	Wild-type
GLUT4	Glucose transporter type 4		
GPCR	G-protein coupled receptor		
GSK-3β	Glicogen synthase kinase 3 β		
HR	Ritmo cardiaco. Heart rate		
HW	Peso cardiaco. Heart weight		
I/R	Isquemia-reperfusión		
IGF-I	Insulin-like growth factor I		
IKK	I κ B kinase		
IL-6	Interleukin 6		
IRS	Insulin receptor substrate		
IκB	Inhibitor of κ B		
JNK	c-Jun N-terminal kinase		
KO	Knock-out		
LAP	Liver-enriched transcriptional activating protein		



Introducción

LA GESTACIÓN

La fecundación desencadena miles de complejos cambios biológicos que ocurren de manera secuencial. Estos cambios posibilitan que la unión de dos células se transforme en un nuevo miembro de la siguiente generación de una especie. La gestación se define como el tiempo en el que la hembra porta el feto, o los fetos, en su interior. Esta etapa comprende desde la concepción hasta el parto.

Los cambios que ocurren durante este periodo de tiempo son tan profundos que en el pasado se consideraban anormales y se creía que había que corregirlos. Los médicos de manera rutinaria aconsejaban a las mujeres embarazadas dietas bajas en sodio para reducir la retención de líquidos, les restringían el aumento de peso y la ingesta para evitar complicaciones en el parto y les recetaban suplementos de hierro y de otros compuestos para aumentar los niveles a un rango “normal”. Ahora se sabe que lo que se denomina estado fisiológico normal en una mujer no-gestante no es aplicable a una que si lo está. Intentar corregir los cambios que se dan en una gestante para devolverlos a los niveles de una no-gestante produciría en todo caso más daño que beneficio. Para que estos cambios que ocurren se den de manera correcta se necesita la coordinación entre varios sistemas maternos: reproductor, endocrino, neural, inmune, renal y cardiovascular. Al estar tantos sistemas alterados durante la gestación, realizar un resumen fisiológico total resulta complejo, pero sí que es posible diseccionar los cambios que ocurren en los diferentes sistemas. Además, comprender como ocurren estos cambios durante la gestación puede resultar de gran utilidad terapéutica, ya que varias de las modificaciones dan lugar a estados que se asemejan a respuestas patofisiológicas a varias enfermedades (Barclay, 2009). Para el contexto de esta tesis, los cambios cardiovasculares y metabólicos maternos son los de mayor interés.

Los cambios que se observan en las madres gestantes se dan de un modo secuencial concreto y permiten la preparación de un ambiente propicio para la implantación del blastocisto y para el intercambio a largo plazo de nutrientes y productos de deshecho con el embrión/feto. El orden de la secuencia es absoluto, ya que el cumplimiento satisfactorio de cada cambio depende del anterior. Los cambios fisiológicos de la madre se anticipan a las necesidades del crecimiento y desarrollo fetal, es por este motivo que las modificaciones maternas comienzan tan pronto como la hembra está preñada (Hytten & Leitch, 1971). En este punto cabe mencionar que los cambios fisiológicos asociados a la gestación se conservan altamente entre todos los mamíferos placentarios. La creación de la placenta y del útero decidualizado es un fenómeno relativamente único en animales adultos ya que ocurre el crecimiento de un nuevo órgano. Este hecho supone también un reto para el sistema cardiovascular, ya que tiene que adaptarse para perfundir un órgano completamente nuevo con una red vascular importante. No solo esto, este órgano y su vascularización han de ser transitorios y desechables (en el parto) (A. T. Yamada, Croy, DeMayo, S. Lee Adamson, & Burke, 2014). La capacidad para el cambio tanto en mujeres como en ratones hembra es considerable. Una de las diferencias mayores entre mujeres y ratones es la forma del útero. Los ratones tienen un útero bicornio por lo que es capaz de acomodar camadas más grandes. A pesar de esta diferencia el suministro vascular esta conservado entre especies. Los ratones gestan camadas mientras que las mujeres acostumbran a tener un solo hijo por embarazo. Por este motivo, el útero de los roedores crece mucho más durante la gestación y el

peso materno puede incrementarse hasta doblar el de la madre no-gestante mientras que en humanos se aconseja a las madres que la ganancia de peso no supere el 30% de su peso corporal normal.

La mayor diferencia, entre las gestaciones humana y murina se da en la duración gestacional y en los plazos en los que los cambios fisiológicos ocurren. La gestación humana dura típicamente 39 semanas y se divide en trimestres. Por el contrario la gestación en ratones suele durar 19-20 días en función de la cepa. La implantación del embrión ocurre en el día 4.5 de gestación de ratón, lo que supone $\frac{1}{4}$ de su gestación (Rossant & Tam, 2002) mientras que en humanos esta implantación se da en el $\frac{1}{40}$ de la gestación. En ratón, no se observan cambios fisiológicos previos a la implantación. La modificación de la arteria espiral y la consiguiente apertura de la circulación placentaria ocurre a mitad de gestación en ratones y transcurrido el primer trimestre en mujeres (Burke et al., 2010). La única comparación que tal vez no sea correcta entre ratones y mujeres sea la comparación basada en trimestres. Relacionar el desarrollo murino con los trimestres humanos puede ser conveniente pero no es del todo correcto (A. T. Yamada et al., 2014).

Los cambios secuenciales a los que se hacía mención más arriba se dan en los tejidos maternos, la placenta y peso fetal a lo largo de la gestación y siguen el siguiente orden: 1. Volumen de plasma materno 2. Reserva de nutrientes maternos 3. Peso de la placenta 4. Riego sanguíneo uterino 5. Peso fetal. Para proveer al feto con suficiente energía, nutrientes y oxígeno para su desarrollo la madre primero ha de expandir el volumen de plasma circulante. Después se acumulan las reservas de nutrientes maternas. Estas reservas se acumulan antes de que sean necesarias para así posibilitar rápida ganancia de peso fetal que ocurrirá posteriormente (Figura 1). Por este motivo la placenta se desarrolla antes que el feto, de esta manera se encuentra totalmente preparada para el alto nivel funcional que requerirá una vez el feto este ganando peso de manera exponencial. A modo de ejemplo, en humanos, el 10% del crecimiento fetal se da en la primera mitad de la gestación, el 90% restante ocurre en la segunda mitad (King, 2000).

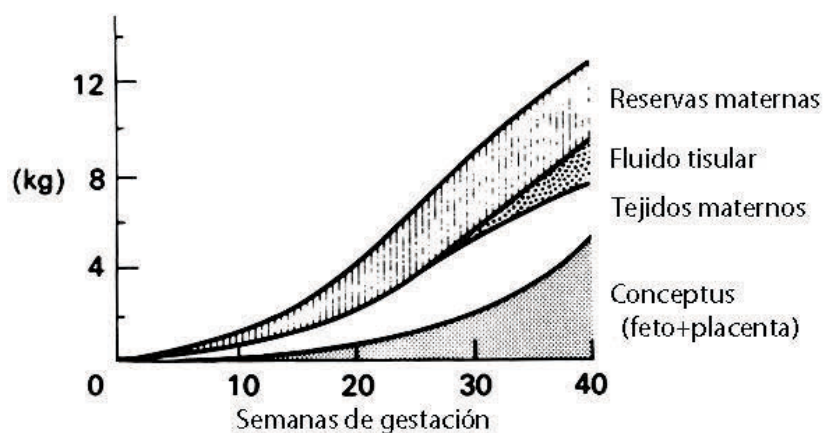


Figura 1. Ganancia de peso en los componentes individuales identificables en una gestación humana normal. Las reservas y tejidos maternos se adecúan al estado gestante antes que el feto comience su crecimiento. (Hyttén & Leitch, 1971).

Los fetos dependen del funcionamiento de varios sistemas que han de estar a punto antes de que el feto dependa de ellos, anomalías en el desarrollo de estos sistemas fisiológicos pueden afectar al crecimiento y desarrollo fetal subsiguiente.

Cambios metabólicos durante la gestación

Los cambios metabólicos que acontecen en la gestación pueden dividirse en dos, los que ocurren en la aproximadamente primera mitad de la gestación y los que ocurren en la segunda. Los primeros cambios fisiológicos se denominan anabólicos maternos y consisten en una serie de adaptaciones que permitirán a la madre satisfacer la demanda fetal futura mediante el aporte de grandes cantidades de sangre, oxígeno y nutrientes en la segunda etapa posterior. Esta segunda etapa, la catabólica materna, incluye cambios fisiológicos que posibilitan el suministro de la energía y nutrientes acumulados por la madre al feto. En la Tabla 1 se resumen los cambios principales que ocurren en cada una de estas fases.

Fase anabólica materna	Fase catabólica materna
↑ volumen sanguíneo, ↑ <i>output</i> cardíaco ↑ reservas de grasa, nutrientes, glicógeno hepático	Movilización de reservas de grasas y nutrientes ↑ producción y concentración en sangre de TG, AG y glucosa. ↓ reservas de glicógeno hepático
Crecimiento de algunos órganos maternos ↑ apetito, ingesta (balance calórico positivo)	Metabolismo de ayuno acelerado El apetito y la ingesta disminuyen cerca del parto
↓ tolerancia al ejercicio ↑ niveles de hormonas anabólicas	↑ niveles de hormonas catabólicas

Tabla 1. Resumen de los acontecimientos principales de las fases anabólica y catabólica maternas de la gestación. TG: triglicéridos, AG: ácidos grasos. (Brown, 2011; Gabbe, 2012; Winick, 1989)

Al principio de la gestación el metabolismo materno es básicamente anabólico, lo que permite a la madre crear una gran reserva de nutrientes para más adelante, cuando serán altamente necesitados por el feto en su etapa de crecimiento mayor. La demanda de nutrientes del feto la determina la secuencia o el orden en el que sus tejidos se desarrollan y crecen, lo que viene establecido genéticamente y se conoce como ontogenia o morfogénesis. La cantidad y el tipo de nutrientes que se necesitan de la madre dependen por lo tanto de la cantidad y del tipo de nutrientes que se requieren para que las vías metabólicas del feto funcionen y las estructuras fetales se desarrollen.

Las adaptaciones metabólicas que se describen a continuación son necesarias para posibilitar el correcto desarrollo fetal. La tasa metabólica basal (BMR) materna durante la gestación aumenta progresivamente hasta ser un 20% más elevada a término en comparación con mujeres no gestantes (Emerson, Saxena, & Poindexter, 1972; Heini, Schutz, & Jequier, 1992; Sandiford &

Wheeler, 1924) (Figura 2). En ratones, el aumento de la BMR es aún mayor, y puede llegar a ser hasta 2.5 veces superior en gestantes que en no gestantes (Speakman & McQueenie, 1996). La madre ha de ser capaz de ajustar su gasto energético y el uso de sustratos metabólicos para poder llevar a término la gestación y la posterior lactancia satisfactoriamente (Butte, Hopkinson, Mehta, Moon, & Smith, 1999; Hadden & McLaughlin, 2009).

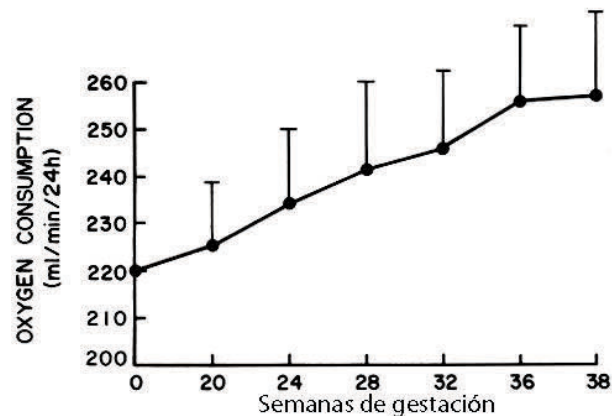


Figura 2. Tasa metabólica basal durante la gestación humana. (Barclay, 2009; Emerson et al., 1972)

Metabolismo de Carbohidratos

Los cambios referentes al metabolismo de carbohidratos ocurren para finalmente favorecer la disponibilidad de glucosa por el feto. La glucosa es el sustrato predilecto del feto y para asegurar que existe un suministro continuado de este carbohidrato al feto se desarrolla una resistencia a insulina materna en la segunda mitad de la gestación (Figura 3).

El metabolismo de carbohidratos en la primera mitad del embarazo se caracteriza por un aumento en la producción de insulina que los estrógenos y la progesterona estimulan (Herrera, 1986). Esto hace que se capte más glucosa y que se reserve a modo de grasa y de glucógeno en el hígado. Más adelante, en la segunda mitad, por medio de la hormona gonadotropina coriónica y la prolactina se inhibe la conversión de la glucosa en glucógeno y grasa. Además, de manera simultánea ocurre la resistencia a insulina en la madre, conocida como efecto diabetogénico de la gestación. Esta resistencia hace que la madre dependa de las reservas acumuladas para subsistir. Mediante la técnica de *clamp* hiperinsulinémico euglicémico que evalúa la sensibilidad a insulina, se ha determinado que la sensibilidad cae hasta un 80% en las madres gestantes (Lain & Catalano, 2007). La resistencia a insulina en el hígado materno aumenta la producción gluconeogénica en un 30%. Del mismo modo, el músculo esquelético se vuelve resistente. Siendo este órgano el mayor consumidor de glucosa se consigue disminuir importantemente el uso materno de esta molécula (Leturque et al., 1986). La resistencia a insulina también actúa sobre el tejido adiposo. En este órgano se aumenta dramáticamente la lipólisis, que facilita la disponibilidad de AG para el consumo materno y glicerol como sustrato para la gluconeogénesis

en el hígado. El glicerol es el sustrato preferencial (Herrera, 1986), guardando así los aminoácidos para el feto (ver más adelante) y los ácidos grasos libres para el músculo esquelético y el corazón.

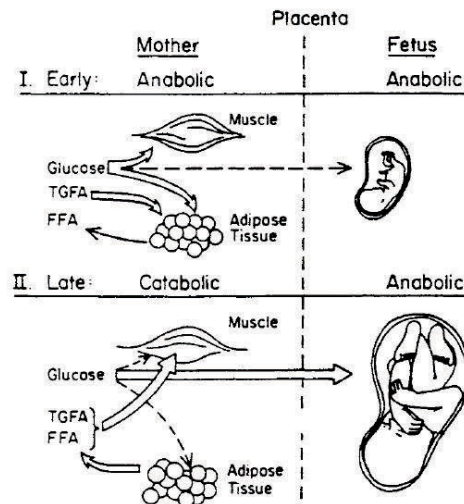


Figura 3. Redistribución de los sustratos metabólicos a lo largo de la gestación (Cowett, 1991).

El aumento en los niveles de insulina que se dan en la gestación son equiparables a los que se observan en la diabetes tipo II, ya que la capacidad secretora de las células β -pancreáticas también está afectada por la gestación. La secreción de insulina inducida por glucosa está elevada 3 veces en la fase terminal de la gestación. Este hecho se debe en parte a un aumento en la masa de células β de un 10-20 % que ocurre por hipertrofia e hiperplasia de estas células (Rieck & Kaestner, 2010; Sorenson & Brelje, 1997).

Los cambios antes descritos hacen que se garantice un suministro constante de glucosa para el desarrollo fetal. El nivel de glucemia materno en ayuno es inferior en la última etapa de la gestación ya que el feto aumenta su demanda según va creciendo. La glucemia posprandial por el contrario está elevada y se mantiene así durante más tiempo debido a la resistencia a insulina (Butte NF & Butte, 2000).

Este estado hace que la madre tenga un metabolismo de ayuno acelerado. En ayuno prolongado, la madre oxidará las reservas lipídicas y utilizará los aminoácidos de manera glucogénica incrementando así la producción de cetonas. En gestantes en ayuno se pueden detectar los niveles bajos de glucosa e insulina junto con niveles altos de TG, AG y cetonas horas antes que en hembras no gestantes (Herrera, Knopp, & Freinkel, 1969; Leibel, 1965). Esta rápida conversión al metabolismo de ayuno posibilita a la madre usar principalmente sus reservas lipídicas para la producción de energía ahorrando así la glucosa y los aminoácidos para el feto (Butte NF & Butte, 2000). A pesar de que estas adaptaciones metabólicas ayudan a asegurar el aporte continuado de glucosa al feto, el ayuno aumenta la dependencia por los cuerpos cetónicos del feto (como en el caso de mujeres con diabetes mal controladas o hembras con importantes pérdidas de peso),

lo que se asocia con crecimiento corporal reducido y desarrollo intelectual limitado en la descendencia (Brown, 2011; Naeye & Chez, 1981).

Metabolismo de Proteínas

El nitrógeno y las proteínas se requieren de una manera importante durante la gestación ya que han de sintetizarse nuevas estructuras maternas y fetales. No hay evidencias de que la madre acumule reservas proteicas de ningún tipo durante la primera fase de la gestación, por lo que los requerimientos de proteínas se cumplen por una parte reduciendo los niveles de excreción de nitrógeno. Esto puede verse en que la secreción de urea esta disminuida en la etapa terminal de la gestación (Satish C Kalhan, 2000). Por otra parte, la demanda se satisface mediante la ingesta de proteínas durante la gestación (King, 2000). Los aminoácidos se evitan como sustrato de la gluconeogénesis hepática. En la parte final de la gestación el consumo de aminoácidos ramificados desciende mientras que la síntesis proteica aumenta un 25% (S C Kalhan, Rossi, Gruca, Super, & Savin, 1998).

Metabolismo de Lípidos

Durante la gestación ocurren varios cambios referentes al uso de lípidos en el cuerpo materno. Estos cambios promueven la acumulación de las reservas grasas de la madre durante la primera mitad de la gestación y promueven su movilización en la segunda (Herrera, 2002; Hytten & Leitch, 1971).

En la fase anabólica materna se manifiesta una mayor lipogénesis en todas las estructuras maternas (tejido adiposo, hígado y carcasa). Al darse al mismo tiempo una síntesis activa de ácidos grasos y una mayor captación de los lípidos circulantes los tejidos maternos acumularán las reservas en forma de grasa (Herrera, 1986).

Además de observar cómo los tejidos maternos se sustentan cada vez más de un metabolismo de lípidos a medida que avanza la gestación, los niveles en sangre de varias lipoproteínas están incrementados muy marcadamente (Ghio, Bertolotto, Resi, Volpe, & Di Cianni, 2011). Los niveles plasmáticos de TGs son los primeros en aumentar y sufren el incremento más dramático ya que pueden triplicar los niveles de las no-gestantes (Butte NF & Butte, 2000; King, 2000). Las lipoproteínas que contienen colesterol, los fosfolípidos y los AG también están aumentados (Lain & Catalano, 2007). El suministro de colesterol es usado por la placenta para sintetizar hormonas esteroideas y por el feto para la formación de los nervios y las membranas plasmáticas (Butte NF & Butte, 2000). La alta tasa lipolítica envía los ácidos grasos libres y el glicerol al hígado, donde serán oxidados o convertidos en triglicéridos dentro de partículas VLDL (*very low density lipoproteins*) (Herrera, 2002; Mampel, Villarroya, & Herrera, 1985). Como se decía antes, estos altos niveles de AG hacen que la madre sea susceptible de padecer cetosis de manera colateral a salvaguardar los aminoácidos para otro uso. Los AG se convierten por lo tanto en el sustento materno principal y su disponibilidad determina por lo tanto, que otros sustratos estarán disponibles para el feto.

Estos altos niveles circulantes de TG y colesterol se considerarían lipotóxicos si no fuera en el contexto de la gestación, donde no causan aterosclerosis (Saarelainen et al., 2006), pese a que los mismos niveles en machos o en hembras no gestantes serían aterogénicos (Martin, Davies, Hayavi, Hartland, & Dunne, 1999). Estos cambios en el perfil lipídico de las gestantes no parecen estar relacionados con el tipo de dieta ingerida por las madres (Ortega, Gaspar, & Cantero, 1996).

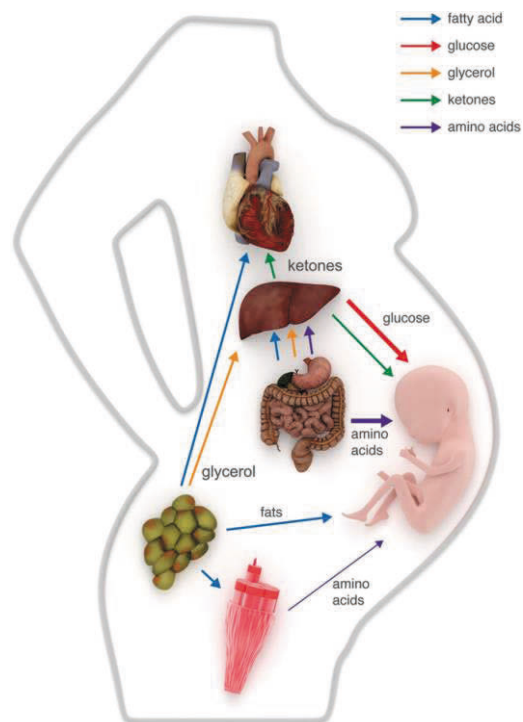


Figura 4. Distribución de sustratos metabólicos durante la gestación tardía. (L. X. Liu & Arany, 2014).

Los mecanismos que guían estos cambios metabólicos (Figura 4) no se conocen por completo aún. La placenta juega sin duda un importante papel en la orquestación de los cambios, ya que además de secretar importantes cantidades de hormonas durante la gestación (estrógenos, progesterona, prolactina, cortisol) que se han vinculado a la resistencia a insulina, también libera varias citocinas. Algunas de las citocinas placentarias liberadas se han relacionado también con la resistencia a insulina observada en la diabetes (Hauguel-de Mouzon & Guerre-Millo, 2006). $\text{TNF}\alpha$ por ejemplo, se correlaciona muy estrechamente con la resistencia a insulina (Kirwan et al., 2002). La resistencia a insulina también se ha asociado a los cambios del tejido adiposo durante la gestación. En gestación ocurre una inflamación del tejido adiposo (Kondo, Sugiyama, Kusaka, & Toyoda, 2004) que se da por la infiltración de macrófagos (L. Zhang et al., 2011). Estos macrófagos una vez en el tejido adiposo se activan por la presencia de ácidos grasos libres que son fruto de la alta tasa lipolítica que se da en la fase tardía de la gestación. Al activarse, los macrófagos secretan una batería de citocinas proinflamatorias (MCP1, *monocyte chemoattractant protein-1*; $\text{TNF}\alpha$, *tumor necrosis factor α* ; IL-6, *interleukin 6*); PAI-1, *plasminogen activator inhibitor type 1*) y anti-inflamatorias como IL-10 (*interleukin 10*). La secreción de las

citocinas proinflamatorias aumenta la liberación de ácidos grasos y favorecen el microambiente proinflamatorio, además MCP1 hace que los monocitos sanguíneos sean reclutados al tejido adiposo donde se diferenciaron en macrófagos dando pie a un círculo que prolongara el estado inflamatorio (Suganami, Nishida, & Ogawa, 2005). La alta expresión de estas citocinas inflamatorias hace que se liberen al torrente sanguíneo, lo que contribuye a la resistencia a insulina sistémica presente en la gestación.

Varios de estos sucesos referentes al tejido adiposo inflamado y la resistencia a insulina sistémica son los mismos que se observan en obesidad (Fujisaka et al., 2009). La inflamación del tejido adiposo se correlaciona con la infiltración de macrófagos (Constant, Gagnon, Landry, & Sorisky, 2006; Permana, Menge, & Reaven, 2006). Modelos animales de obesidad han demostrado que se da una acumulación de macrófagos en el tejido adiposo mediante MCP1 y su receptor CCR2 (Weisberg et al., 2003) y que esta acumulación es necesaria para la resistencia a insulina ocurra (Weisberg et al., 2006).

En ambos casos, obesidad y gestación, se da un aumento de los niveles circulantes de TNF α . Esta citocina es capaz de impedir la señalización de la insulina ya que aumenta la fosforilación de serinas de IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) y disminuye la actividad tirosina cinasa del receptor de insulina (Hotamisligil & Spiegelman, 1994; Hotamisligil et al., 1996; Peraldi, Hotamisligil, Buurman, White, & Spiegelman, 1996). Por este motivo TNF α podría estar implicado en la resistencia a insulina sistémica que se observa en gestación. Del mismo modo, se ha probado que IL-6 puede impedir la señalización de la insulina en el hígado y en adipocitos inhibiendo SOCS1 y SOCS3 (*supression of cytokine signalling 1 y 3*), que induce la ubiquitinización de IRS1, que conlleva su degradación (Emanuelli et al., 2000; Kristiansen & Mandrup-Poulsen, 2005).

La expresión de IL-10 protege frente a la resistencia a insulina inducida por TNF α a través de la activación de STAT3 (Lumeng, Bodzin, & Saltiel, 2007) y modula la expresión de genes inflamatorios como TNF α y MCP1 (P. J. Murray, 2005). Por este motivo, en la fase tardía de la gestación, IL-10 podría compensar los cambios que las citocinas proinflamatorias llevarían a cabo.

Otro mecanismo por el cual ocurriría la resistencia a insulina serían los altos niveles circulantes de ácidos grasos libres. Existe lo que se denomina el ciclo glucosa-ácidos grasos o ciclo de Randle por su descubridor (Randle, Garland, Hales, & Newsholme, 1963) que demostró la competencia que hay entre estos dos sustratos en cultivo de cardiomiocitos de rata. Este ciclo explica que la relación entre la glucosa y los ácidos grasos libres (AGL) es y no dependiente. La disposición de glucosa promueve su oxidación y la reserva de glucosa y grasa mientras que inhibe la oxidación de AG. De manera inversa, cuando son los ácidos grasos los que se encuentran disponibles se promueve su oxidación y reserva inhibiendo el uso de la glucosa como sustento metabólico. Durante el ayuno o la práctica del deporte se observan también altos niveles de AGL circulantes (Delarue & Magnan, 2007). Los niveles elevados de AGL hacen que estos se oxiden produciendo acetil-CoA y citrato, que inhiben la actividad de la piruvato dehidrogenasa (PDH) y la fosfofructocinasa (PFK) respectivamente. Como consecuencia, la glucosa 6-fosfato intracelular se acumula, lo que hace que la hexokinasa (HK) se inhiba, al igual que el transporte de glucosa al interior celular (Figura 5). No solo esto, la oxidación de los AG hace que se activen vías de señalización intracelular que harán que la señal de la insulina se vea impedida (ver Figura 20 en el capítulo de la hipertrofia cardíaca).

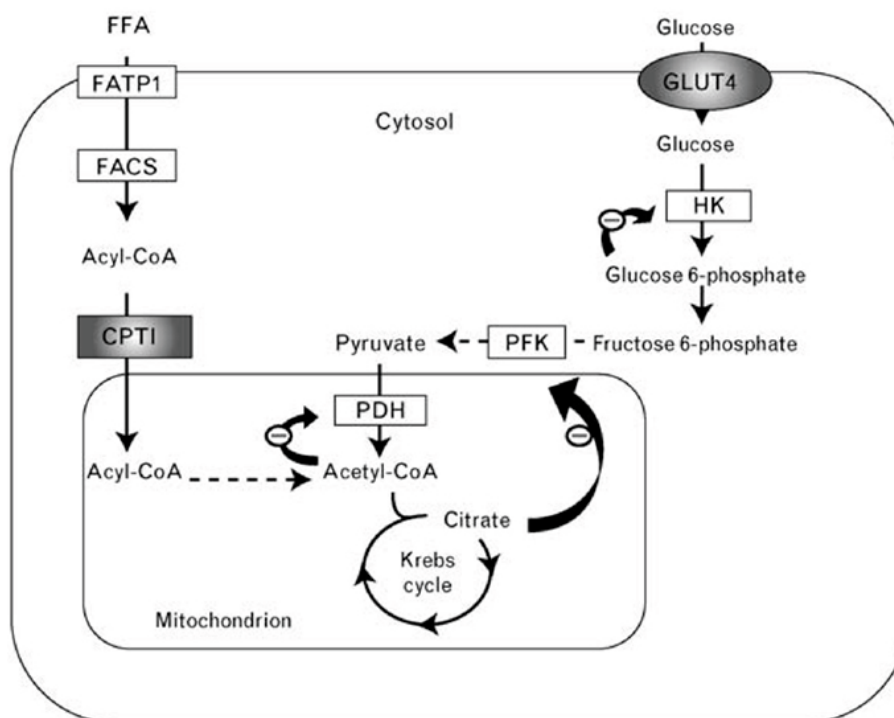


Figura 5. Ciclo de Randle o de la glucosa-ácidos grasos. (Delarue & Magnan, 2007)

Cambios cardiovasculares durante la gestación

Además de las notorias adaptaciones metabólicas que las hembras atraviesan durante la gestación, se dan varias modificaciones cardiovasculares necesarias para este proceso. Del mismo modo que ocurría con el metabolismo, las adaptaciones que afectan al sistema cardiovascular son similares entre humanos y otras especies de mamíferos incluido el ratón (Wong et al., 2002).

Durante la gestación el sistema cardiovascular materno será el que haga frente a las demandas de la propia madre y del feto, que estará en un constante cambio dinámico. El intercambio constante de nutrientes y subproductos metabólicos a través del sistema útero-placentario crean una sutil interdependencia entre la madre y el feto.

El embarazo se asocia a una serie de cambios fisiológicos significativos pero reversibles en la hemodinámica y en la función cardíaca materna. Los cambios son producidos por los altos niveles de estrógenos, prostaglandina y otras sustancias vasoactivas junto con el aumento de carga del sistema cardiovascular. La mayor cantidad de sangre materna circulante, los requerimientos nutricionales del feto en crecimiento y el sistema circulatorio de la placenta suponen una alta demanda para el sistema cardiovascular materno. La mayoría de hembras puede satisfacer esta alta demanda sin perjuicio para ellas. A pesar de ello, si este sobreesfuerzo se impone sobre una hembra con una patología subyacente que de antemano comprometa su hemodinámica, la gestación puede conllevar un importante riesgo para la homeostasis materna. De manera inversa, si el sistema materno no es capaz de adaptarse a los nuevos requerimientos

hemodinámicos gestacionales, los efectos adversos que la circulación uteroplacentaria sufrirá afectarán al feto. La afectación fetal se puede observar en forma de malformaciones (enfermedades cardíacas congénitas), crecimiento intrauterino restringido o incluso el aborto. Por este motivo el sistema cardiovascular materno ha de encontrar un equilibrio entre las necesidades fetales y la tolerancia materna.

Cambios hemodinámicos

Los cambios hemodinámicos asociados a gestación incluyen cambios en el volumen sanguíneo, *output* cardíaco, ritmo cardíaco, presión sanguínea sistémica, resistencia vascular y en la distribución del riego sanguíneo. En la tabla 2 se resumen estos cambios.

Parámetro	Modificación
Consumo de oxígeno (VO_2)	↑
Suministro oxígeno (DO_2)	=, ↑
Volumen sanguíneo:	
Plasma	↑↑↑
Eritrocitos	↑
Agua corporal	↑
Cambios en la resistencia:	
Circulación sistémica	↓
Circulación pulmonar	↓
Presión sanguínea (SVR x CO):	
Sistólica	=, ↓
Diastólica	↓
Contractilidad del miocardio:	
Cronotropismo (HR)	↑
Intropismo (SV)	↑
Output cardíaco (HR x SV)	↑
Circulación uteroplacentaria	↑

Tabla 2. Cambios fisiológicos de la gestación en el sistema cardiovascular. (Blackburn, 2014). CO, output cardíaco; HR, ritmo cardíaco; SV, volumen sistólico; SVR, resistencia vascular sistémica.

- *Output* cardíaco

El *output cardíaco* (CO) o gasto cardíaco se define como el producto del ritmo cardíaco (HR) y el volumen sistólico (SV) y es uno de los parámetros que más cambiado se halla en la gestación. Ya en el 1915 se describió como el gasto cardíaco aumentaba con el embarazo (Lindhard, 1915), este hallazgo dio pie a que se siguiera ahondando en los cambios cardiovasculares que acontecían durante la gestación. El CO puede incrementar hasta doblar los valores previos a la gestación en la etapa final del embarazo (J F Clapp & Capeless, 1997) pero su rango habitual está

en torno al incremento del 17-30% (Chapman et al., 1998; Robson, Hunter, Boys, & Dunlop, 1989; Slangen, Out, Verkeste, & Peeters, 1996; van Oppen, Stigter, & Bruinse, 1996). En ratón por el contrario, el aumento en el gasto cardiaco puede alcanzar valores más altos, como mostraron Wong et al. al medir un incremento del 64%, debido principalmente a que el volumen sistólico se encontraba aumentado un 37%. El mayor aumento del CO durante la gestación del ratón comparado con el de humano o rata (Gilson, Mosher, & Conrad, 1992; Slangen et al., 1996). Este hecho puede deberse a que los ratones gestantes aumentan su peso relativo mucho más que otros mamíferos (80% en ratones frente al 20-30% en humanos y 35% en ratas).

Este aumento en el gasto cardiaco se asocia con el aumento del retorno venoso y con el mayor output del ventrículo derecho. El aumento del gasto ocurre tanto por el aumento del volumen sistólico como por el mayor ritmo cardiaco. Estos dos parámetros empiezan a verse afectados (aumentados) desde el principio de la gestación, siendo el aumento en el ritmo cardiaco la modificación que antes puede detectarse en la preñez (Figura 6). Durante el principio de la gestación se da predominantemente un aumento del SV debido a la mayor contractilidad del corazón. A medida que el embarazo avanza el ritmo cardiaco se eleva, convirtiéndose en el factor más determinante para el aumento del CO.

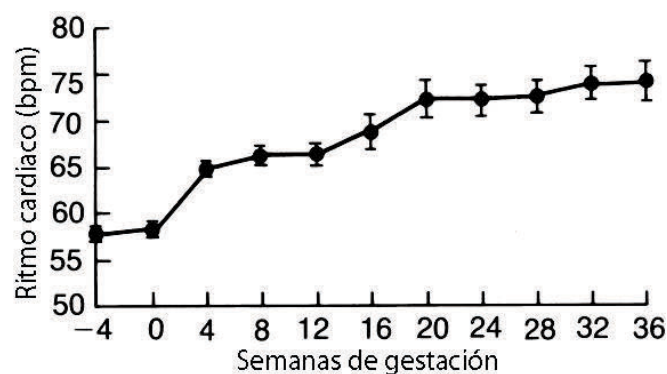


Figura 6. Cambios en el ritmo cardiaco materno a lo largo de la gestación. (James F. Clapp, 1985)

- Cambios en el volumen de sangre y plasma

Otro de los cambios más notorios que se da en las hembras durante el embarazo es el aumento en el volumen de la sangre y el plasma (Bond, 1958; Fruhman, 1968; Longo, 1983; Rugh & Somogyi, 1969). Estos cambios dan lugar a la hipervolemia gestacional, que es la causante de varias de las alteraciones que se dan en los componentes moleculares y celulares sanguíneos por hemodilución. En humanos el volumen de plasma aumenta entre un 30-40% (Blackburn, 2014; Rugh & Somogyi, 1969) mientras que en ratones el aumento es del casi 80% (Fruhman, 1968). El aumento de volumen de la sangre materna se da por el aumento del plasma seguido del aumento del volumen total de eritrocitos. En humanos, el aumento de sangre total es de aproximadamente un 30% (40% de incremento plasmático, 18% de eritrocitos) (Rugh & Somogyi, 1969). Pese a que ocurra un aumento del volumen total de eritrocitos existe un fenómeno de

hemodilución que da lugar a un volumen neto de eritrocitos disminuido; lo mismo ocurre con otras proteínas plasmáticas circulantes. El volumen sanguíneo aumenta al principio de la gestación y sigue con esta tendencia hasta el término.

El volumen plasmático, el peso de la placenta y el peso al nacer se correlacionan positivamente. Las alteraciones que afectan al incremento normal del aumento del volumen sanguíneo materno se asocian con complicaciones de la gestación. El aumento de volumen sanguíneo superior a lo normal se observa en gestaciones humanas múltiples (lo que probablemente está relacionado con la tendencia a que los gemelos nazcan con un peso superior a la media), obesidad, neonatos con peso superior a la edad gestacional y gestaciones prolongadas.

Este aumento de sangre se acomoda en el sistema vascular del útero, mamas, músculos, riñones y piel. Las hormonas influyen los cambios en el equilibrio de fluidos y actúan sobre el sistema cardiovascular y renal para finalmente modificar el volumen plasmático (Figura 7). La influencia de la progesterona principalmente sobre la red venosa hace que esta disminuya su tono aumentando la capacidad de venas y vénulas disminuyendo la resistencia. Esto hace que el volumen sanguíneo se acomode. Los estrógenos y la progesterona modifican la actividad de la renina plasmática y los niveles de aldosterona, lo que resulta en una retención de sodio que incrementa el contenido de agua total. Esta agua se encuentra en el espacio extracelular principalmente y contribuye en el aumento del volumen plasmático. El aumento de volumen plasmático también modifica la viscosidad de la sangre, ya que la hipervolemia diluye las proteínas y células de la sangre disminuyendo su viscosidad cerca de un 20%.

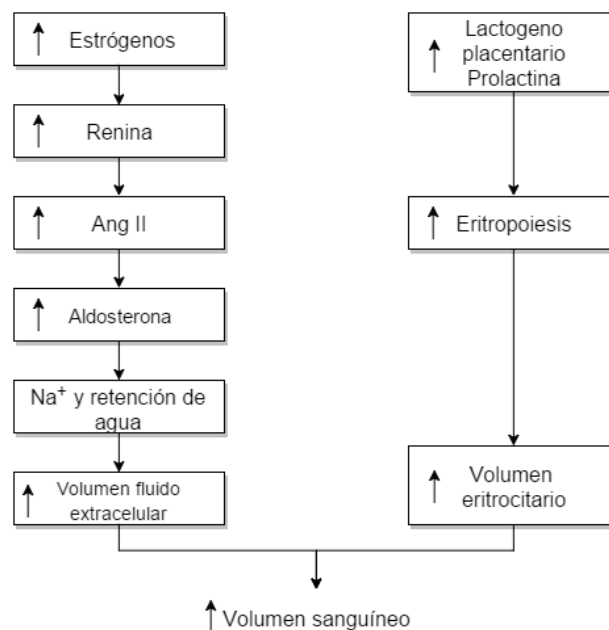


Figura 7. Posibles mecanismos de la hipervolemia asociada a gestación. (Blackburn, 2014; Elkayam & Gleicher, 1998)

El descenso en la resistencia vascular sistémica y pulmonar se acompaña de la bajada de presión sanguínea (Chapman et al., 1998; J F Clapp & Capeless, 1997). A diferencia de hembras no preñadas y de afecciones que conllevan hipertensión, las hembras gestantes normales son insensibles a varios mediadores vasoactivos. Varios de los conformantes del sistema renina-angiotensina están elevados durante la gestación pero la red vascular es insensible a la acción hipertensiva del angiotensinogeno II (Ang II), por ejemplo (Ahokas, Sibai, & Anderson, 1989; Gant, Daley, Chand, Whalley, & MacDonald, 1973; Novak & Kaufman, 1991). En ratón, la respuesta a AngII se ve reducida en un 33% en hembras gestantes (Wong et al., 2002). Estos mediadores vasoactivos podrían tener otros efectos durante la gestación y el desarrollo fetal, ya que se ha descrito que el útero y el trofoblasto presentan sus receptores (Anton et al., 2009; Hatta et al., 2011).

En ratones ocurren cambios cíclicos en la presión y en el ritmo cardiaco que podrían estar asociados con etapas críticas del desarrollo fetal (Barrette, Adams, & Croy, 2012; Burke et al., 2010). Hasta la implantación no hay cambios detectables en el ratón, después se observa un descenso en la presión sanguínea hasta la mitad de la gestación que se corresponde con la formación de la placenta inmadura (Burke et al., 2010; Rossant & Tam, 2002). Al mismo tiempo que la presión ha descendido ocurre el aumento del ritmo cardiaco. Desde el ecuador de la gestación en adelante, la presión aumenta progresivamente al mismo tiempo que la placenta madura, en el día 14 de gestación la presión retoma sus valores pre-grávidos y se mantiene así hasta el término (Burke et al., 2010). El ritmo cardiaco se ralentizara tras la primera mitad hasta alcanzar el ritmo del estado no-gestante a término. Los parámetros hemodinámicos que se han analizado en ratón vuelven a sus valores de no-gestantes transcurridas 24 horas del parto, tanto si las crías se separaban o si se les permitía lactar (Burke et al., 2010).

Cambios anatómicos

La posición del corazón en el pecho cambia durante la gestación (Figura 8). Este órgano está ligeramente rotado y su ápice se desvía hacia la izquierda. Además de la localización cardiaca, el corazón también cambia respecto a su tamaño. Debido al incremento en el volumen total de sangre durante el embarazo, el corazón de la madre se hipertrofia para hacer frente a la sobrecarga de volumen a la que está sometido. Esta hipertrofia es fisiológica y adaptativa y no conlleva riesgo para la salud materna, al contrario, le permite hacer frente al sobreesfuerzo que la gestación supone a su sistema cardiovascular. La hipertrofia cardiaca gestacional se trata más profundamente a continuación.

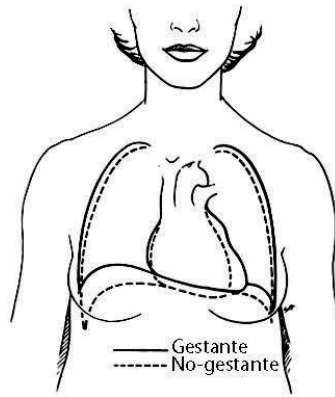


Figura 8. Cambios morfológicos del corazón y pulmones durante el embarazo. (Bonica, 1967)

La hipertrofia cardiaca gestacional además de adaptativa es reversible, y su reversión puede detectarse a los 7-14 días postparto en roedores (Iorga, Dewey, Partow-Navid, Gomes, & Eghbali, 2012; Umar et al., 2012) y en humanos este proceso puede llevar hasta un año (J F Clapp & Capeless, 1997; Robson, Hunter, Moore, & Dunlop, 1987). El tiempo que el corazón requiere para volver a su estado pre-hipertrofia depende de la lactancia y del número de gestaciones anteriores, ya que ambas causan ralentizan la reversión (J F Clapp & Capeless, 1997).

LA HIPERTROFIA CARDIACA

El corazón de los mamíferos es un músculo cuya función fundamental es la de bombear la sangre a través del sistema circulatorio para hacer llegar oxígeno y nutrientes a los órganos y transportar el dióxido de carbono de nuevo a los pulmones (Figura 9). Los diferentes sucesos o situaciones que ocurren a lo largo de la vida de los organismos requieren diferentes demandas de oxígeno y nutrientes que el corazón ha de ser capaz de cubrir.

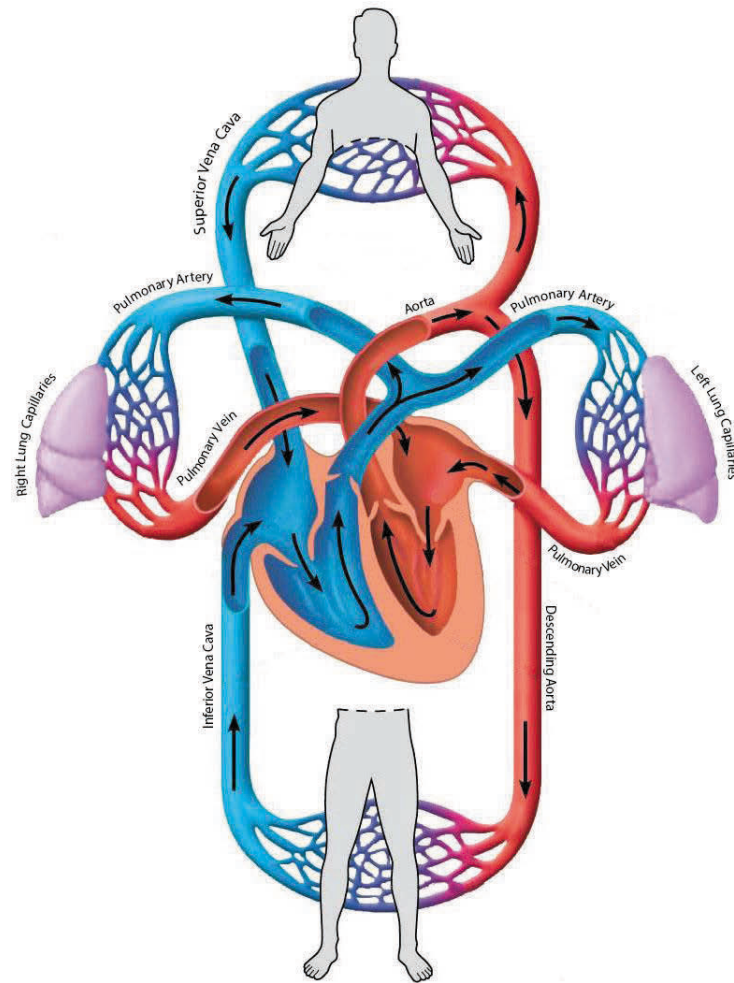


Figura 9. Esquema que muestra la función central del corazón en el sistema circulatorio

En situaciones en las que la carga de trabajo cardiaco se ve incrementada por un espacio prolongado en el tiempo, tanto por causas fisiológicas como patológicas, el corazón sufre un proceso de crecimiento denominado hipertrofia. Mediante la hipertrofia, el corazón reduce el estrés de la pared ventricular manteniendo la capacidad de bombeo o incluso aumentándola. La masa del corazón adulto se compone en su mayoría (85%) de cardiomiocitos (Nag, 1980; Popescu et al., 2006), que son las células contráctiles del corazón que se componen a su vez de una serie de unidades básicas contráctiles denominadas sarcómeros (Bernardo, Weeks, Pretorius, &

McMullen, 2010). En comparación con el resto de células que conforman el corazón (células endoteliales, fibroblastos, células inmunes y progenitoras), los cardiomiocitos de los mamíferos se diferencian totalmente poco después del nacimiento, perdiendo así casi por completo su capacidad para proliferar (Bergmann et al., 2009; Kajstura et al., 2010). Por este motivo, aunque la masa cardíaca pueda aumentar gracias a la proliferación de fibroblastos o probablemente por la actividad de células progenitoras o incluso por un *turn-over* de cardiomiocitos, el aumento de la masa del corazón sucede por la hipertrofia individual de cada célula cardíaca. El tamaño postnatal del corazón también aumenta junto con el crecimiento somático, este aumento en el tamaño cardíaco se da también por el aumento del tamaño de los cardiomiocitos (Soonpaa, Kim, Pajak, Franklin, & Field, 1996). La hipertrofia cardíaca se define por lo tanto como un fenómeno, beneficioso y adaptativo (fisiológico) o maladaptativo (patológico), que ocurre para compensar el estrés hemodinámico que resulta de la sobrecarga por volumen o presión sobre el corazón (Eghbali et al., 2005).

Característica	Hipertrofia Cardíaca Patológica	Hipertrofia Cardíaca Fisiológica
Estimulo	Enfermedad	Ejercicio aeróbico
	Sobrecarga de presión o volumen	Crecimiento postnatal
	Cardiomiopatía (familiar, vírica, diabetes, metabólica, alcohólica/tóxica)	Gestación
Morfología cardíaca	Cardiomiocitos más grandes	Cardiomiocitos más grandes
	Formación de nuevos sarcómeros	Formación de nuevos sarcómeros
	Aumento del tamaño del corazón	Aumento del tamaño del corazón
Fibrosis cardíaca	Si	No
Apoptosis	Si	No
Expresión génica fetal	Sobreexpresión de ANF, BNP, β -MHC, α -SKA	Relativamente invariable
Expresión de genes asociados con la función contráctil	Infraexpresión de SERCA2a, α -MHC	Normal o sobreexpresados
Función cardíaca	Deprimida	Normal o potenciada
Metabolismo	Menor oxidación de ácidos grasos	Mayor oxidación de ácidos grasos
	Mayor uso de glucosa	Mayor uso de glucosa
Reversible	No	Si
Asociado a insuficiencia cardíaca y mortalidad	Si	No

Tabla 3. Características de la hipertrofia patológica y fisiológica. Traducido de Bernardo et al., 2010.

La hipertrofia cardiaca ocurre en respuesta a condiciones patológicas como la hipertensión, insuficiencia valvular o el infarto de miocardio por isquemia de las arterias coronarias. Estas patologías causan el aumento crónico de trabajo sobre el corazón, lo que hace que el corazón se agrande para reducir el sobreesfuerzo sobre sus paredes. El miocardio puede también sufrir una forma adaptativa de hipertrofia cardiaca que difiere fundamentalmente de la hipertrofia patológica en que el corazón no desarrolla patología e incluso puede beneficiarse del proceso hipertrófico: la hipertrofia fisiológica. El corazón que se encuentra hipertrofiado fisiológicamente muestra signos de una mayor perfusión vascular y un mayor metabolismo. Además, las vías moleculares que dan comienzo a esta hipertrofia fisiológica son específicas a este proceso adaptativo (Bernardo et al., 2010). El aumento en el tamaño del corazón es común a ambos tipos de hipertrofia, sin embargo, sus características estructurales, funcionales, metabólicas, bioquímicas y moleculares son distintas como se resumen en la Tabla 3.

Si el estrés crónico sobre las paredes del corazón ya hipertrofiado no se resuelve, el corazón puede dilatarse afectando a su capacidad contráctil, lo que provocara insuficiencia cardiaca, ya que la fibrosis aumenta y el output cardiaco disminuye (Maillet, van Berlo, & Molkentin, 2013). La fibrosis, suele acompañar a la respuesta inflamatoria que se observa con el estrés cardiaco y comporta problemas de la función contráctil ya que inhibe la conducción eléctrica en el corazón (Bowers, Banerjee, & Baudino, 2010). La hipertrofia cardiaca suele muy frecuentemente derivar en insuficiencia cardiaca en humanos y es un determinante importante en la mortalidad y morbilidad de las enfermedades cardiovasculares. La insuficiencia cardiaca se considera una de las causas de muerte más frecuentes en las sociedades industrializadas. Actualmente no hay cura frente a la insuficiencia cardiaca y la supervivencia a largo plazo es limitada, ya que un tercio de los pacientes afectados fallecen en el primer año tras su diagnóstico (Bleumink et al., 2004; Cowie et al., 2000; McMurray & Pfeffer; Zannad et al., 1999). Es por estos motivos que varios estudios se centran en identificar los mecanismos moleculares que derivan la hipertrofia en insuficiencia cardiaca, con la intención de identificar nuevas dianas de acción y agentes terapéuticos para prevenir o revertir la hipertrofia y la insuficiencia cardiaca.

Marcadores de hipertrofia cardiaca

Hay varias maneras para poder determinar si un corazón se encuentra hipertrofiado y en qué medida lo está. El modo más directo es el de diseccionar el órgano para poder determinar su peso para luego normalizarlo por otro parámetro independiente. Clásicamente el peso corporal es el parámetro que se ha utilizado para la normalización, valor que puede fluctuar con el envejecimiento lo que puede hacer que no sea una buena referencia para normalizar el peso cardiaco (HW, *heart weight*). Otra opción es la de normalizar el HW por la longitud de la tibia (TL, *tibial length*) ya que ésta se mantiene constante durante la edad adulta (Yin, Spurgeon, Rakusan, Weisfeldt, & Lakatta, 1982).

De manera indirecta, la hipertrofia se puede determinar mediante ecocardiografía, método que permite calcular el grosor de la pared ventricular entre otros parámetros. Usualmente, es el ventrículo izquierdo el más analizado a la hora de determinar procesos hipertróficos en el corazón. El motivo es que esta cámara es la más sensible y la que antes muestra rasgos de

hipertrofia en comparación con las aurículas y al ventrículo derecho. El ventrículo izquierdo es el encargado de bombear la sangre a través de la aorta para irrigar el tronco superior y también el inferior, por lo tanto, la sobrecarga de trabajo afecta directamente a la función de esta cámara (Figura 9). Por este motivo, el grosor del ventrículo izquierdo es una medida fehaciente a la hora de determinar procesos hipertróficos.

Analizar la expresión génica del corazón en general o del ventrículo izquierdo específicamente por los motivos anteriormente descritos, es otra manera de caracterizar procesos hipertróficos. Varios son los genes marcadores de hipertrofia, estos genes codifican para proteínas involucradas en la actividad contráctil. Estos marcadores muestran una pauta de expresión casi idéntica al estado cardíaco normal en el caso de la hipertrofia fisiológica (M. Iemitsu, Maeda, Miyauchi, Matsuda, & Tanaka, 2005). En la patológica por el contrario la pauta de expresión es diferente. En la hipertrofia patológica se activa en el corazón un patrón de genes expresados muy similar a aquellos de la edad embrionaria. Los cambios de expresión se dan en las proteínas contráctiles α y β *myosin heavy chain* (α -MHC, β -MHC) y en los péptidos natriuréticos atrial (ANF, *atrial natriuretic factor*) y cerebral (BNF, *brain natriuretic factor*) (Harvey & Leinwand, 2011; Kuwahara et al., 2003).

- α -MHC y β -MHC

La α -MHC es un gen sarcomérico específico de corazón que se expresa mayoritariamente en el septo atrial del corazón adulto (Posch, Perrot, Berger, & Ozcelik, 2010). β -MHC por el contrario, también se expresa en las fibras I del músculo esquelético y en el corazón se expresa más en el ventrículo durante la etapa fetal. Los estados patológicos se han relacionado con la sobreexpresión de la isoforma β y una menor expresión de la α (Barry, Davidson, & Townsend, 2008). La miosina es el componente principal del filamento grueso del sarcómero y usa la hidrólisis del ATP para producir la fuerza de contracción. El motor de miosina actúa sobre los filamentos finos que se componen de actina y del complejo regulador troponina-tropomiosina. En estado relajado la concentración de calcio es baja y las proteínas reguladoras evitan que la miosina interactúe con la actina. En cada contracción se libera calcio del retículo sarcoplasmático al citoplasma, allí se une a la troponina permitiendo que la miosina se una a los filamentos de actina para producir una contracción. El músculo se relaja de nuevo cuando el calcio se elimina del medio (Malik et al., 2011). Las isoformas α y β de miosina se diferencian en la velocidad enzimática que poseen para hidrolizar el ATP. Un aumento de expresión en β -MHC hace que la velocidad enzimática se reduzca, lo que ralentiza la capacidad contráctil de la miosina. El ratio relativo en la expresión de estos marcadores tiene por lo tanto un impacto considerable en la función cardíaca.

- ANF y BNF

Los péptidos natriuréticos se sintetizan en el miocardio, ANF en las aurículas y ventrículos y BNF en los ventrículos principalmente (B. S. Edwards, Zimmerman, Schwab, Heublein, & Burnett, 1988; Kinnunen, Vuolteenaho, & Ruskoaho, 1993; Rodeheffer et al., 1986). Estos péptidos se encuentran altamente expresados en el corazón durante el desarrollo embrionario y en neonatos, sin embargo, en adultos sanos no (Barry et al., 2008). Estos péptidos actúan mediante la unión a sus receptores y como efecto cardiovascular tendrán la inhibición sobre la renina, la vasopresina y la aldosterona (Savoia, Volpe, Alonzo, Rossi, & Rubattu, 2010). La renina y la

aldosterona son dos componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona que regula el volumen extracelular (plasma, sangre, linfa y fluido intersticial). La renina es la enzima encargada de hidrolizar el angiotensinógeno en angiotensina, que es una hormona peptídica que causa vasoconstricción, lo que aumenta la presión sanguínea. Por otra parte la aldosterona es una hormona esteroidea muy importante en la regulación de la presión sanguínea. La aldosterona incrementa la reabsorción de agua e iones de sodio en las nefronas y hace secretar los iones de potasio, esto hace que el agua se retenga incrementando el volumen y la presión sanguínea. Por último, la vasopresina es una hormona peptídica que también contribuye al control de la presión sanguínea mediante la regulación de la resistencia vascular. La producción y secreción de ANF y BNP está regulada por complejas interacciones entre el sistema inmune y el sistema neuro-hormonal, sobre todo en los ventrículos del corazón (Akashi, Springer, Lainscak, & Anker, 2007). Se han identificado varios agonistas capaces de inducir la producción de estos péptidos natriuréticos, entre otros: endotelina 1, angiotensina II y citocinas como TNF α , IL-1 e IL-6 (Akashi et al., 2007). Los péptidos natriuréticos se secretan en el corazón frente al estrés sobre las paredes cardiacas para inducir diuresis y vasodilatación, lo que conlleva una reducción del volumen sanguíneo y una bajada de la presión. Estos factores están sobreexpresados en respuesta a aumentos de presión sanguínea transitorios y puntuales. En cardiopatías, sin embargo, la sobreexpresión es crónica (Harvey & Leinwand, 2011). Además de ser marcadores de insuficiencia cardiaca también dan información sobre la gravedad del proceso patológico (Moertl et al., 2009).

El metabolismo cardiaco también resulta informativo a la hora de estudiar procesos hipertróficos. En el corazón sano normal, la oxidación de ácidos grasos es la ruta metabólica principal responsable de generar energía (Kolwicz & Tian, 2011). Esta vía aporta el 60-70% de ATP al corazón mientras que el metabolismo de la glucosa y el lactato aporta el 30% restante (van der Vusse, Glatz, Stam, & Reneman, 1992). El corazón es capaz de cambiar de substratos metabólicos dependiendo de la carga de trabajo a la que está sometido y de la disponibilidad relativa de esas moléculas en el torrente sanguíneo (van der Vusse et al., 1992). Esta flexibilidad metabólica se considera un mecanismo adaptativo ya que permite al corazón asegurarse un aporte continuado de ATP en diferentes condiciones (reposo, ayuno, ejercicio) (Rimbaud et al., 2009).

La hipertrofia cardiaca patológica se caracteriza metabólicamente por una disminución en la oxidación de ácidos grasos a favor del metabolismo de la glucosa (Figura 10) (Allard, Schönekeess, Henning, English, & Lopaschuk, 1994; Christe & Rodgers, 1994; Dávila-Román et al., 2002). Esta inversión en el substrato metabólico podría ser un mecanismo de protección al permitir al corazón generar más ATP por molécula de oxígeno consumida (van Bilsen, van Nieuwenhoven, & van der Vusse, 2008). Cuando la hipertrofia patológica se prolonga, el corazón muestra también un descenso en el consumo de glucosa ya que se convierte en resistente a la insulina. Este proceso avanzará hasta que el corazón no sea capaz de producir suficiente ATP (Neubauer, 2007). Esta inversión metabólica al consumo de glucosa es la misma situación que se da durante el desarrollo cardiaco fetal (John J Lehman & Kelly, 2002). En los fetos, la disponibilidad de oxígeno es limitada y el metabolismo y el transporte de ácidos grasos no es posible. Esto se debe a la falta de carnitina y a que las enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos no están maduras aún. Por este motivo la glucosa es el substrato principal que usa el corazón del feto para generar ATP (Ostadal, Ostadalova, & Dhalla, 1999).

La hipertrofia cardiaca fisiológica sin embargo, se caracteriza por un mayor uso de ácidos grasos si cabe y también de la glucosa (Figura 10) (Gertz, Wisneski, Stanley, & Neese, 1988; Rimbaud et al., 2009).

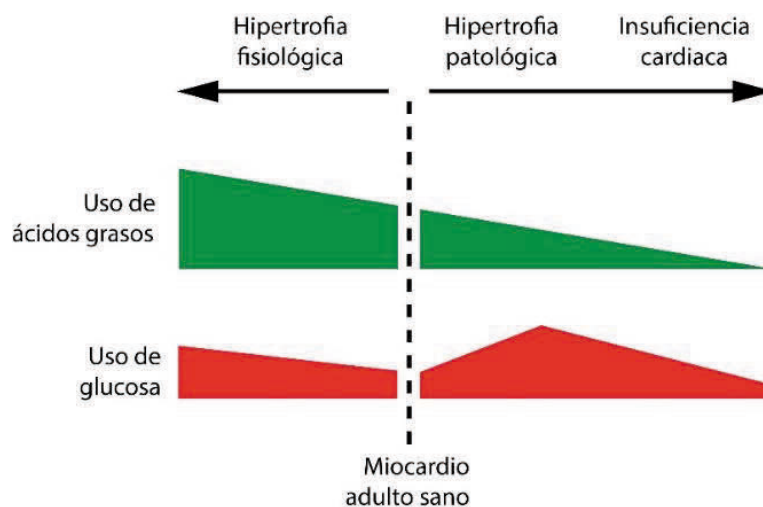


Figura 10. Alteraciones en el uso de sustrato en las hipertrofias cardiacas fisiológicas y patológicas. (Bernardo et al., 2010; John J Lehman & Kelly, 2002).

Las hipertrofias cardiacas patológicas y fisiológicas pueden a su vez sub-clasificarse como concéntricas o excéntricas en función de la forma o la geometría que el corazón y los cardiomiocitos adoptan tras hipertrofiarse (Figura 11) (McMullen & Jennings, 2007).

- **Hipertrofia concéntrica**

Si el estímulo pro-hipertrofico causa un aumento de la presión se producirá un aumento del estrés sobre las paredes del corazón sistólico. Este efecto conlleva la aparición de la hipertrofia concéntrica que se caracteriza por un corazón con paredes gruesas y cavidades relativamente pequeñas (Grossman, Jones, & McLaurin, 1975). Los cardiomiocitos individuales tienden a crecer más a lo ancho que a lo largo (lo que disminuye el ratio largo/ancho). Los estados patológicos que dan lugar a este tipo de hipertrofia por un aumento de la presión son la hipertensión crónica y la estenosis aortica o valvular por ejemplo. La hipertrofia concéntrica fisiológica ocurre con la práctica de ejercicio isométrico o estático, como el levantamiento de peso, donde se desarrolla tensión muscular contra una resistencia (el peso) con poco movimiento. Estas prácticas causan un aumento de presión sobre el corazón, que desarrollará una forma menos severa de hipertrofia concéntrica fisiológica (Pluim, Zwinderman, van der Laarse, & van der Wall, 2000; Radovan Zak & Hort, 1985).

- **Hipertrofia excéntrica**

Por el contrario, cuando el sobreesfuerzo al que se somete el corazón se debe a un aumento en el volumen, el estrés se padece sobre las paredes cardiacas diastólicas. Esto dará lugar a la hipertrofia cardiaca excéntrica, caracterizada por cavidades grandes y dilatadas con paredes relativamente finas (Grossman et al., 1975; Pluim et al., 2000). Los cardiomiocitos se

hipertrofiarían preferencialmente de manera longitudinal. La regurgitación aortica y las fistulas arteriovenosas son ejemplos de patologías donde ocurre esta sobrecarga de volumen en el corazón. Los estímulos fisiológicos que llevan a la hipertrofia excéntrica son la gestación y el ejercicio isotónico (correr, caminar, montar en bicicleta, nadar) por ejemplo, que requiere el movimiento de grandes grupos musculares. Con la práctica de estos deportes ocurre una profunda vasodilatación de la musculatura esquelética que hace que el retorno venoso al corazón aumente (Pluim et al., 2000; Radovan Zak & Hort, 1985). Esto sobrecarga el corazón en volumen y produciendo la hipertrofia fisiológica excéntrica, con cavidades amplias y paredes de grosor proporcional al agrandamiento. Los cardiomiocitos crecen tanto a lo largo como a lo ancho. Los estudios clínicos apuntan a que la hipertrofia patológica excéntrica supone un riesgo mayor que la hipertrofia patológica concéntrica (Berenji, Drazner, Rothermel, & Hill, 2005).

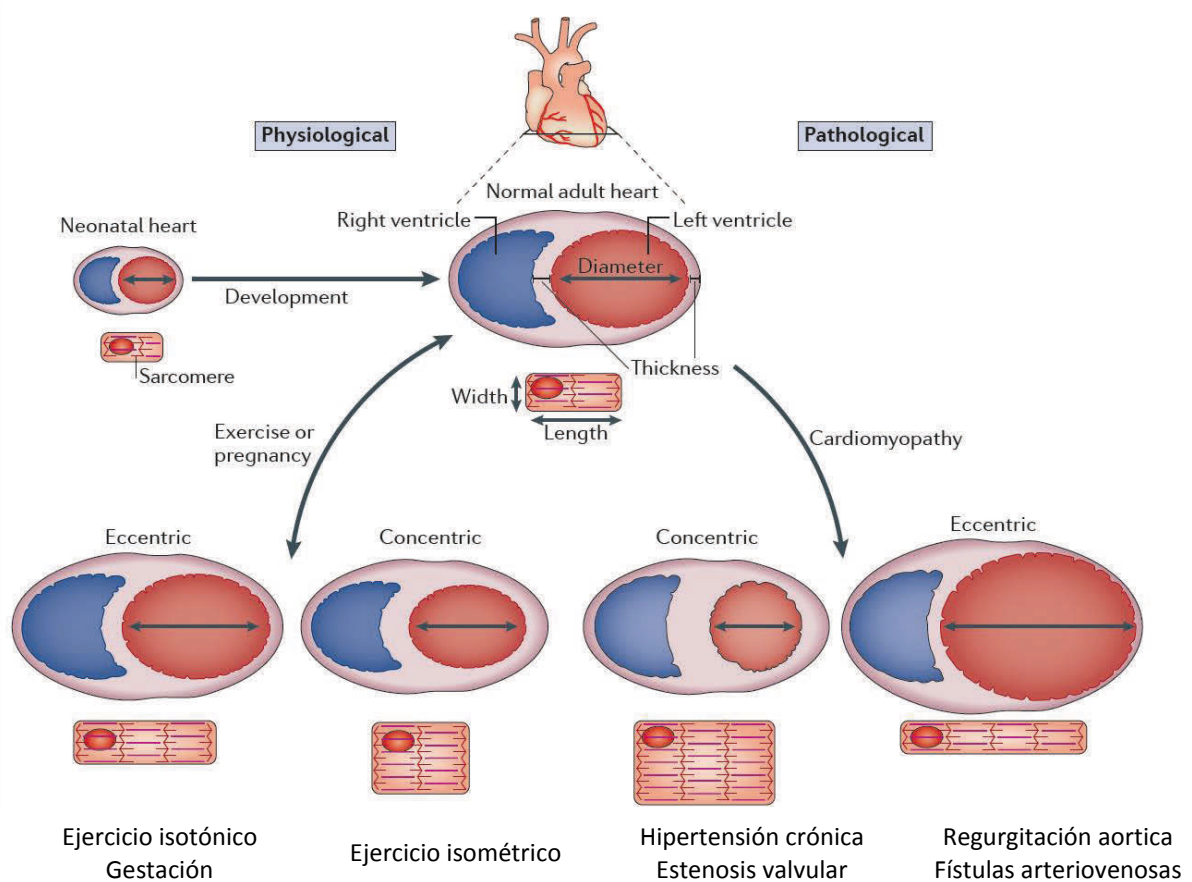


Figura 11. Geometrías de la hipertrofia cardíaca. Imagen que muestra la remodelación que el corazón y los sarcómeros sufren tras los estímulos prohipertróficos (Maillet et al., 2013).

Estímulos desencadenantes de la hipertrofia cardiaca

Los dos principales estímulos que provocan la respuesta hipertrófica patológica son el estrés mecánico y los factores neurales/humorales (Ritter & Neyses, 2003). Estos estímulos activan vías de señalización intracelulares que tienen como consecuencia la alteración en el conjunto de genes que se expresan y por consiguiente en la síntesis de proteínas. Estos cambios en la expresión génica son los responsables de la aparición de la hipertrofia cardiaca, cuyas 3 características más notorias son el incremento del tamaño de los cardiomiocitos, la reexpresión de genes cardiacos fetales y la reorganización de los sarcómeros. Como ya se ha mencionado anteriormente, se observa también un importante cambio en el metabolismo cardiaco, ya que el substrato mayoritario pasa a ser la glucosa en lugar de los ácidos grasos, situación que también se observa en el metabolismo cardiaco fetal (van Bilsen, van der Vusse, & Reneman, 1998).

Estas señales de estrés causantes de la hipertrofia si se mantienen de una manera prolongada en el tiempo, pueden hacer que la patología progrese hasta la insuficiencia cardiaca. Al alcanzarse esta situación, el corazón es incapaz de bombear suficiente sangre para mantener la demanda energética del organismo. Este último proceso se caracteriza por una respuesta apoptótica masiva en el corazón (Eric N Olson, 2004).

Receptores de estrés biomecánico

Además de la activación de vías de señalización mediante unión de ligando-receptor (tratado en el punto siguiente) la hipertrofia puede iniciarse ya que los cardiomiocitos detectan directamente la deformación o el estrés mecánico sobre ellos mismos gracias a un aparato sensorial interno. Los mecanosensores son parte del proceso fundamental por el cual la fuerza mecánica a la que el corazón está sometido se convierte en señales bioquímicas (Figura 12). En los cardiomiocitos, las fuerzas mecánicas extracelulares, intracelulares o intercelulares (cambios en la presión, volumen, rigidez, etc) son detectadas por proteínas transductoras especializadas (Heineke & Molkentin, 2006). Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática, en complejos de adhesión focales o intracelularmente a lo largo de la línea Z del sarcómero donde se hallan proteínas mecanosensoras. Estos sistemas activan después las vías de señalización que inician el proceso hipertrófico (Maillet et al., 2013).

Los canales receptores de potencial transitorio o TRP (*transient receptor potential*) presentes en todos los tipos celulares pueden hacer las veces de mecanosensores frente a la tensión permeabilizando la membrana para el calcio y otros cationes (Patel et al., 2010). El flujo de calcio que se produce tras la estimulación por el estrés mecánico da lugar a la transcripción pro-hipertrófica mediante las vías de señalización *downstream* de calcineurina-NFAT (Musarò, McCullagh, Naya, Olson, & Rosenthal, 1999). La subfamilia TRP canónica (TRPC) se compone de los miembros TRPC3, TRPC6 y TRPC7 por una parte, que se activan por el diacilglicerol (DAG) que se genera por la señalización de los receptores acoplados a proteína G. Los miembros TRPC1, TRPC4 y TRPC5 se activan también por DAG y cuando la concentración de calcio citoplasmático disminuye. Los miembros TRPC1, -4, -5 y -6 se activan además por la tensión y por consiguiente participarían en el aparato mecanosensor que da pie a la activación de vías de señalización intracelulares que dan lugar a hipertrofia cardiaca. La implicación de TRPC1 y -6 con la hipertrofia

cardiaca se ha podido probar (Maroto et al., 2005; Seth et al., 2009; Spassova, Hewavitharana, Xu, Soboloff, & Gill, 2006). Otro tipo de receptores de membrana que pueden llevar a cabo la transducción del estrés mecánico son los receptores del tipo 1 de la angiotensina II, que más comúnmente se relacionan con la generación de la respuesta hipertrófica en respuesta a factores neurales/humorales. Este receptor está en contacto directo con la cinasa Janus-2 (JAK-2), que induce la translocación de proteínas G al citoplasma en respuesta a la tensión mecánica. Esto da lugar a la activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) que como fin tendrán la respuesta hipertrófica (Y. Zou et al., 2004).

Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos (con subunidades α y β) que unen el matriz extracelular con el citoesqueleto intracelular y median por lo tanto en la mecanotransducción (R. S. Ross & Borg, 2001; Robert S Ross, 2002). Las integrinas se unen a la fibronectina, colágeno o laminina, componentes del matriz extracelular (Figura 12). El extremo citoplasmático de la subunidad β puede transmitir información sobre la composición básica y la tensión del matriz extracelular mediante proteínas de señalización que residen en el complejo de adhesión focal dentro de la célula. Estos complejos asociados a integrinas se componen de tirosina cinasas no asociadas a receptor, como cinasas de adhesión focal (FAK, *Focal adhesión kinase*) o cinasas asociadas a integrinas (ILK, *Integrin-linked kinase*), que llaman a proteínas de señalización como las GTPasas RHO y RAS, PI3K y la proteína cinasa C (PKC). La ablación de ILK causa cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca en el corazón de ratones (White et al., 2006), mientras que la delección de FAK causa hipertrofia excéntrica y fibrosis (Peng et al., 2006). La delección específica en corazón de *Itgb1* (que codifica para la subunidad $\beta 1$) o la ablación global de *Itgb3* (que codifica para la subunidad $\beta 3$) hace que la patología hipertrófica producida por aumento de presión sea aún peor (Johnston et al., 2009; Shai, 2002). La melusina, una molécula que interacciona con las integrinas se ha descrito como sensora del estrés mecánico en los cardiomiocitos con la capacidad de inactivar por fosforilación la glicógeno sintasa cinasa 3β (GSK- 3β), intermediario de la señalización hipertrófica (Brancaccio et al., 2003). La delección de la melusina conlleva por lo tanto patología cardiaca al verse la señalización antes mencionada impedida.

Por último, está el aparato mecanosensor situado a lo largo de la línea Z, que es el lugar de anclaje de los filamentos finos sarcoméricos (Figura 12). Este enclave se ha asociado también a la mecanotransducción y la detección del estrés mecánico a través de un amplio conjunto de proteínas estructurales entre las que se encuentran la proteína muscular LIM (MLP, también conocida como CSRP3), la teletonina, la miopaladina, la paladina, cifer o LDB3, la proteína LIM asociada a actinina (ALP o PDLIM3), la proteína repetida cardiaca ankirina (CARP o ANKRD1), la ankirina, la nebullette y la obscurina. La deficiencia o mutación en alguna de estas proteínas está asociada con cardiomiopatía (Cox, Umans, Cornelis, Huylebroeck, & Zwijsen, 2008; Knöll et al., 2002; Linke, 2008). La MLP transduce la señal mecánica a través de la vía de señalización calcineurina-NFAT (Heineke et al., 2005) y su ablación es deletérea ya que destruye la arquitectura citoesquelética causando cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca (Arber et al., 1997). La titina es otra proteína candidata para ejecutar acciones mecanotransductoras. Su situación estratégica, se sitúa entre bandas Z, hace que interactúe con más de 20 proteínas sarcoméricas encargadas de notar la extensión y flexión, y provee soporte estructural directo

regulando la distensión del sarcómero. Además, mutaciones en la titina en humanos causan cardiomiopatía dilatada (Herman et al., 2012).

Existen por lo tanto varios sistemas que muy posiblemente regulan la hipertrofia adaptativa mediante un mecanismo que detecta directamente el aumento de trabajo en los propios cardiomiocitos.

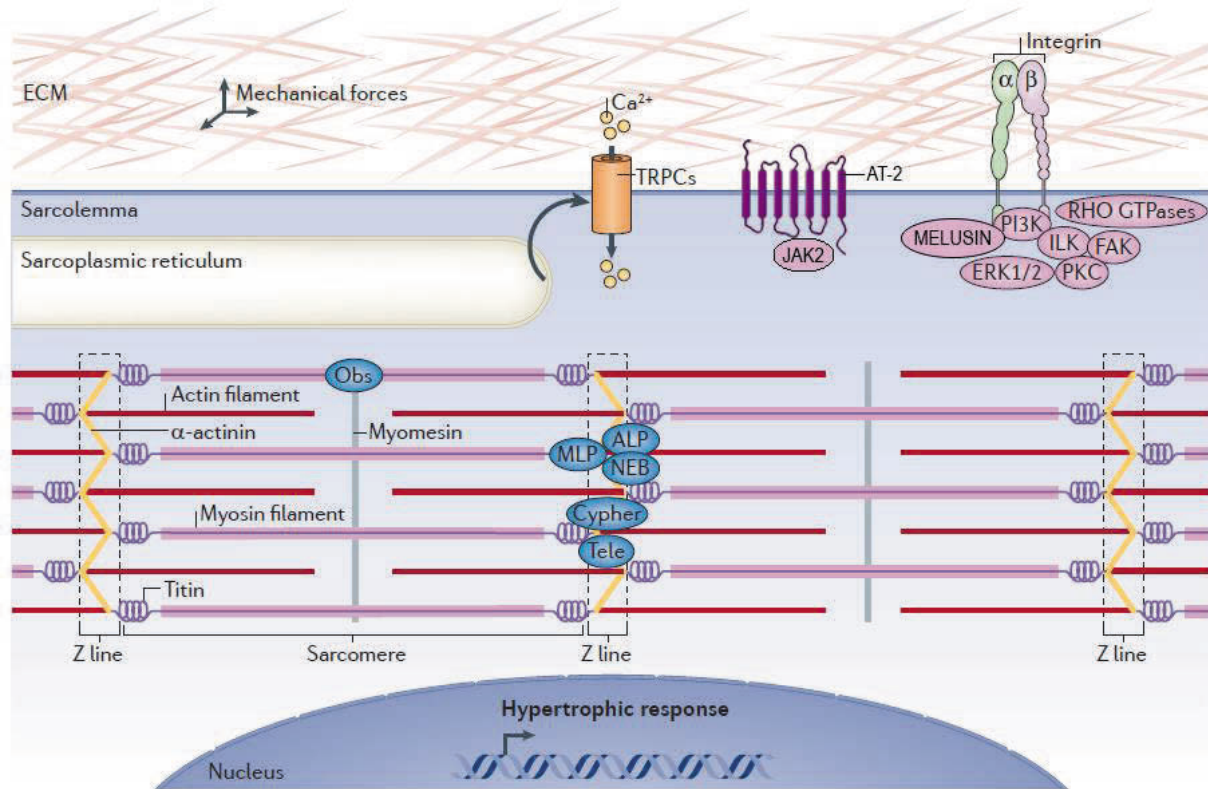


Figura 12. Maquinaria mecanosensora que da comienzo a la respuesta hipertrofica adaptativa. La mecanotransducción convierte las fuerzas mecánicas en señales bioquímicas. En este diagrama se muestran los 3 compartimentos del sistema mecanosensor: 1) El situado en la membrana plasmática y compuesto por los canales receptores de potencial transitorio canónicos (TRPC) y el receptor de tipo 2 de la angiotensina (AT-2). 2) Los complejos de adhesión focal asociados a integrinas. 3) Los intracelulares situados a lo largo de la línea Z sarcomérica. (Harvey & Leinwand, 2011; Heineke & Molkenin, 2006; Maillet et al., 2013).

Vías de señalización implicadas en la aparición de la hipertrofia cardiaca.

La respuesta hipertrófica se inicia después de la aparición del estrés mecánico, por el incremento de la presión o del volumen sanguíneo, sobre las paredes del corazón. Este estrés mecánico afecta a todas las células cardiacas (cardiomiocitos, fibroblastos, células vasculares). Todas ellas responden a este estímulo activando vías de señalización intracelulares que acaban provocando la hipertrofia y también la secreción de factores autocrinos y paracrinos como la angiotensina II (ANGII), las catecolaminas o interleucinas. Estos estímulos mecánicos y neurohumorales son los que generan la respuesta hipertrófica del corazón (Tarone & Lembo, 2003).

Existen un gran número de vías de señalización intracelulares involucradas en la respuesta hipertrófica cardiaca. Cada molécula implicada no es exclusiva de una sola vía, sino que se intercomunican, añadiendo así más complejidad (Figura 13). Este es el motivo por el cual los mecanismos que dan lugar a la hipertrofia cardiaca no están del todo claros.

En las próximas páginas las vías de señalización implicadas en la respuesta hipertrófica del corazón que se detallan son las siguientes:

1. Receptores acoplados a proteína G
 - 1.1 Señalización a través de $G\alpha$
 - 1.1.1 A través de $G\alpha_q$
 - 1.1.2 A través de $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$
 - 1.2 Señalización a través de $G\beta\gamma$
2. PI3K/Akt/GSK-3 β
3. Calcineurina/NFAT
4. La vía de las MAPK
 - 4.1 Señalización a través de ERK
 - 4.2 Señalización a través de p38 y JNK
5. NF- κ B (*Nuclear factor κ B*)
6. Estrógenos

1. Receptores acoplados a proteína G

Los receptores acoplados a proteína G o GPCR (*G-protein coupled receptors*) son una familia de receptores de membrana que tienen un papel muy importante en la regulación de la función cardíaca en respuesta a las vicisitudes a las que los organismos se enfrentan (Rockman, Koch, & Lefkowitz, 2002). Estos receptores están formados por una estructura de siete hélices transmembrana con dominios intracelulares acoplados a proteínas G específicas formadas por tres subunidades: α , β y γ . Mientras el complejo de proteína G se encuentra inactivo, la subunidad α se encuentra unida a guanosin difosfato (GDP), a su vez el dímero $\beta\gamma$ estabiliza esta conformación. Al unirse un ligando al receptor ocurre un cambio conformacional en la proteína G de manera que la subunidad α pierde afinidad por GDP. El estado activo de la subunidad $G\alpha$ comienza al intercambiar el GDP por GTP (guanosin trifosfato), esto hace que $G\alpha$ se disocie del resto del complejo. Tanto $G\alpha$ como $G\beta\gamma$ son capaces de activar de manera independiente diferentes vías de señalización intracelular. Existen a su vez tres tipos de proteínas $G\alpha$: $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_i$, que activan diferentes respuestas celulares (Jalili, Takeishi, & Walsh, 1999).

Dentro de la familia de receptores acoplados a proteína G se encuentran los receptores adrenérgicos (α - y β -adrenérgicos), los receptores de la angiotensina y los de la endotelina-1 (ET-1). Los receptores adrenérgicos responden a la acción de las catecolaminas endógenas (adrenalina y noradrenalina) que se liberan por el sistema nervioso simpático. Ambos tipos de receptores adrenérgicos son capaces de responder a las mismas catecolaminas pero la respuesta diferirá dependiendo del tipo de proteína $G\alpha$ (s, q, i) que tenga acoplada. Es por esta razón que el tipo de respuesta que se producirá se determina por la cantidad y el tipo de receptor predominante de un tejidoc(Brodde & Michel, 1999). En el corazón predominan los receptores β -adrenérgicos, siendo el ratio frente a los α -adrenérgicos de 10:1 en el caso de humanos (Rockman et al., 2002). Las alteraciones en las vías de señalización de los receptores α y β adrenérgicos están asociadas a la aparición de hipertrofia cardíaca.

1.1 Señalización a través de $G\alpha$

1.1.1 A través de $G\alpha_q$

Los receptores α -adrenérgicos, el receptor de la angiotensina y el de la endotelina-1 están acoplados a la proteína G_q . Se ha demostrado que la estimulación a través de sus ligandos o moléculas agonistas específicas, como la fenilefrina (FE) para los receptores α -adrenérgicos, es suficiente para provocar hipertrofia cardíaca (Nicol, Frey, & Olson, 2000).

Como se ha mencionado antes, al activar el GPCR por uno de sus ligandos, la proteína G se disocia en $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. Cada una de las subunidades es capaz de activar por sí sola vías de señalización diferentes. En concreto, $G\alpha_q$ activa la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidinositol bifosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Este último se une a sus receptores situados en la membrana del retículo sarcoplasmático provocando la salida de Ca^{2+} al citosol. El calcio liberado se une a la proteína cinasa C (PKC) provocando su translocación a la membrana plasmática. Una vez allí, la PKC se activa por los DAG previamente liberados. Al activarse es capaz de fosforilar factores de transcripción que controlan la expresión de genes pro-hipertróficos como C-jun y Fos (Shubeita, Martinson, Van Bilsen, Chien, & Brown, 1992).

1.1.2 A través de $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha i}$

Los receptores β -adrenérgicos son el subtipo predominante en corazón y por lo tanto son los principales reguladores de la función cardíaca en respuesta a catecolaminas. Existen tres subtipos diferentes de receptores β -adrenérgicos: β_1 , β_2 y β_3 , siendo el β_1 el más presente en el corazón (75-80% del total de receptores β) (Rockman et al., 2002). Los tres subtipos tienen acoplada la proteína G_s , el subtipo β_2 puede tener también asociado la proteína G_i (Daaka, Luttrell, & Lefkowitz, 1997). La subunidad $G_{\alpha s}$ activa la adenilato ciclasa, responsable de incrementar los niveles de cAMP que finalmente activan a la proteína cinasa A (PKA). La PKA fosforila canales de Ca^{2+} en el interior de la célula (Rockman et al., 2002). Por el contrario, cuando el receptor β_2 se encuentra acoplado a $G_{\alpha i}$, sucede la inactivación de la adenilato ciclasa que a su vez inactiva PKA, lo que provoca la reducción del flujo de Ca^{2+} intracelular.

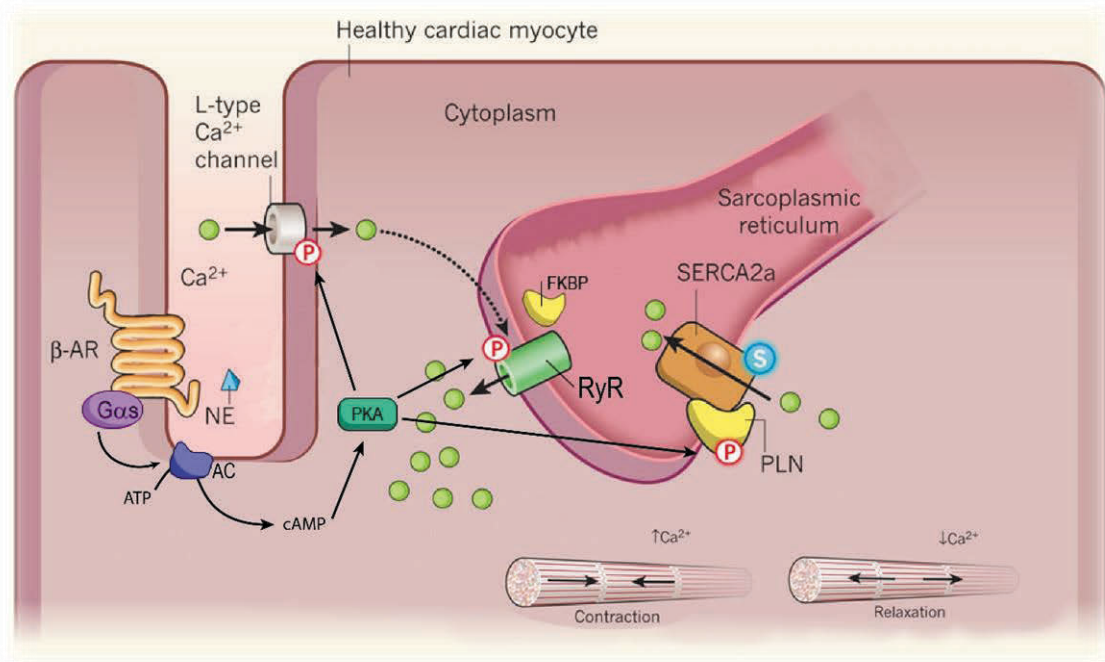


Figura 14. Imagen que muestra la señalización a través de $G_{\alpha s}$ en el proceso de la regulación de la actividad contráctil. Modificado de Kho et al., 2011.

El calcio controla tanto el crecimiento del corazón como la actividad contráctil (Figura 14). Varias patologías están asociadas a anomalías en el ciclo del calcio. Durante cada latido del corazón, el calcio entra al cardiomiocito a través de los canales de calcio de tipo L. El incremento del calcio intracelular hace que se libere el calcio del retículo sarcoplásmico a través del receptor de la rianodina (RyR), lo que aumenta la concentración del calcio libre intracelular hasta 10 veces (Bers, 2002). La unión del calcio a la troponina C del filamento fino de los sarcómeros inicia la contracción muscular (sístole). El retorno del calcio al interior del retículo sarcoplásmico por medio de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) provoca la relajación muscular (diástole). La habilidad de SERCA para bombear el calcio al interior del retículo sarcoplásmico

depende de su interacción con el fosfolambano (PLN), una proteína situada en la membrana del retículo sarcoplasmático (Schmidt, Edes, & Kranias, 2001). En estado no-fosforilado, el PLN inhibe la entrada de calcio a través de SERCA. La PKA es la encargada de fosforilar el fosfolambano, permitiendo así la entrada del calcio al retículo y por ende la relajación cardíaca (Shenoy & Rockman, 2011). Además, SERCA ha de estar sumoílizada para permitir que bombee eficientemente el Ca^{2+} dentro del retículo (Figura 14). En estado patológico, la enzima encargada de esta modificación, la SUMO1, no se encuentra presente, lo que supone que SERCA no este sumoílizada. Esto hace que pierda la capacidad de unirse a ATP y no pueda bombear eficientemente el calcio, impidiendo la correcta relajación muscular (Kho et al., 2011). La PKA fosforila también RyR provocando su disociación de la proteína FKBP (*FK-binding protein*), hecho que estabiliza el canal incrementando su afinidad al calcio (Marx et al., 2000).

Cuando el corazón padece algún daño, se produce la activación de la PKA y como consecuencia la fosforilación del fosfolambano. Este estado provoca un aumento de la función contráctil debido a que se incrementa la actividad de SERCA y por lo tanto se acumula más Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplasmático. Si bien la activación de los receptores β -adrenérgicos por medio del sistema simpático permite aumentar la frecuencia cardíaca como respuesta fisiológica compensatoria y adaptativa, la activación crónica es deletérea (Rockman et al., 2002). El incremento perpetuado de catecolaminas puede iniciar o acelerar la patología cardiovascular ya que desencadenan la insuficiencia cardíaca, que se caracteriza por una disminución de la función de los receptores β -adrenérgicos. Esta disminución se debe tanto a la reducción en el número de receptores como a su funcionalidad, estado que se denomina desensibilización (Bristow et al., 1982).

1.2 Señalización a través de $G\beta\gamma$

Existen diferentes mecanismos que dan lugar a la desensibilización: fosforilación del receptor por PKC o PKA, disminución de la síntesis o incremento de la degradación del mRNA codificante del receptor o por medio de la subunidad $G\beta\gamma$ disociada tras la estimulación por parte del agonista de los receptores acoplados a proteína G (Barki-Harrington, Perrino, & Rockman, 2004).

Como consecuencia de la activación de $G\beta\gamma$ las cinasas de los GPCR o GRK fosforilan el receptor haciendo posible su unión a β -arrestina. Esta proteína lleva a cabo la internalización del receptor o endocitosis del GPCR (desensibilización), pero también permite la unión de diferentes elementos que activaran vías de señalización intracelular como la de las MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), la calcineurina o la fosfatidinositol 3 cinasa (PI3K) que acaban provocando hipertrofia cardíaca (Rockman et al., 2002).

2 PI3K/Akt/GSK-3 β

Como se ha descrito antes, la subunidad $G\beta\gamma$ que se libera después de la activación del receptor GPCR es capaz de activar la fosfatidinositol 3-cinasa (PI3K), enzima que presenta actividad lípido-cinasa tanto como proteína-cinasa. Esta enzima está implicada en muchas funciones celulares, principalmente en el crecimiento, supervivencia y proliferación celular (Cantley, 2002).

Los receptores GPCR pueden activar esta enzima al igual que los receptores tirosina-cinasa (TKR) y la proteína monomérica Ras (Frey & Olson, 2003).

Existen tres subtipos de PI3K, pero en corazón solo la clase I se expresa. A su vez el subtipo I se divide en dos isoformas diferentes; I_A e I_B. La PI3K- I_A es la que se activa en respuesta a estímulos fisiológicos como el ejercicio, que actúa a través de la activación de los receptores tirosina cinasa y que acaban dando lugar a la hipertrofia cardiaca fisiológica. La isoforma PI3K- I_B se activa mediante los receptores GPCR por el incremento de la presión mecánica y este estímulo acaba generando hipertrofia patológica (Oudit et al., 2004). Aunque parece que ambos subtipos señalizan a través de vías similares no está claro que diferencias son las que llevan a desarrollar un fenotipo tan diferenciado (Oudit et al., 2004).

La actividad lipídica-cinasa de la PI3K cataliza la adición de grupos fosfatos a la posición 3 del anillo del fosfatidinositol (PtdIns) para generar PtdIns(4)P, PIP₂ e IP₃ (Naga Prasad, Perrino, & Rockman, 2003). El papel que la actividad proteína cinasa tiene en la regulación de la transducción de la señal por parte de PI3K no se conoce. Uno de los productos de la actividad enzimática de la PI3K es la IP₃ que es capaz de translocar la proteína cinasa B (PKB o Akt) a la membrana plasmática donde será fosforilada, y como consecuencia activada, por una cinasa dependiente de PtdIns, la PDK1 (Vlahos, McDowell, & Clerk, 2003). La PDK1 es también de activar por fosforilación otras proteínas como la PKC o la cinasa p70S6 (p70S6K), también implicados con la aparición de la hipertrofia cardiaca (Toker & Newton, 2000).

La anteriormente mencionada Akt es una proteína serina/treonina cinasa que controla diferentes tipos de respuestas celulares como la inhibición de la apoptosis o la regulación de la proliferación celular, el metabolismo y la hipertrofia (Hanada, Feng, & Hemmings, 2004). Es capaz de regular una gran cantidad de sustratos entre los que incluyen la glicógeno sintasa cinasa 3β (GSK-3β), la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), c-Raf, diferentes efectores antiapoptóticos del citoplasmáticos, mitocondriales y nucleares y mTor (*mammalian target of rapamycin*) (Oudit et al., 2004). mTor activa la cinasa p70S6 y eIF4E, que provocan un incremento en la síntesis proteica, característica observable durante la hipertrofia cardiaca (Schmelzle & Hall, 2000).

Otro de los sustratos de la Akt, la GSK-3, es otra serina/treonina cinasa que inicialmente se describió como inhibidora de la síntesis de glicógeno a través de la fosforilación de la glicógeno sintasa (Embi, Rylatt, & Cohen, 1980), pero se ha visto que regula también otros procesos. Su actividad se controla mediante diferentes mecanismos, entre ellos la inactivación por fosforilación. La Akt fosforila a la GSK-3β en la posición serina 9 inactivándola. Siendo la Akt sustrato de la PI3K, los estímulos que activen esta última inhiben la GSK-3β mediante la Akt (Hardt & Sadoshima, 2002). La estimulación β-adrenérgica activa la Akt inhibiendo GSK-3β en cardiomiocitos (Morisco et al., 2000). Otros estímulos hipertróficos como los receptores acoplados a proteína Gαq y el receptor Fas también inhiben la GSK-3β (Badorff et al., 2002; S Haq et al., 2000). La inhibición de la GSK-3β hace que esta no pueda ejercer sus funciones de inhibición de la hipertrofia, por lo que el agrandamiento tendrá lugar.

La GSK-3β ejerce sus funciones de inhibición de la hipertrofia a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos, es la fosforilación de diferentes factores de transcripción hipertróficos como la NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) y GATA4 (Hoeflich et al., 2000), que provoca su salida

del núcleo consiguiendo así un descenso de la transcripción génica. De manera contraria, cuando hay un estímulo pro-hipertrófico, se reduce la fosforilación de estos factores de transcripción favoreciendo su localización intranuclear y estimulando la expresión de genes que conllevan hipertrofia (Morisco et al., 2001). Además de la transcripción, GSK-3 β también puede regular la traducción de proteínas y la organización del citoesqueleto (Hardt & Sadoshima, 2004).

3 Calcineurina/NFAT

La calcineurina es una serina/treonina fosfatasa que se activa con el incremento de la concentración de calcio citoplasmático (J D Molkentin et al., 1998). Cuando la concentración de calcio citoplasmático es alta, la proteína adaptadora calmodulina (CaM) se une a la calcineurina, activando la enzima (E N Olson & Williams, 2000). La calcineurina desfosforila factores de transcripción de la familia NFAT, provocando su translocación al núcleo y activando así la transcripción de genes pro-hipertróficos (Figura 15) (Wilkins & Molkentin, 2004). Se ha demostrado que la activación de la vía calcineurina-NFAT es suficiente y necesaria para que se desarrolle hipertrofia cardíaca (J D Molkentin et al., 1998; Wilkins et al., 2002). Los estímulos hipertróficos, como los α - y β -adrenérgicos o el ejercicio hacen que se incremente la actividad de la calcineurina (Vega, Bassel-Duby, & Olson, 2003).

La señalización de la calcineurina-NFAT se controla también por medio de cinasas específicas que directamente fosforilan el dominio regulador N-terminal de NFAT antagonizando así su localización nuclear y disminuyendo la transcripción génica pro-hipertrófica. Estas cinasas capaces de fosforilar NFAT en cardiomiocitos son la anteriormente mencionada GSK-3 β , y las cinasas activadas por mitógenos p38 y JNK, de las que se trata en el punto siguiente (Antos et al., 2002; Braz et al., 2003; Liang et al., 2003). Otra proteína que interactúa y modula la actividad de la calcineurina es la MCIP (*modulatory calcineurin-interactin protein*). Experimentos de sobreexpresión de esta proteína inhibían la hipertrofia cardíaca frente a diferentes estímulos (Hill et al., 2002; Rothermel et al., 2001). Sin embargo, niveles fisiológicos de expresión tienen la función opuesta ya que la MCIP facilita la acción de la calcineurina estabilizando las subunidades proteicas a ser desfosforiladas (Sanna et al., 2006; Vega, Rothermel, et al., 2003). Los factores natriuréticos atrial y cerebral (ANF y BNP, respectivamente) de los que sea hablado antes, también son capaces de inhibir la translocación nuclear de NFAT. Estos factores activan diferentes tipos de guanil ciclasas, que generan cGMP (guanil monofosfato cíclico), molécula que activa PKGI (*cyclic GMP-dependent protein kinase-I*), que fosforila NFAT. La activación de la PKGI mediante la inhibición del catabolismo de cGMP evitó la aparición de hipertrofia cardíaca patológica en ratones a los que se les había practicado ligamiento de la aorta (Takimoto et al., 2005; Wollert et al., 2002). De modo similar, la sobreexpresión de PKGI en cardiomiocitos en cultivo redujo el crecimiento hipertrófico (Fiedler et al., 2002).

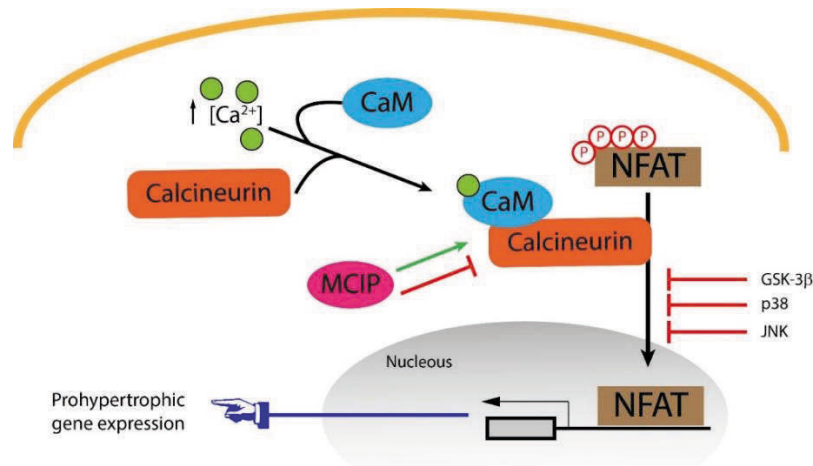


Figura 15. Esquema de la vía de señalización calcineurina-NFAT modificado de Heineke & Molkentin, 2006.

Parece que tanto la estimulación de la calcineurina como la inhibición de la GSK-3 β son fundamentales para inducir hipertrofia cardíaca aunque la vía predominante dependería del tipo de estímulo hipertrófico. Por ejemplo, en el caso de estímulos β -adrenérgicos, la inhibición de GSK-3 β parece ser la principal frente a la activación por calcineurina, mientras que en la estimulación α -adrenérgica los dos mecanismos tendrían la misma importancia (Hardt & Sadoshima, 2002).

4 La vía de las MAPK

La vía de las MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) representan otro complejo sistema de señalización que participa en el proceso hipertrófico del corazón (Figura 16). Proporcionan un importante vínculo entre los estímulos externos y el núcleo a través de la fosforilación de una variedad de factores de transcripción. La cascada de las MAPK se organiza en tres niveles, las MAPK son fosforiladas y activadas por las MAPKK (*Mitogen activated protein kinase kinase*), que a su vez son fosforiladas y activadas por las MAPKKK (*Mitogen activated protein kinase kinase kinase*). Las MAPKKK se activan por interacción con las MAPKKK cinasas (MAPKKKK) o mediante las proteínas pequeñas unidas a GTP (small GTPases) como Ras, entre otras proteínas cinasas, que conectan los receptores de superficie celular con esta vía de señalización (Figura 16) (Garrington & Johnson, 1999).

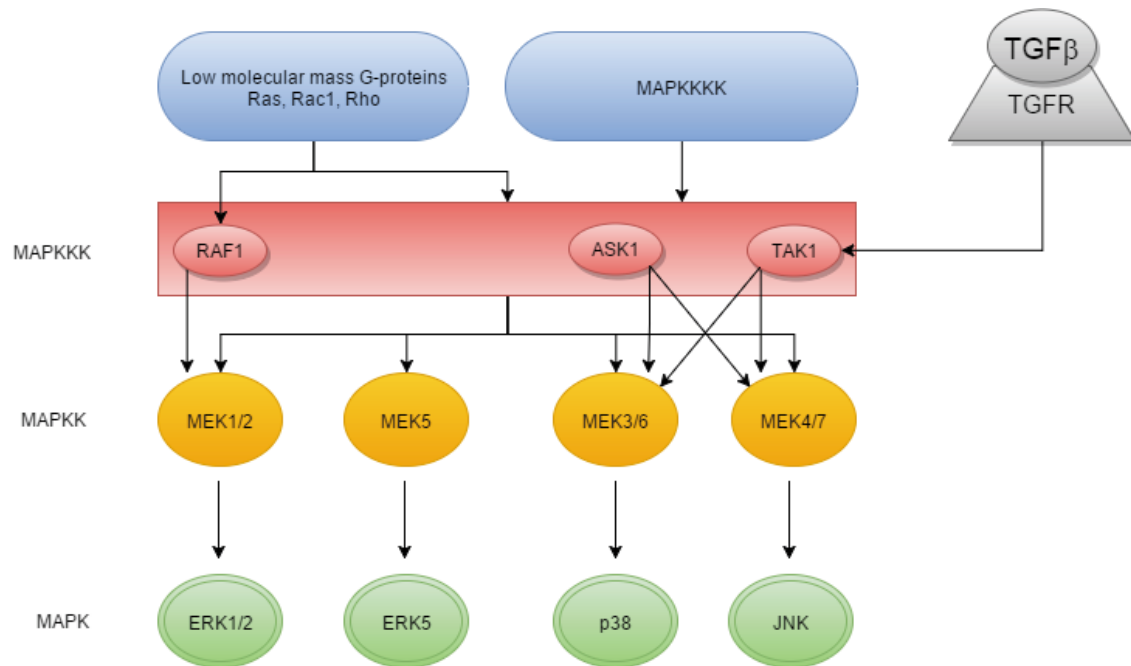


Figura 16. Esquema de la cascada de señalización de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Existen tres subfamilias de MAPKs: ERKs (*Extracellular signal-regulated kinase*), JNKs (*c-Jun N-terminal kinase*) y p38 MAPKs (Garrington & Johnson, 1999). La subfamilia ERK está más especializada en transducir señales que se producen por estimulación de factores de crecimiento o agentes mitogénicos, mientras que las JNK o p38 MAPK se activan preferentemente en respuesta a señales de estrés celular o de daño (Garrington & Johnson, 1999). La cascada de señalización de las MAPKs se activa mediante los GPCRs, receptores tirosina cinasas (receptores de IGF-1 y factores de crecimiento de fibroblastos), receptores serina/treonina (factor de crecimiento transformador β , TGF- β), cardiotrofina-1 (receptor gp130) y por estímulos de estrés (P. H. Sugden & Clerk, 1998). Las p38, JNKs y ERKs activados fosforilan un sinnúmero de dianas intracelulares que incluyen varios factores de transcripción que inducen la reprogramación de la expresión génica hipertrófica. A pesar de que las tres subfamilias ejercen un papel regulador sobre la hipertrofia en cardiomiocitos, parece que los ERK serían los responsables de la respuesta pro-hipertrófica mientras que JNK y p38 actuarían de manera antagónica sobre el crecimiento cardíaco (Jeffery D Molkenin, 2004).

4.1 Señalización a través de ERK

La importancia de la señalización de las MAPK ERK en el contexto cardíaco se conoció en el 2000. La expresión de MEK1 activo en corazón activaba específicamente a ERK1/2, lo que causaba a los ratones el desarrollo de una hipertrofia concéntrica estable con pocos signos de histopatología o fibrosis celular (Bueno et al., 2000). Este fenotipo se asemeja a una hipertrofia compensatoria como la observada en la hipertrofia concéntrica ligada a la práctica de ejercicio isométrico, que puede no acabar en insuficiencia cardíaca. Mecánicamente, la señalización MEK1-ERK1/2

produce la hipertrofia *in vivo* en parte aumentando la capacidad transcripcional de NFAT, lo que indica una interacción entre esta MPAK y la vía calcineurina/NFAT (Sanna, Bueno, Dai, Wilkins, & Molkentin, 2005). A pesar de que MEK1-ERK1/2 induzcan el fenotipo fisiológico *in vivo*, la sobreexpresión del regulador *upstream* Ras, promueve la aparición de cardiomiopatía, mostrando signos de remodelación ventricular patológica y muerte prematura. La fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2) se expresa ubicuamente y genera ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Esta encima inhibe la activación de Ras, ya que impide la señalización *downstream* que ocurre con la activación de receptores tirosina cinasa, impidiendo la propagación de la señal. La delección genética de cPLA2 en ratones provoca hipertrofia del miocardio, tanto a nivel basal como tras la inducción por estrés de una manera dependiente al ácido araquidónico, que es capaz de incrementar la señalización llevada a cabo por IGF-I (Syed Haq et al., 2003). Ras activa directamente RAF1, que activa a su vez MEK1-ERK1/2, pero puede sin embargo activar también la rama de las cinasas MAP JNK, la PI3K y otras vías de señalización intracelular (J D Molkentin & Dorn, 2001). Es por este motivo que los defectos cardiacos que se observan asociados a la activación constitutiva de Ras sean probablemente independientes de la vía MEK1-ERK1/2. A menudo es complejo discriminar entre los efectos de una vía de señalización, la duración de la señal y el potencial de sinergias adversas cuando se trata de vías que confluyen paralelamente y se intenta clasificar un estímulo como adaptativo o maladaptativo. La sobreexpresión de Ras es claramente maladaptativa, pero aún se desconoce si el fenotipo que provoca se ocasiona por medio de una sola vía de señalización o si más están implicadas, no pudiendo descartar tampoco que la duración de la señal u otros factores intervengan en la respuesta hipertrófica.

4.2 Señalización a través de p38 y JNK

Al contrario de lo que ocurre con la sobreexpresión de MEK1 y MEK5 en corazón, la sobreexpresión de formas activas de MEK3 o MEK6 producía de forma uniforme la activación de p38 pero sin inducir hipertrofia cardiaca en ratones transgénicos (Liao et al., 2001). Los ratones desarrollaban sin embargo insuficiencia cardiaca caracterizada por una menor actividad funcional, fibrosis y paredes ventriculares finas (Liao et al., 2001). La p38 puede también ser regulada mediante TAK1 (*TGFβ activated kinase-1*), que se activa también al unirse TGFβ (*Transforming growth factor β*) a su receptor TGFR. Esta activación genera de igual modo cardiomiopatía al sobreexpresarse TAK1 en corazones de ratón (D. Zhang et al., 2000). La inhibición de esta vía de señalización mediante el uso de dominantes negativos de MEK3, MEK6 o p38α también promueve el agrandamiento cardiaco basal y tras la estimulación por sobrecarga de presión mediante la vía calcineurina/NFAT (Braz et al., 2003). Este hecho va en consonancia con la tendencia a padecer mayor hipertrofia a causa del aumento de presión en ratones que sobreexpresan el dominante negativo de p38β (S. Zhang et al., 2003) y en los KO condicionales de p38α cardiacos (Nishida et al., 2004). En referencia a la cinasa JNK y a su vía de señalización se conoce que la sobreexpresión cardiaca mediante transgénesis en ratones de MEK7 activo produce una activación específica de la JNK junto con un fenotipo de cardiomiopatía letal juvenil pero sin hipertrofia, similar a la que se obtiene en los ratones con mayor actividad de p38 (Petrich et al., 2002; Petrich, Molkentin, & Wang, 2003). La inhibición de la JNK endógena mediante el uso de dominantes negativos en el

corazón o mediante el uso de ratones KO para *Jnk1* o *Jnk2* promovía un aumento cardíaco basal y tras estimulación por aumento de presión de un modo dependiente de la calcineurina-NFAT (Liang et al., 2003). Algunos estudios describen que la señalización JNK tiene acciones positivas sobre la supervivencia celular (Tachibana et al., 2006), mientras que otros describen lo contrario, ya que ratones carentes de *Jnk1* o *Jnk2* mostraban menos muerte celular en corazones tras daños de isquemia-reperfusión (I/R) (Kaiser et al., 2005). La inhibición de la actividad JNK no solo afecta la respuesta hipertrófica cardíaca, sino que también afecta la supervivencia celular de una manera dependiente al estímulo.

Los mecanismos mediante los cuales p38 y JNK actúan para inducir cardiopatía han de ser aun determinados, sin embargo, estas cinasas son capaces de regular negativamente la respuesta hipertrófica al poder fosforilar NFAT y reducir así la señalización por calcineurina. Es posible también que la activación de estas cinasas por estrés altere la respuesta hipertrófica como consecuencia indirecta de su capacidad para inducir apoptosis y necrosis en los cardiomiocitos. Su activación conllevaría el desarrollo de una cardiopatía secundaria y dilatación independiente de calcineurina-NFAT.

El uso de las MAPK como diana terapéutica contra enfermedades humanas podría ser de gran interés. La inhibición farmacológica de la vía MEK1-ERK1/2 podría disminuir los aspectos beneficiosos asociados a la hipertrofia compensatoria adaptativa. Por otro lado la inhibición de p38 y/o JNK podría desencadenar una respuesta hipertrófica maladaptativa a largo plazo.

5 NF- κ B (*Nuclear factor κ B*)

El factor nuclear κ B (NF- κ B) es un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo que regula la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria, la apoptosis y el crecimiento celular (Hacker & Karin, 2006). Se trata de un heterodímero formado principalmente por dos subunidades, p65 y p50. En situaciones normales, NF- κ B se localiza en el citoplasma celular, donde se mantiene inactivo por medio de la unión de p65 a proteínas represoras como las I κ B (*inhibitor of κ B*) (α y β) (Jacobs & Harrison, 1998). La unión de las proteínas inhibidoras (I κ B) a la subunidad p65 enmascara el motivo de señalización nuclear (NLS, *Nuclear localization signal*), secuestrando a NF- κ B en el citoplasma (Régnier et al., 1997). Varias vías activan NF- κ B, pero la mayoría de ellas convergen en la cinasa I κ B (IKK) encargada de la fosforilación de las proteínas I κ B. Al ser fosforiladas, se disocian dejando el motivo visible, lo que hace que el factor se transloque al núcleo permitiendo así la transcripción de un gran número de genes (Karin, 1999a; Mercurio et al., 1997). Entre los genes que se expresan por medio de NF- κ B se encuentra MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*) que desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria y la apoptosis.

Estudios realizados en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales han demostrado que la activación de NF- κ B es fundamental para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, ya que si la activación de esta vía no ocurre, la respuesta hipertrófica no tiene lugar (Kawano et al., 2005). Otros estudios realizados *in vivo* concluyen lo mismo (Freund et al., 2005; Y. Li et al., 2004). Los agonistas de los GPCRs o citosinas como el TNF α (*Tumor necrosis factor α*) entre otros, son capaces de activar NF- κ B a través de diferentes vías de señalización (Palomer et al., 2015), algunas de las cuales no están aún del todo esclarecidas.

Como se ha dicho anteriormente, la estimulación de los GPCRs provoca la activación de la PKC y la movilización del calcio intracelular. Por un lado, uno de los subtipos de la PKC, la PKC β , es capaz de fosforilar la IKK provocando la activación de NF- κ B (Moscat, Diaz-Meco, & Rennert, 2003), por otro lado, el incremento de calcio puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). La producción de ROS activa la cinasa MAP ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), que activa NF- κ B mediante vías de señalización como JNK o p38, inhibiendo además las I κ B (Hirotani et al., 2002). El resultado final de estos dos procesos es la activación de NF- κ B con la consiguiente aparición de hipertrofia cardiaca.

Por otro lado, citosinas como la TNF α están implicadas en los procesos inflamatorios posteriores a la aparición de la insuficiencia cardiaca. En un principio, la secreción de estas moléculas se atribuía al sistema inmune, aunque recientemente se ha observado que en el caso de TNF α también los cardiomiocitos pueden producirla (Mann, 2002). TNF α es de hecho inductora de hipertrofia cardiaca (Nakamura et al., 1998), se ha demostrado además que es la responsable de la hipertrofia subyacente en los pacientes a los que se les trasplanta el corazón (Stetson et al., 2001). Cuando TNF α se une a su receptor TNFR, se da la activación de NF- κ B mediante la llamada de la cinasa que induce NF- κ B o NIK (*NF- κ B inducing kinase*) que activará mediante fosforilación a IKK que a su vez fosforilará a I κ B desasociándola del complejo NF- κ B permitiendo así su activación (Hayden & Ghosh, 2004; Karin, 1999b). Además de mediante este mecanismo TNF α parece ser capaz también de inducir hipertrofia mediante la producción de ROS y la consiguiente activación de NF- κ B (Higuchi et al., 2002). Otras citosinas como la IL1 β y toxinas bacterianas como el lipopolisacarido (LPS), después de interactuar con sus receptores de membrana (IL-1 β y CD14/TLT4 respectivamente) son también capaces de producir respuesta hipertrófica (Takano et al., 2000).

Por último, tanto los GPCRs como el TNF α activan también la vía de señalización PI3K-Akt-GSK3 β de la que se ha hablado antes, que al igual es responsable de activar NF- κ B. Frente a un estímulo hipertrófico se produce la fosforilación de Akt, la cual es capaz de interactuar y fosforilar IKK provocando así la activación de la vía NF- κ B (Hanada et al., 2004). Además, la inactivación de GSK-3 β evita la fosforilación de p105 (precursor de la subunidad p50), hecho que hace que se transforme en p50 de manera constitutiva haciendo que haya más NF- κ B disponible (Demarchi, Bertoli, Sandy, & Schneider, 2003). Otras evidencias muestran que Akt y GSK-3 β son capaces de fosforilar directamente NF- κ B, lo que permite que la subunidad p65 pueda unirse al DNA de manera más eficiente junto a los co-activadores como CBP/p300 que facilitan el inicio de la transcripción génica pro-hipertrófica (Hoeflich et al., 2000).

6 Estrógenos

El estrógeno (E2) se considera una de las hormonas más importantes, si no la más importante, en las hembras de los mamíferos ya que cumple funciones en la reproducción, en el sistema inmune, a nivel vascular y en el sistema nervioso (Prossnitz & Barton, 2009). Varios estudios han mostrado como el desarrollo de la hipertrofia fisiológica inducida por deporte se da de una manera diferente en función del sexo (De Bono, 2005; Foryst-Ludwig et al., 2011; Konhilas et al., 2004). Las hembras muestran una mayor hipertrofia frente a los machos tanto si se les aplica un protocolo de ejercicio o si el ejercicio realizado es voluntario. Además las hembras poseen una mayor capacidad que los machos para el ejercicio, lo que sugiere que el dimorfismo sexual en cuanto a la respuesta cardiaca se refiere estaría establecido por las diferencias en las distancias recorridas. Teniendo esto en cuenta, al normalizar la respuesta hipertrófica con la distancia recorrida, las hembras seguían mostrando una hipertrofia del ventrículo izquierdo mayor. Esto muestra un dimorfismo sexual real en la función hipertrófica del corazón. Además, el estudio realizado en el 2005 por Foryst-Ludwig et al. demostraron como los genes involucrados en la captación de ácidos grasos y en su oxidación estaban más incrementados en hembras que en machos sujetos al mismo protocolo de ejercicio. Estos datos demostraron que las diferencias hipertróficas que se observan en función del sexo están asociadas a los cambios en la disponibilidad y uso de substratos metabólicos.

El estrógeno se sintetiza principalmente en los ovarios, de donde se libera al torrente sanguíneo (Prossnitz & Barton, 2009). La respuesta fisiológica a la señalización por estrógeno se da cuando esta hormona se une a los receptores celulares (Dennis et al., 2009), entonces comienza la activación de varias vías de señalización y se modifica la interacción de proteínas (Figura 17). Los receptores de estrógeno clásicos y por ello los más estudiados son el *Estrogen receptor α* (ER- α) y el *Estrogen receptor β* (ER- β). Estos dos receptores funcionan como factores de transcripción nucleares activados por ligando, esto es, una vez el estrógeno se une al receptor este se internaliza para unirse a elementos de respuesta situados en los promotores de los genes a expresar. Además de estos dos receptores existe un tercero, denominado GPR30 (*G protein-coupled receptor 30*) o GPER (*G protein-coupled estrogen receptor 1*), que como su nombre indica, esta acoplado a la proteína G y puede mediar en la señalización no-genómica inducida por estrógeno. Los tres receptores activan vías de señalización similares, por lo que GPER puede estimular también la adenilato ciclasa, la transactivación de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, la activación de MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) y la vía de PI3K (*phosphotidyl inositol 3 kinase*) (Ariazi et al., 2010). Varios estudios han demostrado que el estrógeno puede unirse y por lo tanto activar cualquiera de los tres receptores, lo que denota una falta de especificidad entre ellos (Prossnitz & Maggiolini, 2009).

El estrógeno se ha considerado durante muchos años un agente cardioprotector ya que las mujeres pre-menopáusicas tienen un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares que los hombres (Deschamps & Murphy, 2009). Esta protección desaparece en las mujeres post-menopáusicas, ya que el riesgo de padecer patologías cardiovasculares iguala o incluso supera al riesgo de los hombres. Es más, siendo las enfermedades cardiovasculares la causa más frecuente de muerte tanto en mujeres como en hombres, en mujeres es más frecuente (49%) que en hombres (40%) (según datos europeos en 2015) (Townsend, Nichols, Scarborough, & Rayner, 2015).

Los estudios en animales han permitido comprobar los efectos anti-hipertroficados del estrógeno en corazón. Al tratar con estrógenos hembras de ratón ovariectomizadas a las que se les había producido hipertrofia por una sobrecarga de presión por constricción de la aorta transversal (TAC), se conseguía un 30% de reducción en la hipertrofia frente a las no tratadas (van Eickels et al., 2001). Siguiendo el mismo protocolo, pero produciendo la hipertrofia con un tratamiento de angiotensinogeno II (AngII), la reducción de la hipertrofia por acción del estrógeno era del 51% (Pedram et al., 2008). La acción del estrógeno en la protección frente a la hipertrofia se da mediante el ER- β , ya que el estrógeno apenas tuvo efecto en los ratones KO para el receptor ER- β comparado con los ratones WT o KO para ER- α . El mismo tratamiento de AngII inducía un cambio en la síntesis de la cadena pesada de miosina, de la isoforma α a la β . Este cambio se veía también inhibido por la acción del estrógeno a través de ER- β . La activación de ERK mediante AngII también se inhibe por estrógenos mediante ER- β . El tratamiento de estrógenos estimula la producción de BNF, que previene sustancialmente la fibrosis cardiaca intersticial ventricular (la deposición de colágeno) que provoca la AngII. Aún más importante, el estrógeno inhibe la actividad de la calcineurina que AngII promueve, estimulando la expresión génica y proteica de MCIP (*modulatory calcineurin-interacting protein*). Las acciones que el estrógeno lleva a cabo a través del ER- β son capaces de mitigar la señalización de AngII, que produce hipertrofia cardiaca y fibrosis en los ratones hembra (Pedram et al., 2008).

La cardiomiopatía inducida por estrés (SCM, *stress-induced cardiomyopathy*) se genera por medio de la señalización β -adrenérgica. Los altos niveles de epinefrina hacen que el receptor β_2 cambie su acoplamiento a la proteína G de la subunidad $G_{\alpha s}$ a $G_{\alpha i}$ (R. Liu, Ramani, Soto, De Arcangelis, & Xiang, 2009). La señalización β -adrenérgica asociada a $G_{\alpha i}$ se ha determinado como la causante de SCM en dos modelos de rata (Paur et al., 2012; Shao et al., 2013). La observación de que el 90% de los afectados por esta patología sean mujeres menopaúsicas hace pensar que la falta de estrógenos estaría detrás de este fenómeno. Cao et al. han demostrado en el 2015 como el tratamiento de estrógenos a ratas ovariectomizadas mejora el fenotipo causado por SCM. Estos efectos ocurren gracias a que los estrógenos disminuyen la concentración de catecolaminas en plasma e incrementan la actividad de la vía de señalización β_2 AR- $G_{\alpha s}$ protegiendo el miocardio.

La activación de GPER por medio de estrógenos, el agonista específico G1 o el tamoxifeno estimula la producción de cAMP mediante señalización por proteínas G como se ha explicado antes (Figura 17). La activación de este receptor que principalmente se localiza intracelularmente también produce movilización del calcio (que a su vez activa calcineurina y la vía NFAT) y la c-Src, una tirosina cinasa no unida a receptor que funciona como molécula señalizadora. La c-Src activa metaloproteasas (MMP) de la membrana plasmática que procesan el pro-HB-EGF (pro-factor de crecimiento epidermal unido a heparina) para generar HB-EGF que es capaz de activar los receptores de membrana de EGF (EGFR) que a su vez activan también las vías PI3K/Akt y MAPK con los consiguientes efectos no-genómicos (X) o genómicos mediante la regulación de la transcripción génica (Figura 17). Entre los efectos genómicos cabe destacar que la señalización de los estrógenos induce la expresión de ANF y BNF, y cuando la señalización ocurre mediante el ER- β se inhibe la producción de colágeno por un lado y por otro se sintetiza la proteína MCIP1 a través de la activación de PI3K (Pedram et al., 2008). La MCIP1, como se ha mencionado antes, puede inhibir la actividad de la calcineurina.

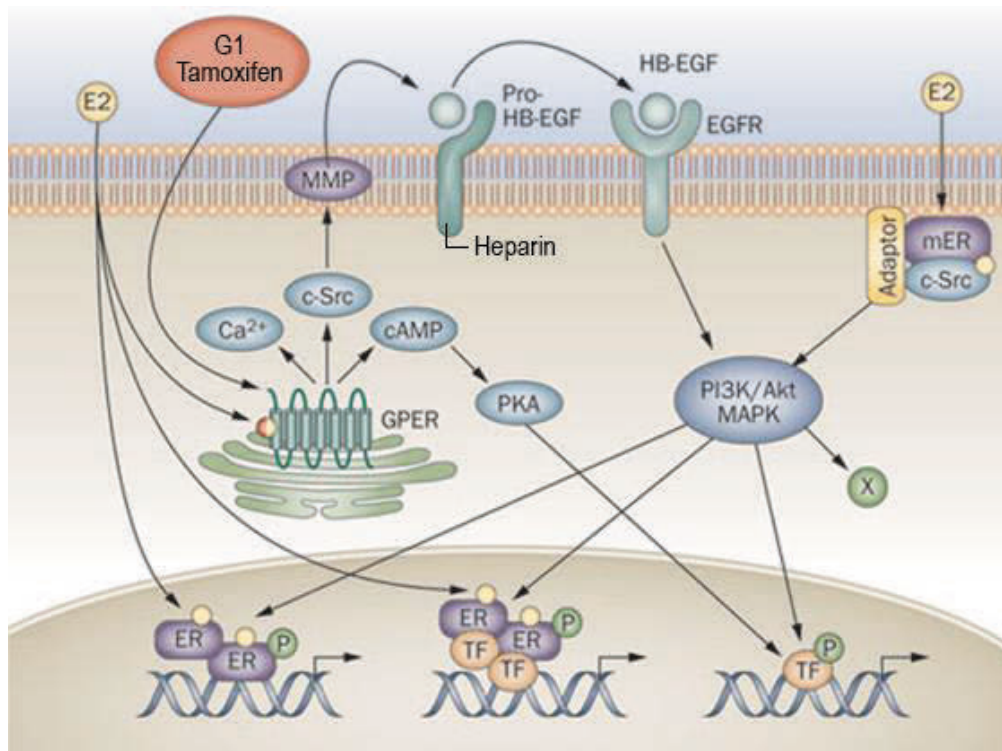


Figura 17. Vías de señalización no-genómicas y genómicas del estrógeno. Modificado de Prossnitz & Barton, 2011. X, efectos no-genómicos.

La activación del receptor GPER también se ha demostrado protector frente a daños producidos por isquemia-reperfusión sobre el corazón de manera independiente al sexo (Deschamps & Murphy, 2009). La activación del receptor GPER mediante el uso del agonista G-1 (que presenta afinidad por este receptor solamente) resultó ser protector. Los corazones pre-tratados con el agonista presentaban una menor disfunción contráctil post-isquémica que los no pre-tratados y de igual manera el área infartada era menor. Estas observaciones se daban tanto en ratas hembras como en machos, ya que los niveles de GPER presentes en el miocardio de ambos sexos son similares. El uso del agonista G-1 induce la activación de Akt y ERK1/2. La coadministración de wortmannina (inhibidor de la PI3K) bloquea la acción protectora del G-1. Estos datos muestran cómo la activación del GPER por G-1 mejora la recuperación funcional y reduce el área de infarto tras I/R de un modo dependiente de la PI3K pero independiente al sexo (Deschamps & Murphy, 2009; Prossnitz & Barton, 2011).

Conocer los mecanismos a través de los cuales el estrógeno ejerce sus efectos protectores en el corazón resulta de gran importancia.

Hipertrofia cardiaca fisiológica

Las señales bioquímicas que determinan los procesos hipertroáficos están bien caracterizadas, no por ello es fácil agrupar estas señales en causantes de hipertrofia fisiológica o de hipertrofia patológica con las consecuencias pertinentes (ver Tabla 3). A grandes rasgos y de manera ampliamente aceptada, la hipertrofia patológica se desencadena por la señalización ocasionada por las hormonas neuro-endocrinas endotelina 1 y angiotensina II. La hipertrofia fisiológica por el contrario, viene dada cuando la activación de la señal pro-hipertrofica se da por medio de otros ligandos, como la hormona tiroidea, insulina, hormona de crecimiento e *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) (Figura 18) (Heineke & Molkentin, 2006; Maillet et al., 2013).

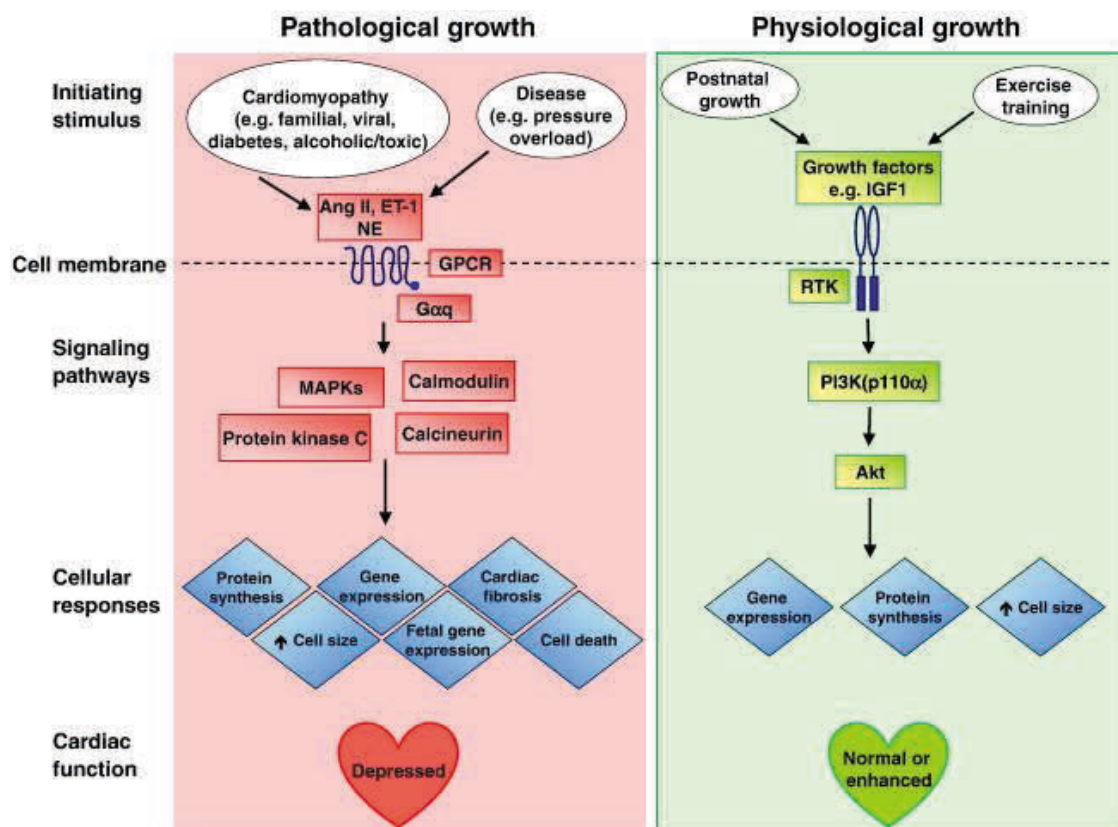


Figura 18. Esquema simplificado de la hipertrofia patológica y fisiológica. Se muestran las diferencias más representativas, como los estímulos causantes y las vías de señalización, la respuesta celular y el consiguiente efecto sobre la función cardíaca (Bernardo et al., 2010).

En el caso de corazones de atletas profesionales, los niveles de IGF-1 sí están incrementados, mientras que los de endotelina-1 o angiotensina II, no (Neri Serneri et al., 2001). Los factores de crecimiento endoteliales (VEGFs) también afectan la hipertrofia fisiológica. El crecimiento postnatal del corazón se impide en ratones KO para el gen codificante de este factor (Bellomo et al., 2000), y al sobreexpresarlo, se consigue el desarrollo de hipertrofia cardiaca con una función cardíaca normal y cardiomiocitos hipertrofiados proporcionalmente (Bry et al., 2010; Karpanen et al., 2008). Otro miembro de la subfamilia VEGF es factor de crecimiento placentario (PGF), que

como su nombre indica, la placenta expresa durante la gestación a pesar de expresarse también en otros tejidos. El PGF se encuentra sobrepresado en respuesta a daños cardíacos en humanos y también por cardiomiocitos en cultivo bajo condiciones de hipoxia. Esto último ocurre en pacientes que sufren cardiomiopatía isquémica o sufren un infarto de miocardio agudo. La expresión transgénica del PGF de manera sistémica o la inyección directa de la proteína en corazones de rata hace que la angiogénesis y la perfusión tras un infarto de miocardio aumenten, teniendo el PGF así un rol protector. PGF es necesario para que los insultos cardíacos como la carga de trabajo por presión hagan responder a las células endoteliales y fibroblastos residentes del corazón. Al padecer el corazón un daño, por sobrecarga de presión por ejemplo, se produciría un aumento de PGF que afectaría a las células endoteliales y fibroblastos que secretarían a su vez otros factores paracrinos con el fin de estimular y favorecer los cardiomiocitos (Accornero et al., 2011). La sobrepresión de PGF ocurre frente a un daño cardíaco y solo se ha asociado al contexto de hipertrofia patológica. En la gestación por el contrario, este factor ya se encuentra sobrepresado basalmente y muy recientemente se ha relacionado también con las adaptaciones cardiovasculares sistémicas que ocurren en la madre durante el embarazo (Aasa et al., 2015).

El ejercicio como estímulo desencadenante de hipertrofia cardíaca fisiológica tal vez sea el modelo más estudiado y conocido, no por ello el único. El crecimiento cardíaco postnatal también se produce por hipertrofia fisiológica al perder los cardiomiocitos la capacidad para proliferar casi por completo tras nacer. La hipertrofia posprandial que se observa en pitones es también un nuevo modelo fisiológico en estudio (Riquelme et al., 2011). Además de estos dos ejemplos existe la hipertrofia fisiológica gestacional, que ocurre en hembras gestantes debido al aumento de trabajo al que el corazón ha de hacer frente y que es el modelo de estudio central de esta tesis.

Hipertrofia cardíaca gestacional

Durante la gestación se da un aumento prolongado de sobrecarga de volumen debido al incremento del volumen sanguíneo materno que produce hipertrofia (Longo, 1983). Este incremento de trabajo por volumen se asemeja a aquel que ocurre con la práctica de ejercicio isotónico, pero mientras que la gestación es un proceso continuo, el deporte es intermitente. Durante la gestación ocurren también importantes cambios en los niveles de hormonas sexuales esteroideas (McCormack & Greenwald, 1974; Murr, Stabenfeldt, Bradford, & Geschwind, 1974; Virgo & Bellward, 1974). En ratones, los niveles circulantes de progesterona se elevan desde el segundo día de gestación, fluctuando a lo largo de los aproximadamente 20 días de la gestación. La progesterona es capaz de inducir síntesis proteica en el corazón (Goldstein, Sites, & Toth, 2004) y de causar hipertrofia de los cardiomiocitos (Chung, Yeung, & Leinwand, 2012). El patrón de la concentración del estrógeno estradiol es distinto al de la progesterona, además, como se ha mencionado con anterioridad, tiene efectos anti-hipertroficantes (van Eickels et al., 2001). El estradiol es indetectable en hembras de ratón no gestantes y los niveles aumentan progresivamente hasta hacerse significativamente altos en la etapa tardía de la gestación (Chung, Yeung, et al., 2012; McCormack & Greenwald, 1974). La gestación de ratones se caracteriza entre otras cosas también por la disminución de la expresión cardíaca del canal de potasio Kv4.3. La administración de estrógenos a ratones hembra ovariectomizadas conseguía el mismo efecto

sobre la expresión de estos canales (Eghbali et al., 2005). La contribución que las alteraciones de las hormonas sexuales durante la gestación aportan al desarrollo de la hipertrofia es inequívoca.

La hipertrofia patológica causada mediante estimulación prolongada con isoproterenol (agente agonista β -adrenérgico) (D. R. Murray, Prabhu, & Chandrasekar, 2000; Serra et al., 2010) o por incremento de presión (Y. Xia et al., 2009) se acompaña de la sobreexpresión de quimiocinas, citocinas proinflamatorias y moléculas afines como interleucina 1β (IL- 1β), IL-6, TNF α TGF- 1β y NK- κ B. El papel de IL-6 en la hipertrofia no está del todo claro, ya que por una parte su ablación funcional no impide la hipertrofia producida por ejercicio, pero por otra se observa como en humanos esta citocina es secretada por el músculo tras la práctica de deporte (MacDonald, Wojtaszewski, Pedersen, Kiens, & Richter, 2003). Se ha sugerido que la gestación es un estado de equilibrio entre citocinas pro y antiinflamatorias (Velez et al., 2008). Mientras que IL-6 aumenta progresivamente a lo largo de la gestación (Pazos, Lima, Casanueva, Diéguez, & García, 2013; Vassiliadis, Ranella, Papadimitriou, Makrygiannakis, & Athanassakis, 1998), también lo hacen los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 en la fase tardía de la gestación (Vassiliadis et al., 1998). El papel de las citocinas en el desarrollo de la hipertrofia gestacional no ha muy sido estudiado.

La diferencia más remarcable entre las hipertrofias patológicas y fisiológicas es la función cardiaca. La hipertrofia maladaptativa se caracteriza por una pérdida de la función, mientras que la fisiológica no sufre cambios o se ve mejorada incluso (Dorn, 2007; Eghbali, Wang, Toro, & Stefani, 2006). Durante el embarazo, el *output* cardiaco va en aumento hasta alcanzar un máximo entre el tercer trimestre y el parto (J F Clapp & Capeless, 1997; Savu et al., 2012). Varios estudios han demostrado que existe una adaptación en la función contráctil del miocardio durante la gestación (Buttrick, Schaible, Malhotra, Mattioli, & Scheuer, 1987). La función cardiaca puede verse afectada, y así lo hace, debido a la rigidez mecánica que sufre el corazón tras estímulos patológicos. Tras estos insultos ocurre una deposición desproporcionada de colágeno que supone fibrosis intersticial en el corazón (Souders, Borg, Banerjee, & Baudino, 2012). Esta fibrosis es la que causa la rigidez del músculo (Graham, Horn, & Trafford, 2008), provocando disfunción diastólica primero, y disfunción sistólica después (Brower et al., 2006). Los modelos de ejercicio y gestación no se asocian con la aparición de fibrosis (Aljabri et al., 2011; Chung, Heimiller, & Leinwand, 2012). Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) degradan el colágeno y otras proteínas del matriz extracelular, por el contrario, las proteínas inhibidoras tisulares de las MMPs (TIMPs) antagonizan con su función. En la gestación se ha podido observar cómo tanto la expresión de MMP3 como la de TIMP1 esta incrementada (Umar et al., 2012), lo que no supone un cambio en su ratio ni tampoco en la deposición de colágeno extracelular.

En lo que respecta a las vías de señalización que producen este tipo de hipertrofia, no distan mucho de aquellas que se han vinculado a la hipertrofia por ejercicio, pero ambos modelos fisiológicos poseen perfiles transcripcionales distintos que los definen (Chung, Heimiller, et al., 2012).

La vía de señalización PI3K/Akt/GSK3 β es de nuevo importante y tiene un papel central (Chung & Leinwand, 2014). Durante la etapa central de la gestación, no en la tardía, se da la activación de Akt por fosforilación (Chung, Yeung, et al., 2012; Hilfiker-Kleiner et al., 2007; Lemmens, Doggen, & De Keulenaer, 2011) y de sus dianas *downstream* (GSK3 β , p70S6K, mTOR). La activación

constitutiva de Akt o GSK3 β por separado causaba una atenuación de la hipertrofia asociada a gestación, lo que muestra que este tipo de hipertrofia esta mediada por Akt y sus dianas downstream (Chung, Yeung, et al., 2012).

La vía de las MAPK también está involucrada en esta respuesta fisiológica. En modelos de ejercicio las ERK1/2 (Konhilas et al., 2004) u otras MAPKs (Motoyuki Iemitsu et al., 2006) no parecen estar reguladas por estos estímulos. Sin embargo, ratones transgénicos que expresan MEK1 (directamente *upstream* de ERK1/2 y que no fosforila a p38 ni a JNK) activo constitutivamente en el corazón desarrollan hipertrofia del miocardio con una mejor función cardíaca, característica propia de la hipertrofia fisiológica (Bueno et al., 2000). Ratones que no expresaban ASK1, MAPKK que fosforila p38, muestran menor hipertrofia y apoptosis tras sobrecarga de presión por un lado (Yamaguchi et al., 2003), pero por otro, la hipertrofia fisiológica que desarrollan en respuesta al deporte es mayor (Taniike et al., 2008). Volviendo a la gestación, ERK1/2 sí que se encuentra altamente activo, mientras que p38 está significativamente desfosforilado (J. G. Edwards, 2002; A. M. D. Gonzalez et al., 2007). Al probar si los altos niveles de progesterona, pero no los de estradiol, en la fase intermedia de la gestación tenían relación con la fosforilación de ERK1/2, Chung et al. demostraron que la progesterona inducía hipertrofia y fosforilación de ERK1/2 en cultivo de cardiomiocitos primarios. Al bloquear ERK1/2 mediante un compuesto químico que inhibe específicamente MEK1, la respuesta hipertrófica dada por la progesterona se perdía.

Además de la de ERK1/2, otra vía de señalización iniciada por la proteína G α_q es la de la calcineurina/NFAT, que se asocia clásicamente a hipertrofia patológica (Wilkins et al., 2004). Los niveles y actividad de la calcineurina están también elevados en la gestación (Chung, Yeung, & Leinwand, 2013). La implicación de esta tercera vía en la hipertrofia cardíaca gestacional quedo patente al administrar ciclosporina A. Este agente se asocia con la ciclofilina, creando un complejo que inhibe la actividad de la calcineurina, lo que impide que NFAT se desfosforile. Al administrar ciclosporina A se bloqueaba completamente la respuesta hipertrófica gestacional cardíaca (Chung et al., 2013). Al tratar cardiomiocitos en cultivo con progesterona (pero no con estradiol) se obtuvo también un aumento en la presencia y en la actividad de la calcineurina que se bloqueaba con la ciclosporina A. La inhibición de la calcineurina bloquea también la activación de ERK1/2 y Akt (Chung et al., 2013). Todos estos datos referentes a la señalización intracelular recabados en los últimos años muestran la vinculación de la calcineurina, ERK1/2, Akt y sus dianas *downstream* con la respuesta hipertrófica gestacional.

Otra gran diferencia entre las hipertrofias cardíacas fisiológicas y patológicas es la re-expresión del programa génico fetal. En el caso del crecimiento adaptativo el incremento de expresión de ANF y BNP es notorio y si bien puede que al principio su función sea adaptativa, a la larga ira en detrimento del miocardio. Las isoforma fetales de las proteínas contráctiles se observan también sobreexpresadas (α -actinina y β -MHC) frente a daño cardíaco y las formas adultas están infraexpresadas (α -MHC y SERCA2A) (Eghbali et al., 2006; Rimbaud et al., 2009). Los estímulos fisiológicos que causan hipertrofia no tienen un patrón común en lo que respecta a estos marcadores, pero de forma conjunta puede decirse que las formas fetales tienden a estar menos expresadas o inalteradas, mientras que las formas adultas siguen la tendencia contraria. Los

niveles de expresión de α -actinina se han correlacionado con el aumento (Stilli et al., 2006) o disminución (Carneiro-Júnior et al., 2013) de la función contráctil del miocardio.

METABOLISMO CARDIACO

Otra importante función que retorna al estado fetal es el metabolismo cardiaco. Como brevemente se ha mencionado antes, el corazón adulto sano utiliza lípidos como fuente principal de sustratos metabólicos. El corazón afectado por patología cambia el sustrato de ácidos grasos a glucosa (Kolwicz & Tian, 2011) y muestra una menor actividad oxidativa y enzimas mitocondriales (Garnier et al., 2003; Taegtmeyer, Razeghi, & Young, 2002) (ver Figura 10). Cuando la hipertrofia es adaptativa esto no ocurre, el ejercicio aumenta la capacidad oxidativa, la actividad enzimática mitocondrial y el metabolismo lipídico (Rimbaud et al., 2009). Actualmente existen pocos resultados referentes al metabolismo cardiaco durante la gestación.

- Metabolismo cardiaco normal

El corazón tiene una alta demanda metabólica, previa a la gestación también, ya que su contracción es constante. Además, carece de grandes reservas de ATP por lo que el *turnover* total de ATP se ha estimado en 10 segundos, es por esto que depende de un suministro continuo de nutrientes (W. C. Stanley, 2005). El corazón puede utilizar diferentes tipos de sustratos (carbohidratos, lípidos, cuerpos cetónicos, aminoácidos), esta flexibilidad metabólica es clave para asegurar su soporte metabólico. La decisión de que sustrato usar depende de las condiciones ambientales y de la disponibilidad de sustrato. Durante la práctica de ejercicio aumentan los niveles de lactato en sangre, por lo que el corazón lo utilizará predominantemente (Gertz et al., 1988; W C Stanley, 1991). Durante ayuno prolongado por el contrario, son los niveles de cuerpos cetónicos los que están elevados, en este caso el corazón, al igual que el cerebro, dependerá de este sustrato (Gold & Yaffe, 1978). Bajo condiciones fisiológicas normales en las que existe disponibilidad normal de oxígeno y de nutrientes, el corazón usará predominantemente ácidos grasos (AG). La demanda energética se satisfará en un 70% mediante la oxidación de ácidos grasos y el 30 % restante mediante el uso de glucosa (W. C. Stanley, 2005). El catabolismo cardiaco de los diferentes sustratos converge en la formación del intermediario metabólico mitocondrial acetil CoA, a través de la β -oxidación en el caso de los AG o de la glicolisis cuando se trata de glucosa (W. C. Stanley, 2005). Este acetil CoA entra después en el ciclo de Krebs producción de CO_2 y las moléculas reductoras NADH y FADH que se usarán para la producción de ATP. Si la oxidación de la glucosa es total se conseguirán más de 30 moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras que la glicolisis solo permite la obtención de 2 ATPs. Los AG sin embargo, solo pueden ser consumidos dentro de la mitocondria mediante β -oxidación (Kolwicz, Purohit, & Tian, 2013). Las mitocondrias son por lo tanto vitales para saciar la demanda metabólica cardiaca (Figura 19). Aproximadamente un tercio del volumen cardiaco se corresponde con mitocondrias y un 95% del ATP generado en el corazón se deriva de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Kolwicz et al., 2013). Además de en el catabolismo, las mitocondrias son vitales ya que participan en la supervivencia celular, muerte y homeostasis del calcio. Los mecanismos que guían la elección del sustrato en el corazón no se conocen del todo.

Como se decía antes, puede simplemente deberse a la disponibilidad dependiendo de las circunstancias. Con la práctica de deporte ocurre una alta lipólisis en el tejido adiposo lo que aumenta los triglicéridos y AG en sangre. Además, existen otros mecanismos reguladores:

La vía PI3K/Akt es crucial para la captación de glucosa en otros tejidos al igual que en corazón. Debido a la señalización por insulina, el Akt activo produce la translocación de GLUT4 (*glucose transporter type 4*) a la membrana plasmática, favoreciendo la captación de glucosa (E. Gonzalez & McGraw, 2006). De las 3 formas de Akt que existen, la Akt1 y la 2 se expresan en el corazón. Estas dos isoformas parecen encargarse de funciones completamente diferentes, ya que Akt1 media en la respuesta hipertrófica fisiológica y patológica (DeBosch, Treskov, et al., 2006) mientras que Akt2 se encarga de la glucosa principalmente a través de la GSK3 β (DeBosch, Sambandam, Weinheimer, Courtois, & Muslin, 2006). La vía de las MAPK también se ha estudiado en el contexto cardíaco donde funciona como sensor del estado metabólico (Zaha & Young, 2012). Las MAPK son capaces de responder frente a los ratios de AMP/ATP y ADP/ATP activando mecanismos productores de ATP cuando el estado energético es bajo (Arad, Seidman, & Seidman, 2007). El ejercicio es un estímulo que activa MAPK (Coven et al., 2003). La activación tanto de la Akt como de MAPK produce la translocación a citoplasma de GLUT4 obteniendo una mayor internalización celular de glucosa y de glicolisis (Dolinsky & Dyck, 2006). La activación de MAPK aumenta también la importación de lípidos promoviendo la translocación del transportador de ácidos grasos CD36 a la membrana plasmática y antagonizando la acción de ACC (acetil CoA carboxilasa), un inhibidor del transporte de AG al interior de la mitocondria (Dolinsky & Dyck, 2006).

El flujo metabolismo cardíaco también se controla de manera transcripcional. Los receptores PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*), miembros de la familia de receptores nucleares son los más estudiados (Huss & Kelly, 2004). La unión de algunos AG a PPAR α por ejemplo, da lugar a la expresión de genes encargados de la captación de lípidos (CD36), del transporte al interior de la mitocondria (CPT1B) y de la β -oxidación (MCAD). La importancia de estos receptores PPAR se puede ver al observar como su expresión se encuentra disminuida en corazones hipertrofiados y atrofiados, lo que supone también una disminuida expresión de sus genes dianas (MCAD, PDK4, UCP3) involucrados muchos de ellos directa o indirectamente en la oxidación de ácidos grasos (Planavila, Calvo, & Vázquez-Carrera, 2006; Taegtmeyer et al., 2002). La activación de la señalización que los ácidos grasos por medio de los PPAR (Smeets et al., 2008; Van Bilsen & Planavila, 2014) y favorecer la oxidación de ácidos grasos (Kolwicz et al., 2012) son posibles dianas frente a las patologías y desregulaciones cardíacas (Palomer et al., 2014; Toral et al., 2015). En estados patológicos, el uso de ácidos grasos está desplazado a favor del uso de la glucosa, en parte por la acción de la enzima ACC2, que produce malonil CoA, que inhibe la entrada de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria. La ablación de la enzima ACC2 en corazones de ratón hace que el uso de AG no se inhiba. Este hecho hace que el uso de sustrato metabólico no se vea afectado por la constricción de la aorta (TAC), que produce hipertrofia patológica. No solo se seguían usando ácidos grasos como fuel en la misma proporción que los ratones sin TAC, sino que el metabolismo basado en AG hacia que la hipertrofia desarrollada por TAC fuera menor y con menor fibrosis (Kolwicz et al., 2012).

Otro importante regulador transcripcional del metabolismo es PGC1 α (*PPAR γ coactivador 1*) (Zoltan Arany et al., 2005; J J Lehman et al., 2000; Rowe, Jiang, & Arany, 2010). La sobreexpresión cardiaca de este regulador aumenta la biogénesis mitocondrial, la respiración celular, la β -oxidación y la expresión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa (J J Lehman et al., 2000; Russell, 2004). PGC1 α se une y activa los PPAR, los receptores relacionados a estrógenos (ERRs) y a otros muchos factores de transcripción, coordinando así varias vías entre las que se incluyen el consumo de AG (mediante activación de PPARs), la biogénesis de mitocondrias (a través de NRF1/2 y ERR α) y la densidad vascular (vía ERR α) (Banke et al., 2010; Duncan & Finck, 2008). La delección específica de PGC1 α en el corazón causa un contenido normal de mitocondrias pero con una fosforilación oxidativa disminuida, que se traduce en menor actividad contráctil y mayor susceptibilidad a padecer insuficiencia cardiaca (Z. Arany et al., 2006). En estos datos radica la importancia de PGC1 α en el metabolismo y función cardiaca (Zoltan Arany et al., 2005).

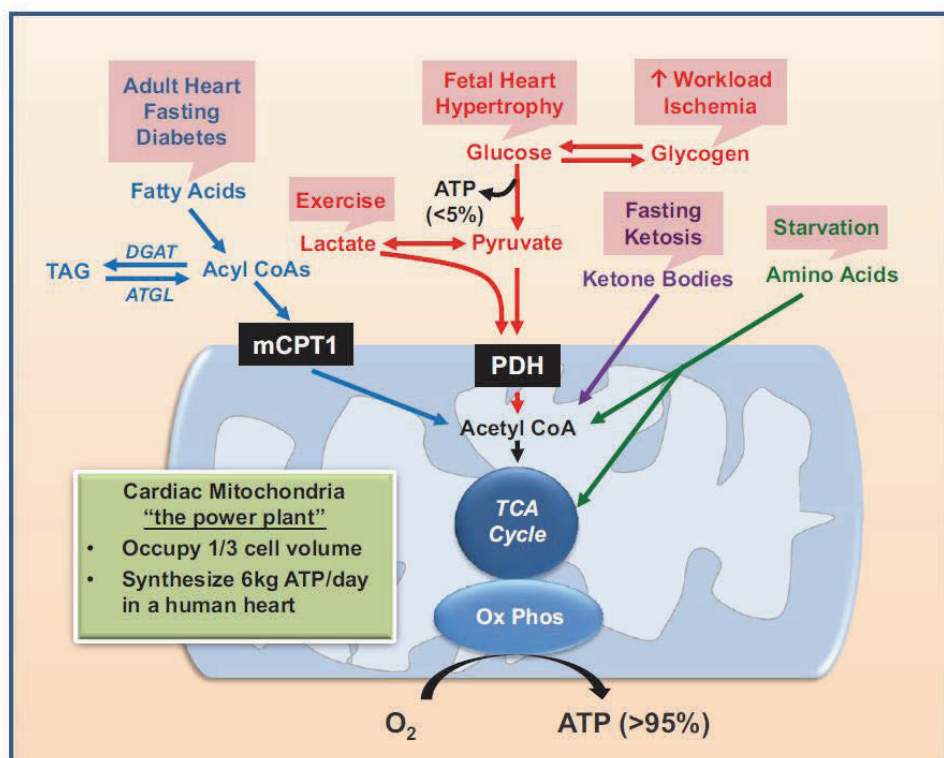


Figura 19. Esquema que muestra la red metabólica cardiaca. OxPhos, fosforilación oxidativa; TAG, triacilglicerol; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; ATGL, triglicérido lipasa adiposa; mCPT1, carnitina-palmitoil transferasa 1 muscular; PDH, piruvato dehidrogenasa; TCA, ácido tricarbóxico (Kolwicz et al., 2013).

El corazón es por lo tanto altamente dependiente de las mitocondrias y del metabolismo oxidativo, ya que disponiendo de un sustento energético correcto se asegura la función contráctil y el crecimiento y supervivencia de los cardiomiocitos (Fajas, 2013; Kolwicz et al., 2013).

- Metabolismo cardiaco durante la gestación

La información acerca de los cambios metabólicos que ocurren en el corazón durante la gestación es limitada. Durante la gestación se observa una mayor pre-carga, mayor contractilidad y menor post-carga cardiacas, esto supone un incremento del trabajo cardiaco del 20-30% (L. X. Liu & Arany, 2014). El aumento de trabajo cardiaco sin embargo, solo comporta un aumento del consumo de oxígeno medio del corazón del 15%, al menos en un modelo canino (Jeffrey G Williams et al., 2008). Para poder satisfacer esta demanda energética aumentada con una menor respiración, ocurre una mejora en la eficiencia del trabajo del 25% durante la gestación. Los mecanismos que llevan a una mejor eficiencia son desconocidos. La mayor demanda de oxígeno se consigue mediante mayor circulación coronaria en vez de mediante una extracción de oxígeno mayor. Las arteriolas coronarias se vuelven más sensibles a la vasodilatación producida por estrés durante el embarazo (J. G. Williams et al., 2007).

El uso de substrato también varía drásticamente durante la gestación. Varios estudios realizados en rata mostraban como el uso de la glucosa descendía un 75% en la etapa tardía de la gestación (M. C. Sugden, Changani, Bentley, & Holness, 1992; M. C. Sugden & Holness, 1993). El descenso en el uso de la glucosa comenzaba casi al mismo tiempo que la gestación, progresando hasta alcanzar el mayor descenso en la última etapa. Estos cambios metabólicos no se asemejan a los cambios hemodinámicos, sino que reflejan la demanda energética fetal. En estudios realizados en perros también se observa esta tendencia a reducir el uso de la glucosa frente a aumentar el de los AG hasta casi verse doblado (Jeffrey G Williams et al., 2008). La producción de ATP durante la gestación se debe a un origen lipídico por lo tanto. Parece por lo tanto, que al igual que el musculo esquelético, el corazón desarrolle cierta resistencia a insulina durante la gestación.

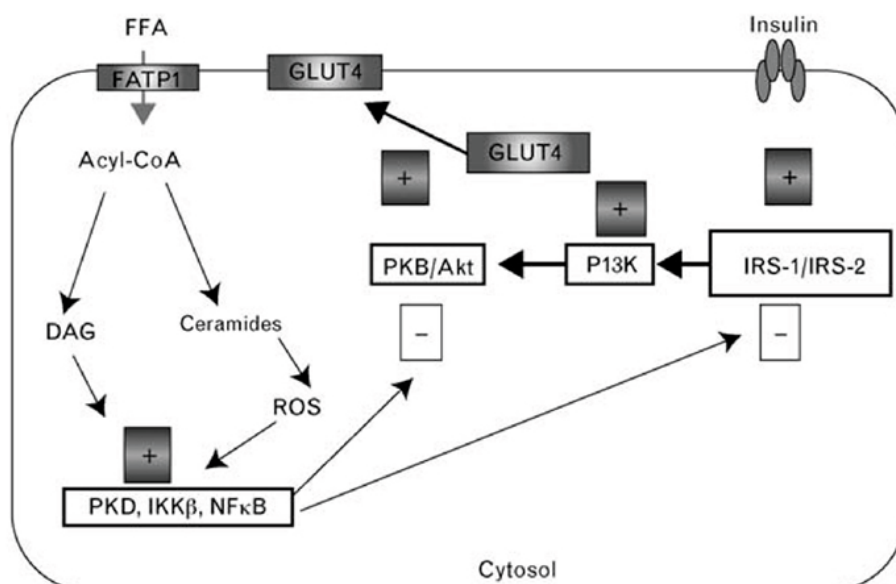


Figura 20. Señalización intracelular de los ácidos grasos y la insulina. (Delarue & Magnan, 2007)

Existen incógnitas en referencia a como se regulan estos cambios en el metabolismo. Las mitocondrias muestran una morfología normal durante la gestación (Bassien-Capsa, Fouron, Comte, & Chorvatova, 2006). La supresión de la oxidación de glucosa no afecta a la actividad de PDH (piruvato dehidrogenasa) al no verse ésta inhibida (M. C. Sugden & Holness, 1993). Los niveles de glucosa circulantes tienden a ser un poco más bajos durante la gestación pero no lo suficiente como para explicar su desuso. Los niveles totales de GLUT4 durante la gestación sí que están disminuidos pero no existen datos sobre su presencia en membrana plasmática (Nieuwenhuizen et al., 1998). El uso de ácidos grasos predominante durante la gestación podría simplemente deberse a que son más abundantes durante este período de gestación, ya que podrían inhibir el uso de glucosa (Randle et al., 1963). Como se mencionaba antes en referencia a la resistencia a insulina sistémica que ocurre en la gestación tardía, los altos niveles circulantes de AG hacen que la captación de glucosa disminuya (ver figura 3). Cuando la insulina se une a su receptor ocurre la fosforilación de los IRSs que activan PI3K que fosforila a PKB/Akt, estimulando la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, lo que aumentaría la captación de glucosa. Por el contrario, durante la gestación, los productos del metabolismo de los AGL como ceramidas, acil CoA y DAG activan la PKC, NFκB e IKKβ, que fosforilan los IRSs y la PKB/Akt, que inhiben la señalización de la insulina (Delarue & Magnan, 2007) (Figura 20). Es ineludible a pesar de esto que sí existe ciertamente una reprogramación en el corazón. Esto lo demuestra el hecho de que cardiomiocitos aislados de corazones de ratas preñadas aumenten su contractilidad en respuesta al piruvato y lactato en comparación con controles no preñadas (Vassiliadis et al., 1998). Estudios moleculares muestran que la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial del corazón (eNOS) parece estar aumentada, lo que explicaría la mayor capacidad de reacción y vasodilatación de las arteriolas frente a estrés débil (J. G. Williams et al., 2007). Se ha visto como el óxido nítrico (NO) puede potencialmente alterar el metabolismo cardiaco directamente y puede promover la función mitocondrial en un contexto no-cardiaco (Jaba et al., 2013; Kulandavelu, Qu, & Adamson, 2006; Nisoli et al., 2005). La administración de un inhibidor de eNOS a perras en estadios terminales de gestación hacia disminuir la captación y el consumo de AG a niveles de no-gestantes a la vez que aumentaba el consumo de glucosa (Jeffrey G Williams et al., 2008). Los niveles más altos de NO durante el embarazo podrían explicar este cambio en el balance metabólico gestacional. Akt y su diana downstream mTOR están también activados durante la gestación en ratones (Chung, Yeung, et al., 2012). La *downregulation* de Akt2 podría explicar la disminución en el uso de glucosa, y la activación de Akt1 sería la que sustentaría la hipertrofia, aunque que esto ocurra no está probado (L. X. Liu & Arany, 2014).

De igual manera, es indispensable pensar en los cambios hormonales intrínsecos a la gestación. Los niveles de estrógenos, progesterona, prolactina y hormonas placentarias están elevados durante el embarazo. Muchas de estas hormonas se han relacionado con la resistencia a la insulina sistémica que se da durante la gestación pero su efecto sobre el metabolismo cardiaco no se ha estudiado. Los efectos de los estrógenos sobre el metabolismo de ácidos grasos se han podido explorar en estudios de la terapia de reemplazo hormonal, donde parece que esta hormona incrementa el uso de AG en el corazón sin alterar el de la glucosa (Herrero et al.).

Otra averiguación sorprendente fue el descubrimiento en el 2012 por Iorga, Dewey, Partow-Navid, Gomes, & Eghbali de que existía una menor producción de ROS en los corazones de ratones hembra preñadas que en las no preñadas. Además esta disminución de ROS se mantiene

durante los 7 días posteriores al parto, cuando se recuperan niveles de hembras no preñadas. Este margen temporal es el mismo que se mencionaba antes y que se corresponde con la reversión de la hipertrofia cardíaca. Al no acompañarse este estudio, ni existir otro que aporte datos en referencia a la acción de agentes antioxidantes o a su expresión durante el embarazo, queda por esclarecer cómo se reduce la producción de ROS en un entorno en el que el metabolismo oxidativo está elevado.

Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis proteica *de novo* es una característica de las hipertrofias cardíacas. Este proceso puede potencialmente generar más proteínas mal plegadas o anormales, por lo que un aumento de la actividad proteosomal sería necesario para eliminar estas proteínas aberrantes y mantener así la homeostasis. El sistema ubiquitina-proteosoma es un sistema encargado de eliminar las proteínas mal plegadas o dañadas que se ha observado ligado a la hipertrofia cardíaca (Predmore et al., 2010). Varias publicaciones han descrito efectivamente, una mayor actividad proteosomal en hipertrofias cardíacas compensatorias inducidas por TAC tanto en ratón como en perro (Depre et al., 2006; Hedhli et al., 2008). No solo se da la activación de este sistema, sino que es requerido para que el corazón aumente su tamaño en respuesta al aumento de presión. Inhibiendo el proteosoma químicamente se evitaba la respuesta adaptativa de la hipertrofia y el corazón obtenía peor fracción de eyección (EF) (Depre et al., 2006; Hedhli et al., 2008). También se ha descrito una menor actividad proteosomal en la progresión de la hipertrofia cardíaca adaptativa a la disfunción cardíaca (Tsukamoto et al., 2006). La ubiquitinización de proteínas dañadas es el mecanismo primordial por el que marcar los péptidos que han de ser degradados mediante la actividad proteolítica del proteosoma. Se ha visto como pacientes con cardiomiopatías descompensadas tienen mayores niveles de ubiquitinización (Otsuka et al., 2010) y otros estudios muestran un incremento progresivo en los niveles de ubiquitinización 2-4 días después de generar hipertrofia cardíaca en ratones mediante TAC (Depre et al., 2006; Tsukamoto et al., 2006).

En gestación, por el contrario, se observan tanto menor actividad proteosomal como ubiquitinizaciones (Iorga et al., 2012). La reducción en los niveles de ubiquitinización proteica podría deberse a dos causas que no son mutuamente excluyentes. La primera, simple ahorro energético, ya que el proceso de marcaje mediante ubiquitina consume ATP. La segunda vendría en relación a la disminución de la producción de ROS en gestación. Menor cantidad de ROS podría significar también menor número de proteínas dañadas oxidativamente que requerirían de ser ubiquitinizadas (A. Giralt & Villarroya, 2012). Además, se ha demostrado en miotubos de músculo esquelético como ROS aumenta la actividad de conjugación y la expresión de genes que conforman las enzimas ligasas E3 de ubiquitina (Y.-P. Li, Chen, Li, & Reid, 2003). Dicho esto, también se observa como los niveles de actividad proteosomal y de ubiquitinización que se encuentran deprimidos durante la gestación, recuperan niveles de no-gestantes 7 días postparto (Iorga et al., 2012).

Recapitulando lo que se decía antes, el aumento en el uso de los ácidos grasos que se da en el corazón durante el embarazo podría estar detrás de los efectos protectores que la gestación le brinda al corazón frente a distintos insultos (Lemmens et al., 2011). El corazón parece estar protegido frente los efectos dañinos que la señalización por angiotensina II comporta, ya que los corazones de ratas preñadas eran más resistentes a fibrosis y a los efectos anti-antigénicos del

tratamiento que los controles no preñados (Aljabri et al., 2011). En otro trabajo realizado en ratones, los corazones de gestantes estaban protegidos frente a daño por I/R, ya que el área infartada se veía drásticamente disminuida. Además, los corazones de gestantes mostraban hasta 3 veces más células positivas para el marcador c-Kit, indicador de células progenitoras cardíacas, que podrían ser las responsables del papel protector (Xiao et al., 2014)

Esta función protectora de la hipertrofia fisiológica gestacional no está del todo clara ya que hay otros estudios con resultados opuestos. En un par de estudios realizados en ratas *in vivo* y en ratón *ex vivo*, se demostraba que los daños tras la práctica de I/R en los corazones de las gestantes eran mayores que en las no-gestantes (J. Li et al., 2012; Songstad et al., 2014).

LOS FIBROBLAST GROWTH FACTORS (FGFS)

Los FGFs (*Fibroblast growth factors*) forman una amplia familia de factores de crecimiento que se encuentran en un amplio rango de organismos, desde nematodos hasta humanos. Los FGFs se describieron por primera vez en 1939 por su actividad mitogénica (Trowell & Willmer, 1939) y el primero de sus miembros se aisló al cabo de varios años (Gospodarowicz, 1974).

Desde entonces, en vertebrados, se han identificado 22 miembros dentro de la familia de los FGFs. Los miembros comparten una similitud en la secuencia de aminoácidos de entre el 13 y el 71% (Goetz et al., 2007). Los FGFs tienen un peso molecular que varía desde los 17 a los 34 kDa, pero se caracterizan por conservar un dominio central compuesto por una secuencia de 120-130 aminoácidos. Entre los vertebrados concretamente, los FGFs están altamente conservados, no solo en lo que a la similitud entre las isoformas proteicas se refiere sino también a la estructura y organización de los genes. Otra característica común entre los miembros de esta familia es su alta afinidad por el glicosaminoglicano heparan-sulfato (HSGAG), molécula que se requiere para la activación de los receptores de los FGFs. La transducción de la señal extracelular por medio de los FGFs clásicos (paracrinos) se da a través de sus receptores situados en la superficie celular. Los receptores, denominados FGFRs (*Fibroblast growth factor receptors*), son del tipo tirosina-cinasa y requieren la presencia del heparan-sulfato como cofactor. En el caso de la familia FGF19, conformada por FGFs endocrinos, el cofactor que se necesita para la transducción de la señal es una proteína transmembrana conocida como Klotho que actúa como correceptor (Goetz et al., 2007).

Durante el desarrollo embrionario los FGFs tienen un papel muy relevante en la proliferación, migración y diferenciación celular. En edad adulta por el contrario, su papel es homeostático, ya que participan en la reparación tisular y en la respuesta a daño celular. Cuando su expresión es incorrecta o inadecuada, algunos FGFs se han vinculado a procesos carcinogénicos. Algún subgrupo de los FGFs es importante en adultos ya que participa en la transducción de señales del sistema nervioso central y periférico (Ornitz & Itoh, 2001).

Algunos FGFs se describieron como factores mitogénicos y de crecimiento celular y otros se descubrieron por homología de su secuencia (Itoh & Ornitz, 2011). FGF21 se describió por primera vez en el año 2000 (Nishimura, Nakatake, Konishi, & Itoh, 2000) y un año más tarde se comprobó que estructuralmente pertenecía a la familia de los FGF (Ornitz & Itoh, 2001).

Los FGFs de los vertebrados pueden clasificarse en diferentes subgrupos o subfamilias. La división se basa en la semejanza de la secuencia de aminoácidos. Los miembros de un mismo subgrupo además de compartir similitud en la secuencia de aminoácidos también tienen en común su funcionalidad en el desarrollo de los organismos y otras propiedades bioquímicas. En el año 2005 se propuso la primera división de los FGFs en 8 subfamilias basándose en el análisis filogenético molecular y en la conservación de su secuencia, esta primera división se muestra en la Tabla 4 (Popovici, Roubin, Coulier, & Birnbaum, 2005).

En el año 2012 esta división se revisó y en la nueva clasificación se confirmaba la relación entre los miembros de la subfamilia conformada por FGF4, 5 y 6 y se sugería la creación de un nuevo subgrupo para los ortólogos de FGF3 en mamíferos (Oulion, Bertrand, & Escriva, 2012). También se ha observado como los genes que codifican para los diferentes subgrupos de los FGFs no están

estrechamente ligados entre sí en el genoma. Este hecho sugiere que las diferentes subfamilias se han generado a partir de translocaciones o duplicaciones génicas entre los diferentes linajes y no por duplicaciones locales (Itoh & Ornitz, 2004).

Subfamilia	Ortólogos
A	FGF1 y 2
B	FGF3, 7, 10 y 22
C	FGF4, 5 y 6
D	FGF8, 17, 18 y 24
E	FGF9, 16 y 20
F	FGF11, 12, 13 y 14
G	FGF15/19, 21 y 23
H	Específica de artrópodos

Tabla 4. División de los FGFs propuesta por Popovici et al. en el 2005.

FGFs en vertebrados

El análisis filogenético de los FGFs en humanos identifica hasta 7 familias diferentes que acogen los 22 miembros (FGF1 a FGF23) que se conocen (Itoh & Ornitz, 2004, 2011). La isoforma FGF19 humana tiene su ortólogo en ratones, el FGF15, que no existe en humanos (Itoh & Ornitz, 2008) (Figura 21).

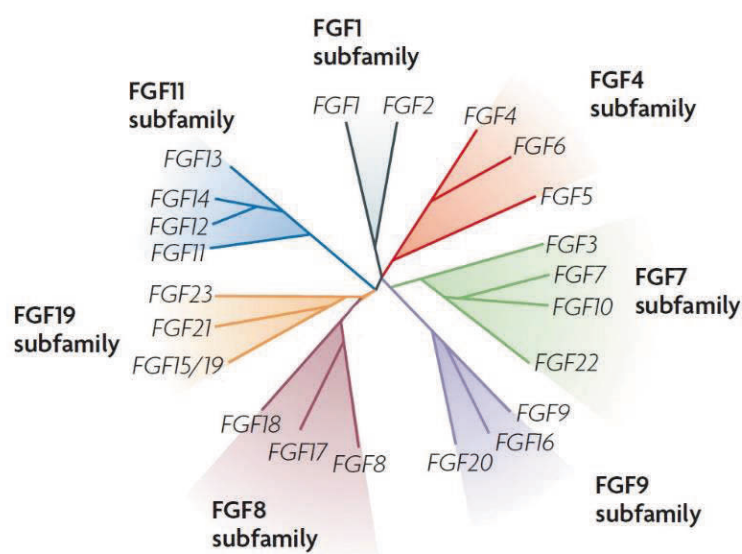


Figura 21. Relación filogenética entre los miembros de los FGFs en mamíferos. Cada subfamilia se encuentra coloreada de diferente color. Modificado de Mason, 2007.

Se han encontrado ortólogos de la mayor parte de isoformas humanas en otros vertebrados. Esta situación evidencia que ningún FGF se ha adquirido en el linaje de los mamíferos posteriormente a su separación del resto de vertebrados. La mayoría de los genes que codifican para los FGFs se encuentran diseminados por el genoma, lo que apunta a que se crearon por duplicación y translocación a lo largo de la evolución. Sí que hay por el contrario algunos genes que se sitúan muy próximos unos de los otros, separados por pocas kilobases, lo que sugiere más bien un proceso de duplicación local. En ratón, las subfamilias son idénticas a las humanas. Las 7 familias se componen de miembros que comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos al igual que en características bioquímicas y estructurales (Itoh & Ornitz, 2008).

Por lo que parece, los FGFs se habrían formado tras dos procesos de expansión a lo largo de la evolución: el primero tendría lugar en los metazoos primitivos y el segundo coincidiendo con la aparición de los cordados.

Los análisis filogenéticos a los que antes se hacía referencia denotan que la subfamilia de FGF15/19, 21 y 23 puede provenir de un gen ancestral relacionado con FGF4. Tras sufrir este gen duplicaciones génicas locales y divergencia en las secuencias de aminoácidos surgiría la subfamilia (Itoh & Ornitz, 2004).

Clasificación funcional

Los 22 miembros de las familias de FGFs en mamíferos se expresan diferencialmente en muchos, o en todos, los tejidos. Los FGFs se pueden además agrupar según sus mecanismos de acción en intracrininos, paracrininos o endocrininos (Itoh & Ornitz, 2011):

- Intracrininos: De este grupo forman parte los FGF11, 12, 13 y 14 ya que no son secretados extracelularmente. Actúan como moléculas intracelulares de manera independiente a los FGFR. Su mecanismo de funcionamiento es mediante la interacción con los dominios intracelulares de los canales de sodio dependientes de voltaje y con las proteínas MAPKs (*Mitogen activated protein kinases*) neuronales, entre otros. Regulan la excitabilidad eléctrica de las neuronas, y posiblemente de otros tipos celulares.
- Paracrininos: A este grupo pertenecen la mayoría de FGFs y son las subfamilias de FGF1, 2 y 5, FGF 3, 4 y 6, FGF7, 10 y 22, FGF8, 17 y 18 y FGF9, 16 y 20. La mayoría son proteínas que se secretan junto con péptidos señales N-terminales y que poseen un lugar de interacción con el heparan-sulfato del matriz extracelular (necesario para la correcta interacción y activación de los FGFR). Estos FGFs toman parte en respuestas biológicas como proteínas extracelulares, uniéndose a los receptores FGFR tirosina-kinasas en presencia de heparan-sulfato como cofactor. Esta interacción con los receptores permite su dimerización funcional, la transfosforilación y la activación de diversas vías de señalización. Algunos FGF pueden translocarse directamente al núcleo y actuar de una manera intracrina.

- Endocrinos: Los FGF15/19, 21 y 23 conforman este grupo e intervienen en respuestas biológicas a través de los FGFR. Presentan baja afinidad por el heparan-sulfato extracelular lo que permite que al ser secretados no queden atrapados y puedan ejercer funciones endocrinas. Actúan como factores de diferenciación en embriones y como hormonas en adultos.

Características estructurales

Los FGFs tienen una secuencia en su núcleo de 120 aminoácidos conservada que da lugar a una estructura β -trébol (β - *trefoil*) una vez la proteína se ha plegado. Los FGFs paracrinos tienen una estructura β -trébol regular compuesta por 12 láminas β mientras que los FGFs endocrinos presentan un β -trébol compuesto por solo 11 láminas (Goetz & Mohammadi, 2013; Goetz et al., 2007). Este dominio nuclear que se encuentra muy conservado, está flanqueado a ambos lados por secuencias de aminoácidos muy distintas entre los miembros de los FGFs. Estas secuencias tan divergentes son las que confieren a cada miembro sus peculiaridades individuales y propiedades funcionales. En los FGFs paracrinos, los residuos de los *loops* que conectan las láminas β 1-2 y los que hay entre las láminas 10 y 12 conforman el lugar de unión al heparan-sulfato (Figura 22). Los factores endocrinos, al carecer de la estructura regular, tienen un lugar de unión totalmente diferente, lo que les confiere propiedades especiales ligadas a su funcionalidad (Goetz & Mohammadi, 2013).

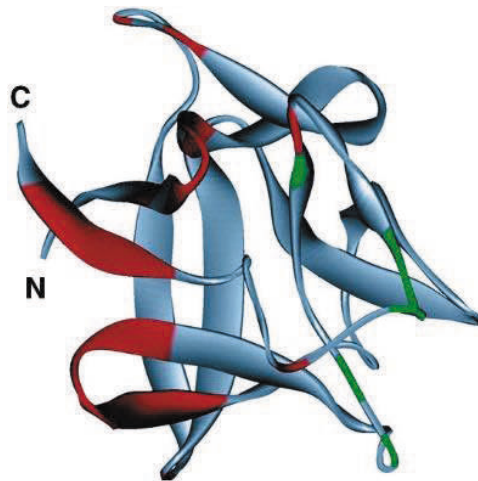


Figura 22. Modelo que muestra la estructura proteica y el plegado de los FGFs. Se muestran los lugares de contacto al receptor en rojo y al heparan sulfato en verde. (Mason, 2007).

Como el resto de miembros endocrinos, FGF21 tiene un núcleo estructural de 120 aminoácidos que se disponen en una estructura β -trébol flanqueado por secuencias específicas a ambos lados. En el flanco C-terminal existe también un dominio de 14 aminoácidos poco estructurado que es necesario para la interacción con el cofactor β -klotho y por ende para la función de FGF21 (Yie et

al., 2009). La delección de 5 aminoácidos de este dominio C terminal supone la disminución de la afinidad de FGF21 por el cofactor β -klotho y por lo tanto la disminución en la capacidad para activar la vía de señalización (Micanovic et al., 2009).

Receptores de FGFs

Los FGFs llevan a cabo sus acciones mediante la unión a los FGFRs presentes en la superficie celular. Estos últimos son receptores tirosina-kinasas (≈ 800 aa) que contienen 3 dominios (D1-D3) extracelulares *immunoglobulin-like* de unión a ligandos y a heparan-sulfato, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático tirosina-kinasa (Figura 23). Los FGFRs presentan una secuencia ácida rica en serinas, denominada caja ácida, entre los dominios D1 y D2. El fragmento compuesto por D2 y D3 es donde se da la unión específica al ligando, y el D2 es también el lugar de unión al heparan sulfato. El dominio D1 y la caja ácida tienen un papel de autoinhibición que se detalla más adelante (F. Wang, Kan, Yan, Xu, & McKeehan, 1995).

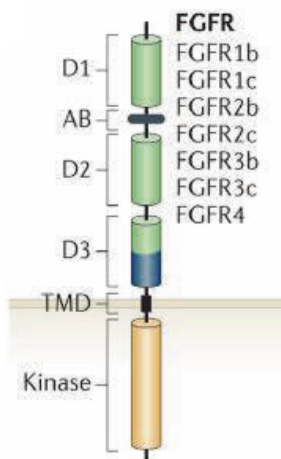


Figura 23. Esquema de la organización de los dominios en un FGFR standard. El splicing alternativo en el dominio D3 hace que el segmento azul sea diferente, creando las isoformas b y c, que confieren distinta afinidad entre el ligando y el receptor. AB: Acid box, TMD: dominio trans-membrana. (Goetz & Mohammadi, 2013).

Estos receptores tirosina-kinasa están codificados por 4 genes diferentes (FGFR1-FGFR4) (Itoh & Ornitz, 2004). Por medio del *splicing* alternativo (Figura 24) se elimina la segunda mitad del dominio D3 en los receptores 1, 2 y 3 dando lugar a dos isoformas, la b y la c (FGFR1b/FGFR1c, FGFR2b/...). Este *splicing* les confiere un dominio extracelular diferente, lo que les da diferentes especificidades de unión (Beenken & Mohammadi, 2009).

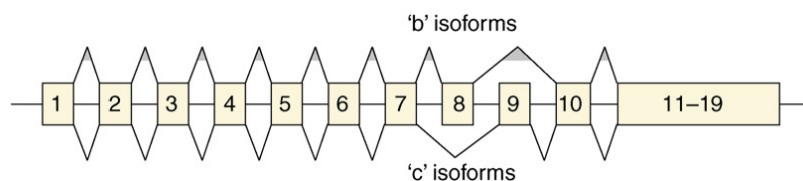


Figura 24. Esquema que muestra el *splicing* que da lugar a las isoformas b y c de los FGFRs. Las cajas numeradas representan exones. El splicing más significativo ocurre en los exones 8 y 9 (Kuro-o, 2008).

Las isoformas b se encuentran predominantemente en tejidos epiteliales mientras que las isoformas c se ubican en tejidos mesenquimales (Johnson, Lu, Chen, Werner, & Williams, 1991). No se ha descrito relación alguna entre la localización cromosomal de los genes que codifican para los FGFs y para sus receptores. Como en el caso de los FGFs, la familia de los FGFRs se creó a partir de un ancestro común que se duplicó durante el inicio de la evolución de los vertebrados de manera coetánea a la expansión de los FGFs. El desarrollo conjunto de los ligandos y los receptores favoreció a incrementar la combinatoria de especificidades entre ellos (Tabla 5) (Itoh & Ornitz, 2004).

	Subfamilia	FGF	FGFR1b	FGFR1c	FGFR2b	FGFR2c	FGFR3b	FGFR3c	FGFR4
Paracrinos	FGF1	FGF1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		FGF2	++	+++	-	++	-	+++	+++
	FGF4	FGF4	-	+++	-	+++	-	++	+++
		FGF5	-	++	-	+	-	-	-
		FGF6	-	++	-	++	-	-	+++
	FGF7	FGF3	++	-	++	-	-	-	-
		FGF7	-	-	+++++	-	-	-	+
		FGF10	++	-	+++++	-	-	-	-
		FGF22	++	-	+++++	-	-	-	-
	FGF8	FGF8	-	++	-	+++	+	+++++	++++
		FGF17	-	+	-	+	-	+++	+++
		FGF18	-	-	-	+	-	++	++
	FGF9	FGF9	-	-	-	++	++	+++	-
		FGF16	-	-	-	+	-	+	-
		FGF20	-	+	-	++	++	+++	+
Intracrinos	FGF11	FGF11	-	-	-	-	-	-	-
		FGF12	-	-	-	-	-	-	-
		FGF13	-	-	-	-	-	-	-
		FGF14	-	-	-	-	-	-	-
Endocrín	FGF19	FGF15/19	-	+++	++	+++++	+	++++	+++++
		FGF21	+	+	+++	+++	+	+	++++
		FGF23	-	+	++	+++	+	++	+++++

Tabla 5. Especificidad de los FGFRs por los ligandos FGF. (Mason, 2007).

Interacción con los proteoglicanos.

Una característica biológica de los FGFs es su capacidad de interacción con los proteoglicanos heparin o heparan sulfato, que abundan en las superficies celulares y la matriz pericelular y extracelular. Esta interacción hace que los FGFs estén protegidos frente a la desnaturalización térmica y la proteólisis. El heparan sulfato evita la difusión de los FGFs al espacio intersticial. Los FGF paracrinos, a diferencia de los endocrinos, tienen una alta afinidad por este proteoglicano. Mediante esta afinidad los FGF endocrinos quedan inmovilizados cerca de su lugar de secreción, pudiendo actuar solamente sobre las células del mismo órgano o tejido. La unión de los FGF clásicos a los complejos FGFR/Heparan sulfato provoca la dimerización de los receptores y la autofosforilación que supone la activación de la vía de señalización que fosforilará substratos *downstream*. Algunos de los substratos que se fosforilan en la cadena de transducción de la señal son el FGFS2 α (FGFR substrate 2 α), la PLC (Fosfolipasa C) o MAPKs como ERK1 y ERK2 (*Extracellular signal regulated kinase 1 y 2*). La activación de la vía concluye con diferentes respuestas celulares.

Además de retener los ligandos cerca del lugar de acción, proporcionar estabilidad al ligando y limitar el radio de señalización de este, el heparan sulfato también crea gradientes de FGFs en el matriz extracelular. Estos gradientes determinaran diferentes procesos celulares como la migración, la proliferación o el destino celular durante la morfogénesis tisular o el desarrollo embrionario (Goetz & Mohammadi, 2013).

Los miembros de la subfamilia FGF19 (15 en ratones) que también incluyen FGF21 y FGF23, presentan una baja afinidad por el heparan-sulfato de la membrana y el matriz extracelular (Goetz et al., 2007) lo que los capacita para difundir libremente por la membrana, pasar a la circulación y actuar lejos del lugar de secreción, en otros tejido diana (Goetz & Mohammadi, 2013). En el caso concreto de FGF21 no se conoce como el heparan-sulfato contribuye a la formación del complejo receptor, puede que ayude a determinar la especificidad ligando-receptor, pero si se ha visto que en su presencia la respuesta de FGF21 se potencia (Suzuki et al., 2008). El hecho de no tener afinidad por el heparan-sulfato hace que para compensarlo, los FGFs endocrinos requieran de otro cofactor para poder llevar a cabo la unión FGF-FGFR. En este caso, los cofactores con los que interaccionan son con miembros de la familia de proteínas Klotho (Itoh, 2010).

Cofactor β klotho

Los FGFs endocrinos al no unirse a heparan sulfato lo han de hacer a otra proteína que haga las veces de cofactor. La familia de proteínas transmembrana Klotho cubre este papel. Existen 3 proteínas Klotho: α , β y *lactase-like* o γ . En el caso de FGF21, β -klotho actúa como cofactor y permite la activación y la dimerización del FGFR, determinando así la especificidad de acción a nivel tisular (Kharitonov et al., 2008; Ogawa et al., 2007). El mecanismo de señalización de FGF21 depende de su capacidad para formar el complejo FGFR/ β -Klotho en los tejidos diana (Rydén, 2009), ya que en los tejidos que no expresen el cofactor, la señalización y la propagación de la señal *downstream* no será posible. Algunos estudios han demostrado que la ausencia de β -Klotho tanto en ratones KLB-KO (β -Klotho *Knockout*) o mediante la utilización de siRNAs impide

la acción de FGF21 en estos organismos, evitando así sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo o en la adaptación termogénica (Adams, Cheng, Coskun, & Kharitononkov, 2012; Ding et al., 2012).

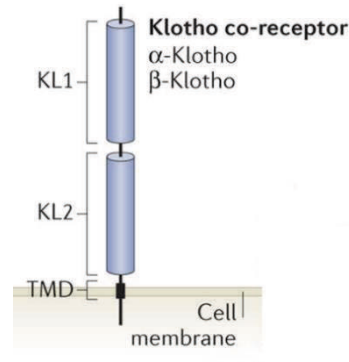


Figura 25. Esquema de la organización de los dominios de β -Klotho. (Goetz & Mohammadi, 2013).

Los 3 tipos de correceptores Klotho (≈ 130 KDa) son miembros de la familia 1β -glucosidasas. Se componen de dos dominios β -glucosilase-like en α - y β -Klotho y de uno solo en γ -Klotho, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta (Figura 25). La expresión de los miembros α y β se limita a los tejidos diana de los FGFs endocrinos, donde se hallan constitutivamente asociados a los FGFRs. Se ha observado que α -Klotho (o simplemente Klotho) se une a FGF23, mientras que β -Klotho es correceptor para FGF19 y FGF21 (Kharitononkov & Larsen, 2011). γ -Klotho funciona como correceptor adicional para la señalización de FGF19 (Fon Tacer et al., 2010).

Mientras que los FGFRs tienen una distribución extensa en todos los tejidos, los correceptores α - y β -Klotho son más restrictivos en lo que respecta a su distribución. Esta distribución limitada es la que confiere la especificidad tisular a los FGF endocrinos. β -Klotho particularmente es menos abundante en los tejidos en los que se expresan los FGFRs. Además de esta diferencia en la abundancia, también es remarcable que cada receptor tiene una afinidad diferente por β -Klotho. A la hora de formar los complejos ternarios en la superficie celular no solo la cantidad relativa de receptor y correceptor es importante, también dependerá de la isoforma del receptor presente ya que de esto dependerá su afinidad para unirse (Kurosu et al., 2007). Los correceptores α - y β -Klotho se unen preferiblemente a los receptores de isoforma c en el bolsillo hidrófobo del dominio D3, evitando así que otros FGFs no endocrinos se unan a los mismos receptores (Goetz & Mohammadi, 2013; Kurosu, 2008).

α -Klotho se expresa y halla principalmente en riñón, cerebelo y órganos reproductores. El cofactor β -Klotho por el contrario tiene mayor presencia en los tejidos metabólicamente activos como el páncreas, hígado, sistema nervioso central y los tejidos adiposos blanco y marrón (Fon Tacer et al., 2010; Kurosu et al., 2007).

Dimerización del receptor

Como se ha descrito antes, los FGFs paracrinos requieren del heparan-sulfato como cofactores para unirse establemente a los receptores y así promover la formación de un complejo o dímero de transducción de señal FGF-FGFR-HSGAG en una relación 2:2:2, ratio más estable que si el complejo fuera 1:1:1. En el complejo, cada ligando interacciona con los dos receptores, y los receptores también interaccionan entre sí. El heparan sulfato estabiliza el complejo y hace las veces de engranaje entre el ligando y el receptor. La dimerización de los receptores aumenta la afinidad de unión de los ligandos al heparan-sulfato, lo que dificulta aún más su difusión por la matriz extracelular y concentra así el radio de acción de la molécula secretada (Goetz & Mohammadi, 2013). En el caso de los FGFs endocrinos el cofactor será la proteína β -Klotho y se formará el complejo ternario FGF-FGFR- β -Klotho en un ratio 1:2:1 con el fin de transmitir la señal al interior de la célula (Figura 26).

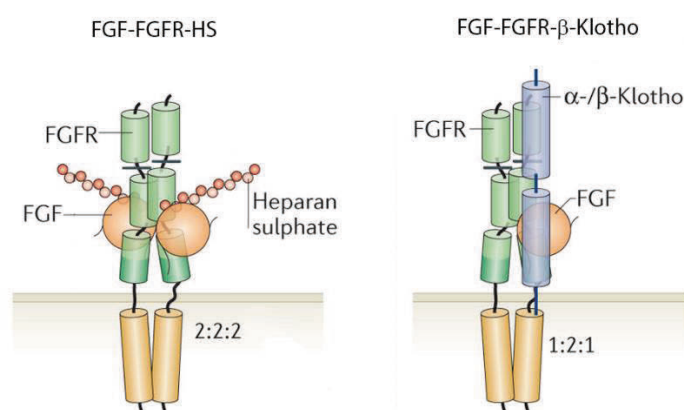


Figura 26. Modelos de dimerización de los FGFRs con sus ligandos FGF y heparan sulfato o β -Klotho. (Goetz & Mohammadi, 2013).

Mediante experimentos de inmunoprecipitación, algunos grupos han demostrado que existe una interacción específica entre FGFR1c y β -Klotho en la vía de señalización de FGF21 (Kharitononkov et al., 2008; Kurosu et al., 2007; Ogawa et al., 2007). La señalización de FGF21 se da principalmente mediante la unión a los receptores FGFR1c y FGFR3c. En células L6 transfectadas, se puede detectar la unión de FGF21 y el receptor FGFR4, esta unión sin embargo no activa la vía *downstream* (Suzuki et al., 2008). Otros estudios sugieren que FGFR1c y β -klotho pueden asociarse en proporción 1:1, pero que la presencia de FGF21 hace que se formen dímeros de FGFR1c (Ming et al., 2012).

Mecanismo de acción de FGF21

La actividad de los FGFs se regula a través de múltiples mecanismos como la interacción con heparan-sulfato, el splicing alternativo del extremo N-terminal, la homodimerización o el lugar específico de unión a los ligandos. La interacción con el heparan sulfato es más trascendente sobre la actividad biológica de los FGFs, ya que es lo que determinará si su acción es endocrina o

paracrina. La pauta de expresión de β -Klotho y del subtipo de FGFR es la que verdaderamente determina la selectividad específica de FGF21 y de los otros miembros de su subfamilia sobre el tejido (Cuevas-Ramos, Aguilar-Salinas, & Gómez-Pérez, 2012; Kharitononkov et al., 2008; Ogawa et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Urakawa et al., 2006).

Como se ha mencionado antes, el receptor standard contiene 3 dominios extracelulares del tipo inmunoglobulina (D1-D3), un dominio transmembrana y un último dominio intracelular tirosina-quinasa. La región compuesta por los dominios D2 y D3 y la interacción entre ambos es suficiente pero necesaria para la unión de los ligandos. La especificidad del ligando por el receptor viene dada por el *splicing* que sufre el dominio D3 y que genera las isoformas b y c que a su vez determinan la direccionalidad de la propagación de la señal (tejidos epiteliales vs. mesenquimales) (Goetz & Mohammadi, 2013).

Cuando β -Klotho o FGF21 se encuentran solos, el dominio inhibitorio D1 del FGFR impide la interacción de éstos con la región D2-D3. Por el contrario, una vez el ligando y el correceptor se han unido, el complejo FGF21- β -Klotho puede vencer sinérgicamente la inhibición de D1 en la región D2-D3. El complejo consigue entonces unirse a la región haciendo posible la dimerización del receptor y la consiguiente formación del complejo ternario FGF-FGFR- β -Klotho (Yie et al., 2012). La dimerización hace que los dominios intracelulares tirosina-quinasa se yuxtapongan activándose entre sí por transfosforilación (Figura 26). Esto hace que sus substratos intracelulares se activen y de comienzo la activación de varias vías de señalización obteniendo diversas respuestas celulares, entre ellas la activación de la transcripción génica.

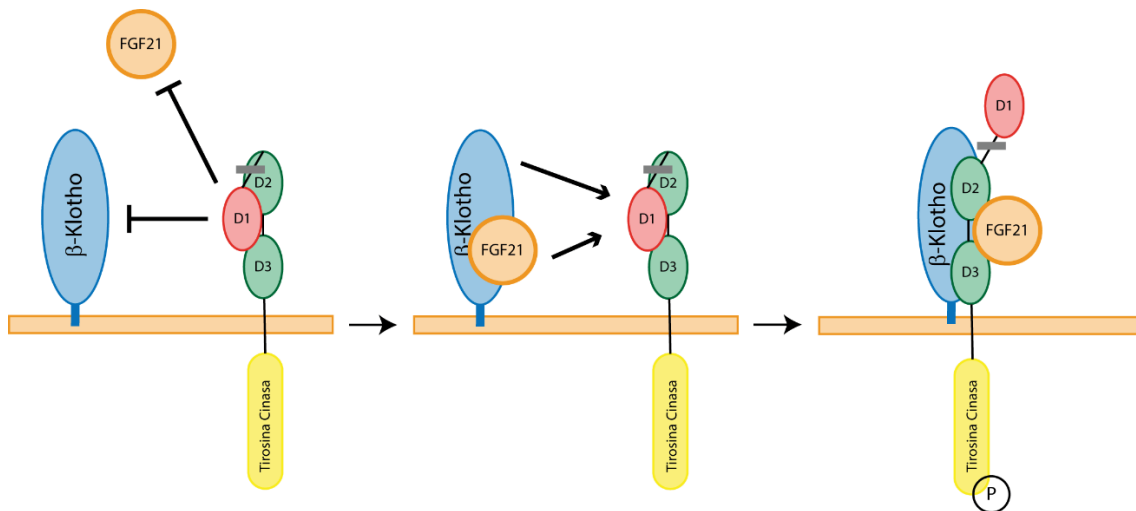


Figura 27. Esquema que muestra el mecanismo de acción de FGF21 sobre el receptor FGFR1c en presencia del cofactor β -Klotho (Mohammadi, Olsen, & Ibrahim, 2005; Yie et al., 2012). En la figura se muestra solo un FGFR, en la realidad son dos los FGFR los que interactúan con β -Klotho y FGF21.

FGF21

FGF21 se describió por primera vez en el año 2000 (Nishimura et al., 2000) y por su estructura se situó dentro de los FGFs (Ornitz & Itoh, 2001). El FGF21 humano es un polipéptido de 181 aminoácidos con una similitud de secuencia del 81% con su ortólogo de ratón. La región homóloga de su núcleo forma un dominio globular compuesto por 11 láminas β (a diferencia de los miembros paracrinos, cuyo dominio globular se compone de 12). Estas láminas antiparalelas conforman la estructura β -trébol, que alberga el dominio de unión a heparan-sulfato y el de unión al receptor. Dentro de la subfamilia, FGF21 es más similar a FGF19 que a FGF23 (la semejanza en la secuencia de aminoácidos es de un 34% y un 25% respectivamente). Al tratarse de un miembro de la subfamilia FGF19/15 hace las veces de molécula “*hormone-like*” (Kharitonov & Larsen, 2011; Kharitonov et al., 2008).

Distribución y expresión

La mayor parte de los estudios realizados sobre FGF21 se ha realizado en modelos animales, los datos que se conocen sobre su papel en humanos son limitados. En roedores, se ha observado que FGF21 se expresa principalmente en hígado (Nishimura et al., 2000), en las células β -pancreáticas, en los testículos (Wente et al., 2006), en el músculo esquelético (Izumiya et al., 2008; Ribas, Villarroya, Hondares, Giralt, & Villarroya, 2014), en el tejido adiposo blanco y marrón (Hondares et al., 2011; Muise et al., 2008). En humanos se describió por primera vez en el año 2008 como una proteína circulante (W.-W. Chen et al., 2008; Gälman et al., 2008; X. Zhang et al., 2008).

FGF21 es el FGF endocrino circulante más abundante, seguido de FGF19 y FGF23. El tamaño molecular de FGF21 (32-36kDa dependiendo de su nivel de glicosilación) hace que pueda atravesar la barrera glomerular para poder ser eliminado por los riñones (Angelin, Larsson, & Rudling, 2012). La vida media de FGF21 en suero se ha determinado en 30 minutos tras ser inyectado en primates (Kharitonov et al., 2007). También se ha visto que la edad o el género no afectan a los niveles circulantes de FGF21, pero si la hora del día, ya que los niveles tienden a ser más altos por la mañana que por la tarde (Gälman et al., 2008; S. A. Lee et al., 2012; Yu et al., 2011).

Para que FGF21 pueda llevar a cabo sus efectos tras ser liberado a la circulación requiere de la presencia de su receptor FGFR1 (aunque la interacción con FGFR4 también es posible) y del correceptor β -Klotho en sus tejidos diana, ya que la resistencia a FGF21 se ha ligado a la disminución de β -Klotho (Díaz-Delfín et al., 2012; Gallego-Escuredo et al., 2015). Entre los efectos que se han descrito para FGF21 cabe destacar el efecto beneficioso sobre el metabolismo en animales con afectaciones metabólicas. FGF21 puede reducir el sobrepeso, disminuir los niveles circulantes de glucosa y triglicéridos e incrementar la sensibilidad a insulina. En animales, sus tejidos diana son el hígado, los tejidos adiposos blanco y marrón, el páncreas o el cerebelo.

Inicialmente se vio que la sobreexpresión hepática de FGF21 estaba regulada por PPAR α en condiciones de ayuno o de dieta cetogénica. En humanos, por el contrario, no se obtiene la misma respuesta frente al ayuno, no al menos con la misma celeridad. Se requieren 7 días de

ayuno para observar un aumento significativo en los niveles circulantes de FGF21, mientras que esta respuesta en ratones se obtiene tras un ayuno de 12 horas. Sin embargo, en estados patológicos humanos asociados al síndrome metabólico si se observan concentraciones circulantes más pronunciadas de FGF21, que llegan a correlacionarse con la gravedad de la enfermedad (Gallego-Escuredo et al., 2015). Es por esto que se ha propuesto que pueda existir una resistencia a FGF21 en estas situaciones (Fisher et al., 2010) al igual que ocurre con la leptina o la insulina en la obesidad, donde los niveles están muy elevados por la resistencia sistémica a estas hormonas.

Con los datos que se conocen hasta la fecha, se puede decir que la importancia que FGF21 tiene sobre el metabolismo es mayor en ratones que en humanos (Figura 29). En ratones por ejemplo la tiroxina estimula la producción hepática de FGF21 y su secreción a la circulación, hecho que no se observa en humanos (Adams et al., 2010).

Efectos fisiológicos de FGF21

- FGF21 en el hígado

Los FGFs endocrinos funcionan como hormonas que mantienen estados metabólicos específicos mediante el control de la homeostasis de múltiples factores como los ácidos grasos, la glucosa, los ácidos biliares y otros (M. Giralt, Gavaldà-Navarro, & Villarroya, 2015). Aunque FGF21 se describió en el año 2000, no fue hasta el 2005 cuando se describieron sus acciones sobre el metabolismo. En este año se demostró como FGF21 era capaz de mejorar la sensibilidad a insulina en ratones, ya que estimulaba la captación de glucosa en adipocitos (Kharitonov et al., 2005). Más tarde se constató una fuerte inducción de FGF21 en el hígado de ratones tras el ayuno de 12 horas o tras proporcionarles una dieta cetogénica. Esta inducción requería del receptor de ácidos grasos PPAR α (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Lundåsen et al., 2007). Como se ha demostrado en varios estudios, FGF21 es vital para la cetogénesis que se da en respuesta al ayuno. Ratones transgénicos que sobreexpresan FGF21 específicamente en hígado muestran un aumento en la producción de cuerpos cetónicos y una consecuente disminución de triglicéridos hepáticos y circulantes (Inagaki et al., 2007). Por otra parte, la disminución de FGF21 en el hígado de ratones *knockdown* para esta hormona hace que estos animales no puedan adaptarse a la cetosis inducida por una dieta cetogénica (Badman et al., 2007).

FGF21 es un importante factor en la oxidación de ácidos grasos hepáticos mediante un mecanismo regulado por PPAR α (Hondares et al., 2011). El gen que codifica para FGF21 posee un elemento de respuesta a PPARs (PPRE) que se activa durante el ayuno por el complejo PPAR α /AGL/RXR (Figura 28). En condiciones de ayuno los niveles de cuerpos cetónicos y de ácidos grasos circulantes aumentan. Los ácidos grasos se unen al receptor PPAR α que a su vez se internalizará y translocará al núcleo asociándose con el receptor RXR formando el complejo PPAR α /AGL/RXR capaz de unirse al elemento PPRE del gen de FGF21, activando así su transcripción (Badman et al., 2007). Este mecanismo de acción se ha podido comprobar mediante el uso de ratones PPAR α KO, en los que no hay efectos de sobreexpresión de FGF21 por ayuno (Lundåsen et al., 2007). La administración intravenosa de ácidos grasos en humanos también hace que aumenten los niveles de FGF21 circulantes. No solo eso, existe una correlación en los

cambios de los niveles circulantes de FGF21 con los cambios en los niveles circulantes de ácidos grasos libres (Mai et al., 2009). Cuando el ayuno se prolonga, FGF21 también puede controlar la gluconeogénesis mediante la activación del coactivador transcripcional PGC-1 α , encargado de controlar la expresión de varios genes gluconeogénicos en hígado (Matthew J Potthoff et al., 2009). FGF21 podría actuar sobre la expresión de los genes gluconeogénicos directamente ya que experimentos realizados por Fisher et al. en el año 2011 con ratones carentes de PGC-1 α se observa el mismo aumento de los genes gluconeogénicos.

En hígado de ratón y en cultivo primario de hepatocitos humanos se ha podido comprobar cómo ligandos artificiales de PPAR α , como fenofibratos, son capaces de inducir la expresión de FGF21 mientras que en hígados de ratones PPAR α *knockdown* específicos de hígado se perdía completamente la inducción (Badman et al., 2007; Iizuka, Takeda, & Horikawa, 2009). Un grupo japonés demostró mediante el uso de hepatocitos primarios de ratón y estudios de promotor humano de FGF21 que la respuesta al ayuno está regulada de dos maneras independientes: mediante PPAR α y mediante la señalización glucagón-PKA (proteín kinase A) (Iizuka et al., 2009). Este grupo también ha identificado un elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE) a través del factor ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein*), sobre el cual la glucosa es capaz de incidir para activar la transcripción de FGF21. Este elemento se sitúa también en el promotor del gen codificante para FGF21 pero más proximal que el elemento PPRE (Figura 28).

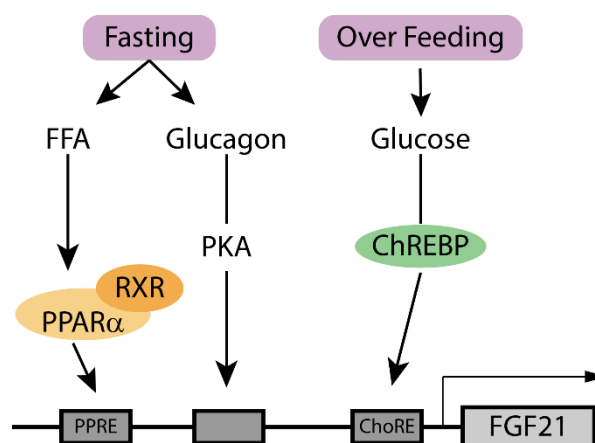


Figura 28. Esquema de la regulación del FGF21 humano en respuesta al ayuno y a la sobrealimentación. (Uebanso et al., 2011). FFA, Ácidos grasos libres.

Se ha demostrado que la administración de FGF21 recombinante a ratones genéticamente obesos puede mejorar su glucemia tras el ayuno, incidiendo en la regulación del flujo de la glucosa hepática y mejorando la sensibilidad a insulina (Berglund et al., 2009).

En cuanto a PPAR α , se conoce que sus ligandos inducen la expresión de determinados enzimas que promueven la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis. En ratones se pueden observar estos efectos tras la administración crónica de FGF21 recombinante, se consigue mediante este modo la reversión del hígado graso y de otras patologías asociadas a la obesidad inducida por la

dieta gracias a la inhibición de SREBP-1 (*Sterol regulatory element binding protein-1*), factor crítico para la lipogénesis (Xu et al., 2009). En ratas con obesidad inducida por dieta, la administración crónica de FGF21 consigue inhibir la producción de glucosa hepática y la expresión de genes gluconeogénicos gracias a que mejora la sensibilidad a insulina (Sarruf et al., 2010).

En el año 2013, el grupo de Kliewer y Mangeldorf describió el papel que FGF21 ejercía sobre el sistema nervioso central para la regulación del metabolismo, el ritmo circadiano y sobre el control de la reproducción. Demostraron que las acciones que FGF21 ejerce se deben a la expresión de β -Klotho en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y en el complejo dorsal vago del rombencéfalo. De esta manera describieron un eje regulatorio entre el hígado y el cerebro (Bookout et al., 2013). FGF21 actúa a nivel hipotalámico y del rombencéfalo para incrementar los niveles de corticoesteronas que tienen la capacidad de estimular el hígado sin que FGF21 participe de manera autónoma en la gluconeogénesis hepática (Owen et al., 2013; Matthew J Potthoff et al., 2009). El efecto que el ayuno tiene sobre la fertilidad y el control de la reproducción es conocido. En épocas de carencia nutricional la capacidad reproductiva se pierde a favor de la supervivencia materna, este proceso adaptativo se encuentra altamente conservado en animales. Se había descrito anteriormente que las hembras, pero no los machos, que sobrexpresaban FGF21 eran infértiles. En ratones hembra a las que se administra crónicamente FGF21 o se sobrexpresan de manera transgénica imitando los niveles fisiológicos que se observan en el ayuno, se hace creer al organismo que se encuentra en un estado de carencia nutricional inapropiado para la reproducción. FGF21 actúa sobre el hipotálamo (en el eje hipotalámico-neuroendocrino), suprimiendo la cascada de señalización necesaria para la ovulación. Estas hembras presentan hipogonadismo que causa su pérdida de fertilidad (Owen et al., 2013).

Los efectos de FGF21 sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos involucran la regulación de PPAR α en el hígado y de PPAR γ en los adipocitos. El tratamiento de ratones obesos con FGF21 hace que aumente la oxidación de ácidos grasos hepáticos, reduciendo los niveles circulantes e inhibiendo la lipólisis en el tejido adiposo. El FGF21 también contribuye a la reducción de la resistencia a la insulina, tanto a nivel hepático como sistémico (Woo, Xu, Wang, & Lam, 2013). En humanos, los niveles de FGF21 se encuentran elevados en situaciones de resistencia a insulina, en patologías de dislipemia, hígado graso no alcohólico (Dushay et al., 2010; H. Li et al., 2010), afectaciones coronarias (Z. Lin et al., 2010), o en casos de ovarios poliquísticos (Gorar et al., 2010).

- FGF21 en el tejido adiposo blanco

En el tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*), el receptor PPAR γ y sus agonistas (ácidos grasos, fármacos de sensibilización a insulina como rosiglitazona) son quienes estimulan la producción de FGF21. La insulina hace que se formen vesículas que internalizan los transportadores de glucosa GLUT4 (*Glucose transporter type 4*), por el contrario, la acción de FGF21 sobre el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo blanco es otra. En células 3T3-L1 se ha observado como FGF21 estimula la captación de glucosa de manera independiente a insulina, mediante el aumento de la presencia del transportador GLUT1 (Figura 29)

(Kharitononkov et al., 2005). En ratones obesos a los que se les administra conjuntamente insulina y FGF21 se da una reducción de la glucemia mayor que administrando insulina solamente. Este hecho se da gracias a un efecto aditivo de la insulina y el FGF21 que hace que la captación de la glucosa por parte del tejido adiposo blanco sea mejor. En otra serie de experimentos se observó como el elemento de respuesta a carbohidratos ChREBP que se encuentra estimulado durante la diferenciación adipocitaria (He, 2004) es capaz de incrementar los niveles de FGF21 durante este proceso del mismo modo que lo hace la estimulación con agonistas de PPAR γ (X. Zhang et al., 2008). Estos dos mecanismos podrían actuar de manera coordinada en los adipocitos, regulando la expresión de FGF21.

El cuanto a metabolismo lipídico se refiere, las primeras funciones que se atribuyeron a FGF21 fueron las de estimular la lipólisis (Inagaki et al., 2007). En adipocitos humanos sin embargo, el efecto observado es el contrario, la inhibición de la lipólisis, o ningún efecto sobre este proceso (Arner et al., 2008). La acción de FGF21 sobre los adipocitos y la lipólisis aún no se comprenden del todo. En ratones se ha demostrado que FGF21 puede inhibir la lipólisis inducida por la hormona del crecimiento GH (*Growth hormone*) que la pituitaria secreta en respuesta al ayuno mediante un loop de regulación de retroalimentación positiva (W. Chen et al., 2011).

En cultivo, en células 3T3-L1, el tratamiento de FGF21 y el agonista Rosiglitazona incrementa la capacidad transcripcional de PPAR γ , lo que promueve la expresión de β -Klotho (W. Chen et al., 2011; Kharitononkov et al., 2008), lo que hace que aumente la degradación de triglicéridos en los adipocitos (Cuevas-Ramos et al., 2012; Moyers et al., 2007). En estado de alimentación, PPAR γ estimula la producción de FGF21 en los adipocitos (no en hígado), lo que crea un loop cerrado, ya que el FGF21 actúa de manera autocrina sobre PPAR γ reforzando su actividad sin que los niveles de FGF21 circulantes varíen (Dutchak et al., 2012; Qiang & Accili, 2012). Se ha visto también que los ratones FGF21 KO son deficitarios en la vía de señalización de PPAR γ , no pudiendo activar los genes lipolíticos, lo que les impide poder disminuir de grasa corporal. Se ha demostrado que en estos ratones, PPAR γ se encuentra sumoilizado, modificación que inactiva su señalización. Por consiguiente, se infiere que FGF21 toma parte en las modificaciones postraduccionales que incrementarían la actividad de PPAR γ (Dutchak et al., 2012).

Por lo tanto, en el tejido adiposo blanco, FGF21 actúa como un factor autocrino en estado de alimentación, regulando la función del adipocito mediante la interacción con PPAR γ (Arner et al., 2008; Woo et al., 2013)

Otro modo por el cual FGF21 regula el metabolismo es como modulador en la regulación de las citoquinas secretadas por el tejido adiposo, las adipoquinas. FGF21 transmite la situación nutricional al adipocito para que este secrete las adipoquinas pertinentes en función de las necesidades específicas. FGF21 y las adipoquinas son importantes para los efectos antidiabéticos de PPAR γ (Kubota et al., 2006; Nawrocki et al., 2006). Varios grupos han observado como FGF21 está implicado en la regulación de los niveles de leptina y adiponectina, disminuyendo los niveles de la primera y aumentando los de la segunda.

FGF21 también puede disminuir la cantidad de ceramidas presentes en el hígado y en la circulación de una manera dependiente de adiponectina, ejerciendo así como agente antilipotóxico.

Finalmente, la obesidad se ha propuesto como un estado de resistencia a FGF21. Tanto en humanos obesos como en modelos de obesidad en ratón se observan altos niveles de FGF21 circulantes. En los experimentos realizados por Fisher et al. en el año 2010 con el modelo de ratón obeso, estos niveles de FGF21 provienen de la producción hepática, pero no se detectan los efectos beneficiosos que cabría esperar por parte de esta hormona. Además, este grupo pudo demostrar como los tejidos eran resistentes a FGF21 ya que la señalización intracelular estaba completamente impedida en los animales obesos. Otros grupos sin embargo han discrepado con este hecho, ya que en otros modelos de obesidad en ratones (inducida por dieta y ratones hiperfágicos *Ob/Ob*) sí observaban una mejora del perfil metabólico tras la administración de FGF21 recombinante humano (Hale et al., 2012; Reinehr, Woelfle, Wunsch, & Roth, 2012).

El sistema de FGF21 en el tejido adiposo blanco humano no se conoce tan bien como en ratones ya que poca es la información existente al respecto hasta la fecha. En cultivo de líneas adipocitarias humanas sí que se expresa y detectan niveles de FGF21. En biopsias del tejido adiposo humano por el contrario, los niveles de expresión son prácticamente indetectables a diferencia de los ratones (Dushay et al., 2010).

- FGF21 en el tejido adiposo marrón

No solo el tejido adiposo blanco es capaz de producir y secretar FGF21, el tejido adiposo marrón (BAT, *Brown adipose tissue*) también lo es (Cereijo, Giralt, & Villarroya, 2015). Al exponer ratones a frío agudo o mediante el uso de estimuladores β -adrenérgicos se induce el programa termogénico en el BAT (Chartoumpekis et al., 2011). La inducción de la termogénesis tiene como consecuencia un aumento en la expresión génica de FGF21 (Figura 29). Tras la estimulación noradrenérgica se activa una potente vía de señalización en la que interviene cAMP (*3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*) que regula la transcripción de *Fgf21* (Hondares et al., 2011). FGF21 es un factor clave en la adaptación al frío en ratones neonatos (Hondares et al., 2010). La leche materna, rica en ácidos grasos, hace que durante la lactancia se estimule PPAR α , lo que provoca un aumento en la producción de FGF21 en el hígado que se traduce en los niveles circulantes. Como consecuencia del aumento de FGF21 se induce la expresión de genes termogénicos en el BAT claves para el proceso adaptativo al frío.

Además, cuando la exposición a frío se prolonga, se observa el fenómeno de *browning* en el tejido adiposo blanco. El tejido adiposo blanco empieza a adquirir características del marrón, como la expresión de los genes *Ucp1* y *Pgc1 α* . El proceso de adquisición del fenotipo de BAT se ha atribuido a la acción de FGF21 (Fisher et al., 2012).

Finalmente, también se ha descrito como durante la exposición al frío, el FGF21 secretado y circulante sería capaz de llegar al cerebro para actuar sobre el sistema nervioso central, donde regularía la ingesta de alimentos y ajustaría el gasto energético (Tan et al., 2011).

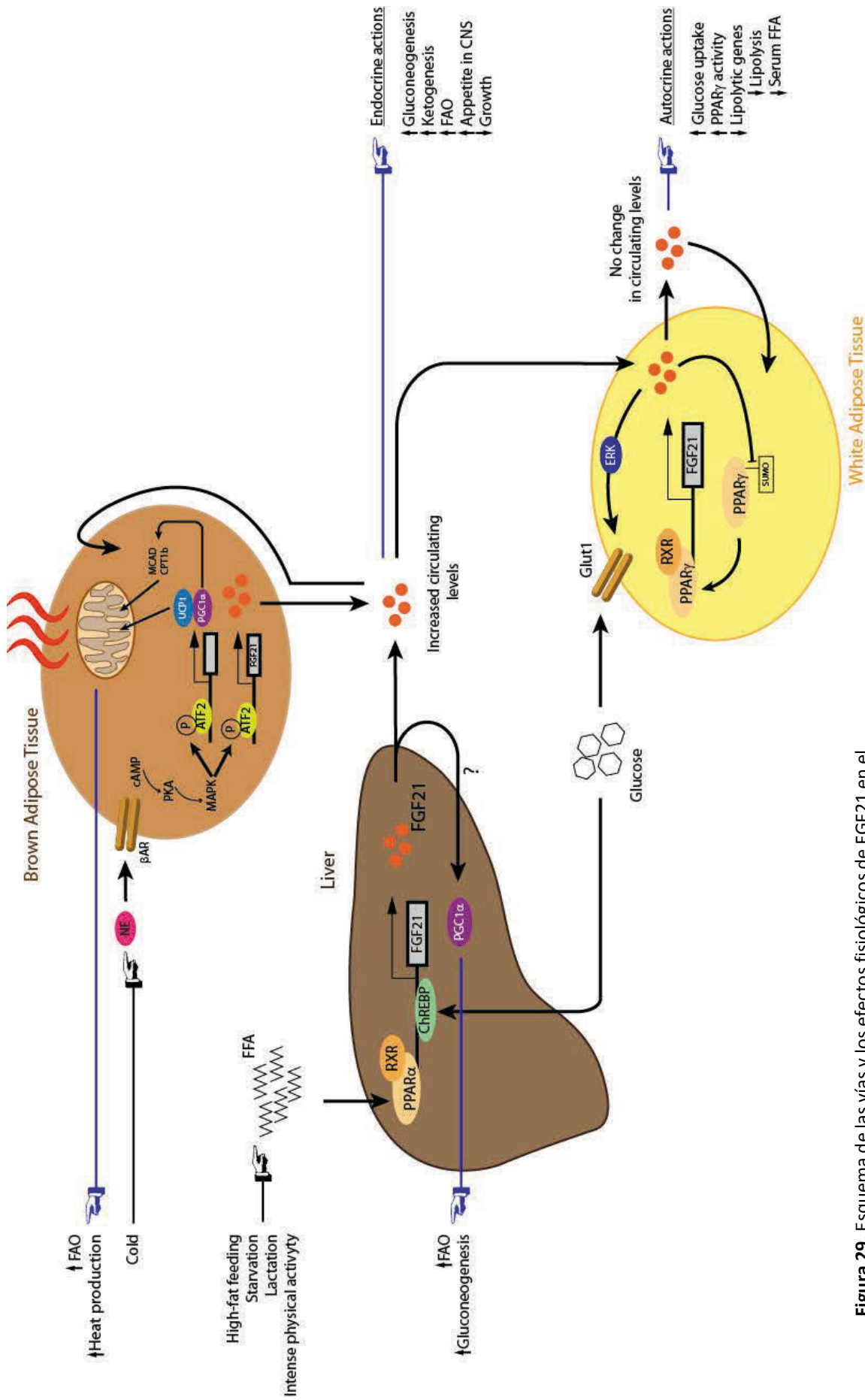


Figura 29. Esquema de las vías y los efectos fisiológicos de FGF21 en el hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón.

- FGF21 en el corazón

Hasta la fecha de inicio de la presente tesis, la información que unía al corazón y a FGF21 era más bien escasa. Se había descrito que la isquemia del miocardio producía un aumento en la expresión génica y también a nivel de proteína de FGF21 en el hígado de los animales afectados (S. Q. Liu & Wu, 2010; S. Q. Liu, Tefft, Zhang, et al., 2011), pero en general se descartaba al corazón como órgano productor o diana de FGF21.

En un sistema fisiológico integrado, el daño en un órgano puede incurrir en respuestas en otros órganos mediante cambios en el organismo o mediante regulaciones hormonales. Estas respuestas pueden incrementar la protección del órgano dañado para así garantizar su supervivencia, lo que podría resultar crítico en el caso de órganos vitales, especialmente cuando su capacidad para la regeneración es limitada, como el corazón. Los experimentos realizados por Shu Q. Liu muestran una respuesta en el hígado tras producir isquemia de miocardio por ligadura de la arteria coronaria en ratones (S. Q. Liu & Wu, 2010). En esta respuesta observaban como se daba un incremento en la transcripción génica de proteínas secretables del hígado y una movilización de hepatocitos al torrente sanguíneo. Entre las 9 proteínas de secreción que encontraron inducidas tras el daño cardiaco, FGF21 resulto ser una de ellas (S. Q. Liu & Wu, 2010). En un trabajo posterior observaron cómo además de inducirse en hígado el mRNA, la proteína también estaba inducida y había niveles circulantes más altos de FGF21 (S. Q. Liu, Tefft, Kharitonov, et al., 2011). Al administrar FGF21 recombinante inmediatamente después de producir la isquemia se atenuaba la extensión del infarto y mejoraba la actividad cardiaca. Los mismos resultados se observaron en animales transgénicos que sobreexpresan FGF21 sistémicamente. Por otra parte, al inyectar FGF21 a ratones sanos observaban que varias proteínas de los cardiomiocitos se encontraban fosforiladas: FGFR1, PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*), Akt y BAD. Las mismas proteínas estaban fosforiladas en los cardiomiocitos de ratones a los que se les había practicado la isquemia (S. Q. Liu, Tefft, Kharitonov, et al., 2011). Por último, este grupo describió como la isquemia cardiaca no solo hace que el hígado sobreexpresen y secreten FGF21, ya que el tejido adiposo blanco también responde e induce la expresión de FGF21 (S. Q. Liu et al., 2013).

Otras funciones

Además de la contribución al metabolismo de la glucosa y al metabolismo lipídico, FGF21 tiene también otras implicaciones de relevancia que caben ser destacadas. Se ha descrito su participación en el incremento del *lifespan* o longevidad, implicación en el crecimiento y en la pérdida de la osificación.

- FGF21 en el crecimiento

En ratones, se ha descrito que la sobreexpresión de FGF21 genera un fenotipo adicional que consiste en un tamaño corporal más pequeño. Este fenotipo se da por el efecto de ahorro de energía que tiene el FGF21 sobre el organismo (M. J. Potthoff, Kliewer, & Mangelsdorf, 2012). En el año 2008, Inagaki et al. demostraron que la inducción de FGF21 por efectos del ayuno causaba

un estado de resistencia a la hormona de crecimiento (GH), lo que a su vez aumentaba los niveles de la última. En el hígado, esto sucedía al provocar FGF21 una disminución en la concentración de STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*), un factor clave en la cascada de señalización de GH, provocando un descenso de la expresión de los genes diana, como por ejemplo IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*). Por otra parte, se inducía también la expresión hepática de la IGFBP1 (*IGF-1 binding protein 1*) y el SOCS2 (*Suppressor of cytokine signaling 2*), el cual desfosforila STAT5 dejándolo inactivo y reduciendo aún más la señalización de la GH (Inagaki et al., 2008). En el año 2010 un artículo sugería que la resistencia a la hormona de crecimiento que ocurre en la anorexia nerviosa (estado crónico de privación nutricional) se producía como consecuencia de los altos niveles de FGF21 y según el mecanismo descrito por Inagaki (Fazeli, Misra, Goldstein, Miller, & Klibanski, 2010).

- Incremento del *lifespan*

La exposición crónica a la hormona FGF21 incrementa la supervivencia, o *lifespan*, en ratones entre un 30 y un 40% dependiendo de si son machos o hembras sin disminuir su ingesta (Y. Zhang et al., 2012). Esta prolongación de la longevidad es comparable a la observada en situaciones de restricción calórica (Turturro et al., 1999). En el mismo estudio pudieron observar que la restricción calórica no afecta a los niveles de FGF21 circulantes. La utilización de ratones transgénicos que sobreexpresan FGF21 ha permitido descubrir que FGF21 bloquea la vía de señalización GH/IGF-1 (*Growth hormone/Insulin-like growth factor-1*) en el hígado, del mismo modo que lo hace la restricción calórica y mediante el mecanismo que se ha descrito en el apartado superior sobre la vinculación del FGF21 y el crecimiento.

- Inhibición de la osteoblastogénesis.

Estudios de diferenciación de los BMMSCs (*Bone marrow mesenchymal stem cells*) han permitido demostrar que el FGF21 inhibe la osteoblastogénesis pero estimula la adipogénesis de tipología BAT a través de la activación de PPAR γ (Dushay et al., 2010; Gälman et al., 2008). El mecanismo propuesto es el siguiente: FGF21 forma un *loop* positivo con PPAR γ , de manera que los ligandos de éste último incrementan la expresión de FGF21 y de su correceptor β -Klotho en las células BMMSCs. A su vez, FGF21 es capaz de acrecentar la actividad transcripcional de PPAR γ mediante la inhibición de una sumoilización concreta que inactiva la activación de PPAR γ (Dutchak et al., 2012; Gälman et al., 2008; Wei et al., 2012). Al activar PPAR γ se consigue que los precursores de células óseas se diferencien hacia tejido adiposo marrón en vez de en osteoblastos, lo que crearía un desequilibrio osteoblastogénico. Esta problemática hace frente a los posibles efectos beneficiosos que una terapia con FGF21 recombinante pudiera tener frente a la diabetes por ejemplo, ya que se incurriría en una posible debilidad ósea. A pesar de estas averiguaciones, en humanos se ha visto que existe una correlación positiva entre el nivel circulante de FGF21 y la densidad ósea (BMD) en mujeres, por lo que parece que la descalcificación observada en animales no se traslada tan sencillamente a humanos (P. Lee et al., 2013).

FGF21 en humanos

En humanos, se ha observado que los niveles circulantes de FGF21 solo varían tras largos periodos de ayuno (7 días), bajo dietas cetogénicas o durante la lactancia (Christodoulides, Dyson, Sprecher, Tsintzas, & Karpe, 2009; Dushay et al., 2010; Gälman et al., 2008) sugiriendo que la regulación y función de FGF21 es diferente que en ratones. En la mayoría de los estudios realizados se ha visto que existe una correlación positiva entre los niveles circulantes de FGF21 y el hecho de si los individuos padecían sobrepeso o padecían alguna patología asociada a síndrome metabólico (Cuevas-Ramos et al., 2010; X. Zhang et al., 2008), diabetes de tipo II (Chavez et al., 2009; C. Chen et al., 2011), reducción de la tolerancia a la glucosa, esteatosis hepática no alcohólica (An et al., 2012; Dushay et al., 2010) y también correlaciona con alguna afectación cardiovascular. Del mismo modo, en humanos, los niveles circulantes de FGF21 correlacionan positivamente con el nivel de adiposidad del individuo y los niveles de ácidos grasos libres en plasma (Mai et al., 2009), pero negativamente con los niveles de colesterol HDL (*High-density lipoprotein*), denominado “colesterol bueno”. Existen fuertes discrepancias entre los resultados dependiendo del modelo utilizado, como en el caso de pacientes con diferentes tipologías de anorexia (Uebanso et al., 2011). Mientras que en adultos si se ha observado una correlación entre los niveles de FGF21 y el síndrome metabólico (X. Zhang et al., 2008), en niños no se ha observado (Reinehr et al., 2012). En humanos se ha observado también una correlación entre los niveles de FGF21 y la actividad física de los sujetos con síndrome metabólico (Cuevas-Ramos et al., 2010).

Los efectos de FGF21 a nivel sistémico son complejos y dependen en gran medida del contexto fisiológico y patológico. A pesar de todo, el motivo por el cual incrementan los niveles de FGF21 en patologías metabólicas aún no se conoce muy bien. Algunos grupos sugieren que la obesidad y la resistencia a insulina causan también una resistencia a las acciones de FGF21 en humanos (Reinehr et al., 2012), donde se modifican los niveles circulantes de FGF21 en función del ritmo circadiano. Probablemente se da algún mecanismo de desensibilización durante el día ya que se pueden detectar niveles más altos que durante la noche (Yu et al., 2011). Por el contrario, otros grupos creen que se trata de una respuesta compensatoria (Fisher et al., 2010; Hale et al., 2012). Bajo condiciones patológicas, el incremento del FGF21 circulante comportaría un aumento de la oxidación de ácidos grasos y de la utilización de la glucosa para contrarrestar los efectos deletéreos de la lipotoxicidad y la glucotoxicidad (Cuevas-Ramos et al., 2012).

Para añadir más complejidad a este sistema, cabe mencionar que existe poca información sobre los niveles de expresión de los correceptores de los FGFs en humanos, aunque si se conoce la interacción de los FGF endocrinos con sus respectivos FGFRs y el cofactor Klotho correspondiente. Un artículo reciente de nuestro grupo ha evidenciado que en obesidad, donde existe un estado proinflamatorio, se da una reducción acusada de los niveles de β -Klotho por la acción de TNF α (*Tumor necrosis factor α*) y donde la vía JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*) está implicada. Esto hace que las acciones de FGF21 disminuyan (Díaz-Delfín et al., 2012).

En cuanto a tratamientos se refiere, un estudio que incluía el tratamiento de pacientes hipertriglicéridémicos con fenofibratos (agonistas de PPAR α) sirvió para describir el rol central de PPAR α en la expresión de FGF21 del mismo modo que en ratones (Gälman et al., 2008), también se confirmó así la vía durante el ayuno glucagón-PKA (Uebanso et al., 2011). Otro estudio

realizado en adipocitos humanos permitió descubrir como el tratamiento con FGF21 recombinante durante 3 días era capaz de inhibir la lipólisis estimulada por catecolaminas y por el factor natriurético atrial (ANF) (Arner et al., 2008). Este hecho junto con la correlación positiva que existe entre niveles circulantes de FGF21 y AGL en función del ciclo circadiano, se ha podido ver que los niveles de FGF21 circulantes aumentan 3-4 horas después de que lo hagan los de los ácidos grasos libres. Esto indica que existe un mecanismo de regulación por medio del cual se inhibe el exceso de lipólisis en humanos (Yu et al., 2011).

- FGF21 como tratamiento terapéutico

Los efectos positivos que FGF21 tiene sobre el organismo han hecho pensar que podría ser un buen candidato como fármaco para tratar varias patologías metabólicas. A priori, los tratamientos con FGF21 recombinante que se han realizado en diversos modelos animales que padecen de afectación metabólica han tenido efectos positivos: disminución de la glucemia, incremento de la sensibilidad a insulina, reversión de la esteatosis hepática y la diabetes. Varias publicaciones relatan como la administración de esta hormona a roedores diabéticos mejora su glicemia, disminuye los niveles de triglicéridos y el peso corporal (Coskun et al., 2008).

A pesar de estos resultados tan prometedores, la administración crónica de FGF21 como tratamiento frente a diabetes de tipo II por ejemplo no está libre de inconvenientes. En ratones se ha observado como este tipo de tratamiento causa fragilidad ósea y potencia la adipogénesis a partir de células mesenquimales óseas (Wei et al., 2012).

En el año 2007, Kharitononkov observó que la administración de FGF21 exógeno a simios diabéticos promovía una mejora de los niveles de glucosa y lípidos circulantes como también reducía el peso corporal (Kharitononkov et al., 2007). A partir de aquí muchos estudios han reportado los efectos metabólicos de la administración de FGF21 recombinante u otras moléculas miméticas o análogas en el tratamiento de la diabetes, tanto en roedores como en primates no humanos. En estos casos los efectos beneficiosos consisten en una mejora en la sensibilidad a insulina (Berglund et al., 2009) y mejora de la funcionalidad de células β -pancreáticas (Wente et al., 2006), supresión de la secreción de glucagón (Kharitononkov et al., 2005), reducción de la lipogénesis hepática y la inducción del gasto energético a través de la activación del tejido adiposo marrón (Coskun et al., 2008; Fisher et al., 2012; Kharitononkov et al., 2005). A pesar de todo, existe una diferencia importante entre el papel fisiológico del FGF21 y los efectos farmacológicos que la administración de una molécula exógena tendría (Angelin et al., 2012; Kliewer & Mangelsdorf, 2010), de manera que sus efectos dependerían, entre otros factores, del fenotipo de cada individuo.

Actualmente no se dispone de toda la información requerida para que FGF21 sea visto como un posible tratamiento en humanos. Su vida-media en circulación es demasiado corta, lo que hace difícil que la molécula recombinante nativa pueda servir de fármaco. Resultaría difícil mantener unos niveles circulantes suficientemente altos como para que ejerzan los efectos deseados sobre los pacientes. Por este motivo, algunos laboratorios han centrado su investigación en encontrar la manera de alargar la permanencia de FGF21 en la circulación (Tabla 6). A partir de este punto, el grupo de Moller comenzó a desarrollar fármacos análogos o miméticos de FGF21 ya que

podrían ser claves para luchar contra las patologías metabólicas (Moller, 2012). Las investigaciones dieron como primer fruto la molécula LY2405319. Esta molécula se testó en el año 2013 con individuos que padecían diabetes de tipo II, administrándoles el compuesto durante 28 días (Gaich et al., 2013). Se comprobó que los pacientes mejoraban su perfil lipídico, disminuían los valores de LDL (Low-density lipoprotein) entre un 20 y un 30%, los valores de colesterol entre un 15 y un 19% y los de triglicéridos entre un 26 y 46%, mientras que incrementaban los niveles de HDL (de un 15 a un 20%). Entre los pacientes tratados se observaba además una tendencia a disminuir de peso mayor que en los individuos control. La homeostasis de la glucosa, menores niveles de glucemia e insulina circulantes, estaba también mejorada (Gaich et al., 2013).

Esta molécula ha sido el primer compuesto mimético de FGF21 que ha llegado a fase 1 de ensayo clínico. Como contrapunto a los buenos resultados, hay que mencionar los efectos adversos que se observaron. El fármaco produjo en algún caso reacciones inmunitarias tras la administración por inyección, lo que produjo el desarrollo de anticuerpos contra la molécula. A pesar de las respuestas inmunes observadas, estas no interferían con la farmacocinética del fármaco ni con sus efectos. A pesar de todo no se ha determinado aún si los efectos adversos observados en roedores sobre la osteoblastogénesis se pueden dar en humanos también.

Además de moléculas análogas el avance farmacológico ha llevado al desarrollo de anticuerpos que imitan la acción de FGF21, capaces de activar su vía de señalización.

En diciembre del 2011 el grupo de Sonoda publico sus resultados que mostraban un anticuerpo (Ab) capaz de unirse y activar el FGFR1 (Tabla 6). Este Ab se probó en un modelo de ratón diabético. El Ab disminuía la glucemia comparado con el grupo control. Este efecto se prolongaba hasta un mes después tras una sola inyección y era además capaz de reducir el peso corporal (Wu et al., 2011). El efecto beneficioso se producía gracias a la acción del Ab sobre el tejido adiposo, ya que un modelo de ratón modificado genéticamente carente de este tejido no recapitulaba los efectos tras la inyección. La compañía farmacéutica detrás de este grupo de investigación no pretende seguir indagando en el desarrollo de este Ab. Esto se debe a que el target del anticuerpo es el FGFR1, pero no específicamente el complejo formado por FGFR1c y β -Klotho. La activación inespecífica y generalizada de un receptor de factores de crecimiento podría tener efectos colaterales impredecibles e indeseados sobre un organismo, de hecho los ratones que se trataron con este anticuerpo presentaban una reducción de fosfatos en el sérum (Cain, 2013; Wu et al., 2011).

La estrategia a seguir sería por lo tanto la activación específica del complejo FGFR1c- β -Klotho por anticuerpos. En el año 2012 otro grupo publicó sus resultados en los que mostraba la posibilidad de hacer eso precisamente (Foltz et al., 2012). El grupo liderado por Yang Li encontró un anticuerpo que se unía y activaba el complejo FGFR1c y β -Klotho, pero no a FGFR1c solamente. En simios diabéticos, este anticuerpo producía pérdida de peso y disminuía la glucemia y los niveles de triglicéridos comparado con el tratamiento control. Este segundo anticuerpo no tenía efectos significativos sobre los fosfatos circulantes. Para cerciorarse de que los efectos beneficiosos de FGF21 se deben a la activación del complejo FGFR1c- β -Klotho presente en el tejido adiposo, observaron como un ratón KO para FGFR1 específico de este tejido no mostraba reducción de la glucemia tras la administración de FGF21. Estas observaciones se ajustaban a lo

descrito con anterioridad (Adams, Yang, et al., 2012). Este estudio es el primero que muestra un anticuerpo capaz de activar un complejo receptor, lo que supone una nueva vía de estudio. Un fármaco que diera la posibilidad de activar la vía de señalización de FGF21 de una manera tejido-específica sería el tratamiento óptimo frente a patologías metabólicas (Cain, 2013)

Nombre y referencia	Compañía	Modificación de FGF21	Resultado de la modificación	t _{1/2}	Especificidad Unión
LY2405319 (Kharitononkov et al., 2013)	Lilly	L118C, A134C S167A ΔHPIP	Disulfuro nuevo que incrementa la estabilidad. Previene glicosilación en levaduras. producto monodisperso	=	FGFR1c/β-klotho FGFR2c/β-klotho FGFR3c/β-klotho
PEG FGF21 (Mu et al., 2012)	Ambrx/ Merck	R131pAcF acoplado a PEG	Un solo lugar reactivo de acoplamiento	↑	FGFR1c/β-klotho FGFR2c/β-klotho FGFR3c/β-klotho
Fc-FGF21(RG) (Véniant et al., 2012)	Amgen	L98R P171G fusión a Fc	agregación reducida degradación in vivo reducida	↑	FGFR1c/β-klotho FGFR2c/β-klotho FGFR3c/β-klotho
CVX-343 (J. Huang et al., 2013)	Pfizer	A129C acoplado a Ab	un solo lugar reactivo de acoplamiento	↑	FGFR1c/β-klotho FGFR2c/β-klotho FGFR3c/β-klotho
FGFR1b/1c Ab agonista (Wu et al., 2011)	Genentech	no basada en FGF21	t _{1/2} aumentada	↑	FGFR1b, FGFR1c
mimAb1 Ab agonista (Foltz et al., 2012)	Amgen	no basada en FGF21	t _{1/2} aumentada	↑	FGFR1c/β-klotho
FGFR1c/β-klotho biespecifico (Smith et al., 2013)	Amgen	no basada en FGF21	t _{1/2} aumentada	↑	FGFR1c/β-klotho

Tabla 6. Nuevas estrategias farmacológicas en desarrollo basadas en FGF21

LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN C/EBP

Los procesos biológicos como la diferenciación, la proliferación o funciones celulares más específicas, requieren la activación de la expresión génica, la cual se controla principalmente a nivel transcripcional. El control de la expresión génica se realiza por medio de distintos factores de transcripción que interactúan con secuencias reguladoras presentes en los promotores y regiones *enhancer* de los genes diana a expresar. La investigación en los últimos 20 años sobre la regulación de la expresión de esos genes ha permitido describir e identificar importantes factores de transcripción que actúan en varias respuestas celulares. La interpretación de la señalización extracelular por el aparato transcripcional es clave para llevar a cabo estas funciones.

Las señales extracelulares pueden llegar al núcleo de diversas maneras, como por ejemplo translocación de proteínas o modificaciones postranscripcionales. Como resultado el proteoma nuclear cambiará al modificarse los complejos proteína-DNA o proteína-proteína ya existentes, dando así lugar a nuevas asociaciones que darán lugar a nuevos patrones de expresión génica. Los factores de transcripción de la familia C/EBP se regulan del mismo modo, ya que muy habitualmente forman complejos con otros factores de transcripción y son modificados postraduccionalmente por medio de fosforilaciones, acetilaciones y ubiquitinizaciones. Las interacciones y modificaciones son las responsables de permitir que los C/EBPs sean factores de transcripción con un rol central en procesos fisiológicos tan dispares como son el metabolismo, la adipogénesis, la fertilidad femenina o la hematopoyesis por citar algunos.

Familia bZIP

La familia de factores de transcripción *CCAAT/enhancer binding proteins* o C/EBPs pertenecen a una familia superior denominada familia bZIP. Los factores de transcripción miembros de la familia bZIP disponen de un motivo de unión a DNA llamado *basic-region leucine zipper*. Esta región bZIP se compone de dos partes o dominios funcionales y estructurales; un dominio de multimerización, la *leucine zipper*, que posibilita la formación de homómeros o heterómeros entre péptidos y una superficie de contacto con el DNA o “región básica” (Figura 30). La familia bZIP es una de las familias de proteínas más extensas y conservadas dentro de los factores de transcripción eucariotas. Varios miembros importantes de esta familia de factores de transcripción son c-jun, c-fos y *cAMP responsive element binding protein* (CREB).

Una característica que todos los miembros de la familia C/EBP tienen en común es que disponen de 3 elementos estructurales. Los anteriormente descritos, propios de la familia bZIP, una *leucine zipper* en el extremo C-terminal y a su lado, una región básica (cargada positivamente) de unión al DNA (cargado negativamente) y una tercera, una región de transactivación en el extremo N-terminal (Agre, Johnson, & McKnight, 1989; Metallo & Schepartz, 1994; Niu, Renshaw-Gegg, Miller, & Guiltinan, 1999; Ramji & Foka, 2002). Posteriormente también se describió un último motivo presente en todos los factores de transcripción C/EBP, una extensión del dominio de dimerización que actúa como un motivo de interacción proteína-proteína para diferentes asociaciones (Junichi Tsukada, Yoshida, Kominato, & Auron, 2011).

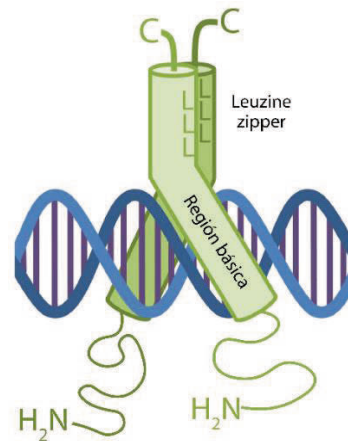


Figura 30. Esquema de interacción de un dímero bZIP con el DNA. Las dos proteínas forman una forma de Y rodeando al DNA dispuesto perpendicularmente. Las L representan los residuos de leucinas que forman la superficie de unión en el dímero. Modificada a partir de Llorca et al. 2014.

Subfamilia C/EBP

La subfamilia de los C/EBP se describió a raíz del descubrimiento de su primer miembro, ahora denominado C/EBP α , que se caracterizó como una proteína presente en hígado capaz de unirse al motivo CCAAT (citosina-citosina-adenosina-adenosina-timidina) de varios promotores víricos al igual que a varios *enhancers* víricos que compartían una secuencia similar a la de CCAAT (Friedman, Landschulz, & McKnight, 1989; Landschulz, Johnson, Adashi, Graves, & McKnight, 1988). Por similitud de secuencia, posteriormente se conformaría la familia de factores de transcripción C/EBP. Esta familia se compone de 6 miembros designados C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ y C/EBP ζ en función del orden de su descubrimiento. Gracias al splicing alternativo y al inicio de traducción regulado son más de 6 los péptidos que se originan. Los genes codificantes para C/EBP α , β y ϵ dan lugar a múltiples péptidos, mientras que los genes para C/EBP γ , δ y ζ codifican para solamente uno (Figura 31) (Claus Nerlov, 2008).

C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ son codificados por genes sin intrones. La isoforma más corta, C/EBP γ , tiene un intrón dentro de la región 5' UTR, pero no dentro de la secuencia codificante. C/EBP ϵ contiene un intrón dentro de la secuencia codificante y el gen para C/EBP ζ presenta 3 intrones, uno de los cuales se halla dentro de la región codificante (Claus Nerlov, 2010; Zahnow, 2002)

Las isoformas C/EBP γ y ζ carecen de homologías funcionales en el extremo amino terminal fuera de la región bZIP. Además, la isoforma C/EBP ζ carece del motivo integro de unión a DNA que si comparten el resto de integrantes de la familia C/EBP. Por otro lado, el estudio de secuencia de proteínas de los miembros C/EBP α , β , δ y ϵ muestra varias regiones altamente conservadas al igual que otras donde difieren, lo que permite distinguir estas isoformas entre sí. Esta región que dota de individualidad es de especial interés en el caso de C/EBP β ya que es susceptible de recibir modificaciones postranscripcionales regulando aún más sus funciones (Kowenz-Leutz, Twamley, Ansieau, & Leutz, 1994; S. C. Williams, Baer, Dillner, & Johnson, 1995).

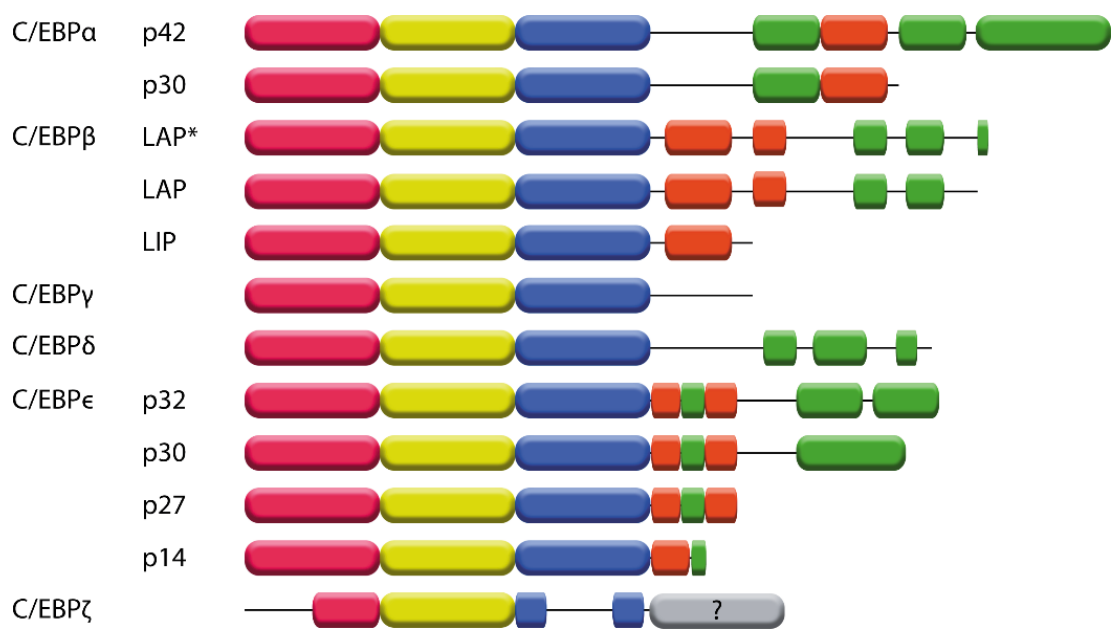


Figura 31. La familia de factores de transcripción C/EBP. Modelo esquemático a partir de Ramji & Foka 2002 y Tsukada et al. 2011 que refleja la estructura modular de los miembros de la subfamilia C/EBP. El dominio de dimerización (*leucine zipper*) se muestra en amarillo. En rosa se muestra la extensión del dominio de unión y al otro lado, flanqueando la *leucine zipper* se encuentra la región básica de unión a DNA aquí representada en azul. La posición de los dominios activadores se muestra en verde y la de dominios inhibidores se presenta en rojo. La ? indica que el amino terminal de C/EBPζ contiene un dominio de activación cuya posición es aún desconocida.

Al ser los C/EBPs unos factores de transcripción muy ubicuos y presentes en la regulación del metabolismo energético, inmunidad innata y adaptativa, inflamación, hematopoyesis, adipogénesis, osteoclastogénesis, ciclo celular, proliferación y diferenciación celular entre otros, han sido muy estudiados. C/EBPα y C/EBPβ son los miembros más estudiados de esta familia, tal vez por ser descritos antes cronológicamente.

C/EBPα

C/EBPα fue el primer miembro de los C/EBP en ser descrito. El mRNA de *C/ebpα* se traduce dando lugar a dos isoformas, la forma completa de 42 kDa (p42) y otra más pequeña de 30 kDa (p30). Es el proceso de traducción el que da lugar a dos isoformas proteicas diferentes a partir de un solo mRNA (Ossipow, Descombes, & Schibler, 1993). Este proceso se detalla en el apartado de C/EBPβ. La diferencia de las formas p42 y p30 radica en la secuencia de aminoácidos del amino terminal. La forma más grande funciona como transactivadora de la expresión génica, mientras que la forma truncada, carece de potencial activador (Calkhoven, Bouwman, Snippe, & AB, 1994). La isoforma completa es capaz de inhibir la proliferación celular, por el contrario la p30 no. Este hecho evidenció que la secuencia aminoacídica de 12 kDa que diferencia a las dos isoformas es necesaria para la actividad antimitótica. Durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 y el desarrollo de hepatocitos se observa un cambio en el ratio p42/p30, lo que apunta a funciones

reguladoras (F. T. Lin, MacDougald, Diehl, & Lane, 1993). Más tarde se demostró como C/EBP α interactúa directamente con las ciclinas 2 y 4 (cdk2, cdk4) inhibiendo su actividad kinasa consiguiendo así arrestar el ciclo celular y la proliferación (H. Wang et al., 2001).

El dominio de transactivación de C/EBP α situado en el extremo amino terminal contiene 3 elementos de transactivación (TE). Estos elementos actúan sinérgicamente entre sí para activar la expresión génica. El primero (TE I) es un potente transactivador. El segundo (TE II) no muestra actividad activadora o inhibidora. El tercero (TE III) tiene potencial activador pero más débil que el de TE I. Se ha demostrado *in vitro*, como los elementos TE I y TE II cooperan para unirse a dos componentes del aparato basal transcripcional de la RNA polimerasa II. Estos elementos son la *TATA binding protein* (TBP) y el *transcription factor II B* (TFIIB). Los elementos de unión en C/EBP α a TBP y TFIIB requieren secuencias de aminoácidos específicas que se conservan entre todas las isoformas activadoras de los C/EBPs (C Nerlov & Ziff, 1995; Pei & Shih, 1991).

En ratón, C/EBP α es capaz de unirse a su promotor para aumentar su actividad hasta 3 veces, por lo que es capaz de autorregular su expresión (Legraverend, Antonson, Flodby, & Xanthopoulos, 1993). En humanos, el promotor de *C/ebp α* carece de motivo de unión para la proteína C/EBP α . A pesar de ello también puede autorregularse ya que C/EBP α estimula la unión de USF (*upstream stimulating factor*) a sus secuencias consenso. Una de estas secuencias consenso se encuentra precisamente en el promotor de *C/ebp α* , por lo que es mediante este mecanismo como en humanos puede autorregular la activación de su expresión 2-3 veces (N. Timchenko et al., 1995).

Otra vía para la sobreexpresión de C/EBP α es mediante las hormonas tiroideas. El promotor de *C/ebp α* presenta un elemento TRE-1 que posee un elemento de respuesta del tipo ER2 regulado por hormonas tiroideas. Por lo tanto, estas hormonas regulan positivamente y de manera directa la expresión de *C/ebp α* (Menéndez-Hurtado, Santos, & Pérez-Castillo, 2000).

C/EBP α se describió en el hígado. Este órgano es uno de los tejidos donde su expresión es más abundante, por ello quizás *C/ebp α* ejerce un control central en el metabolismo (McKnight, Lane, & Gluecksohn-Waelsch, 1989). Los ratones KO para *C/ebp α* mueren al poco tiempo de nacer con una grave hipoglicemia. La causa es la baja expresión de la encima glicógeno sintasa, que hace que los fetos nazcan con niveles indetectables de glicógeno en su hígado. Los animales KO presentan también una baja expresión de las enzimas gluconeogénicas, glucosa-6-fosfatasa, tirosina aminotransferasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), lo que les impide la síntesis de glucosa *de novo* (N. D. Wang et al., 1995). Estos ratones también presentan niveles más altos de amonio en sangre al tener dificultades en la expresión de las enzimas que conforman el ciclo de la ornitina. Este ciclo es el encargado de la detoxificación del amonio, convirtiendo en urea el amonio resultante del metabolismo de aminoácidos (Kimura et al., 1998). Al generar ratones KO para *C/ebp α* condicionales en edad adulta se conseguía un fenotipo similar, ya que la expresión de enzimas de la síntesis de glicógeno, gluconeogénesis y detoxificación de la bilirrubina estaba infraexpresada (Y. H. Lee, Sauer, Johnson, & Gonzalez, 1997). La carencia de C/EBP α también afecta al tejido adiposo ya que es un factor de transcripción importante en la diferenciación adipocitaria. Este proceso se detalla más adelante (Ramji & Foka, 2002).

C/EBP δ

La isoforma C/EBP δ se clonó por homología al resto de los C/EBPs y se consideraba una forma poco expresada salvo en el caso de la respuesta aguda, donde se encuentra altamente inducida (T. Yamada, Tobita, Osada, Nishihara, & Imagawa, 1997). IL-6 tiene la capacidad de inducir la expresión de C/ebp δ , de aquí su participación en procesos inflamatorios. Al unirse IL-6 a su receptor este se activa y fosforila a STAT3 que se transloca al núcleo y se une al promotor de C/ebp δ , poseedor de un motivo de unión para APRF/STAT3. Se considera que tras estímulos proinflamatorios C/EBP δ (y $-\beta$ también) es la proteína principal que induce la expresión de proteínas SAA (Serum amyloid A), familia de apolipoproteínas asociadas a estímulos proinflamatorios (Ray & Ray, 1994). La expresión de una de estas proteínas, SAA2, proteína de respuesta de fase aguda, se da tras la activación de la vía de NF κ B por parte de IL-6 y IL-11 β . La señalización con IL-1 β hace que la p65-NF κ B se una al promotor de SAA2. La señalización con IL-6 por otra parte, promueve la unión de C/EBP δ y $-\beta$, pero no $-\alpha$, al motivo de unión C/EBP del promotor de SAA2. La dimerización de p65 con C/EBP β , pero especialmente con C/EBP δ tiene un efecto sinérgico sobre la expresión de este factor de respuesta aguda (C. Xia, Cheshire, Patel, & Woo, 1997).

C/EBP δ también juega un papel clave en la activación clásica o M1 de los macrófagos. La activación de la vía de señalización TLR (*Toll like receptor*) mediante la molécula proinflamatoria lipopolisacárido (LPS) o IL-1 conlleva la activación de los macrófagos que expresaran citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α . En ratones con doble *knock out* (KO) C/EBP $\beta\delta$ no se da la expresión de las citoquinas. Por el contrario, cuando el KO es solamente de $-\beta$ o $-\delta$, no se aprecia disminución alguna en la producción de IL-6 o TNF α (Lu et al., 2009; Tanaka et al., 1995).

El papel de C/EBP δ en la diferenciación adipocitaria se describe más adelante, dentro de C/EBP β .

C/EBP δ es un factor de transcripción extensamente expresado (intestino, hígado, sistema nervioso, pulmón, riñón) que modula varios procesos biológicos, incluyendo la diferenciación celular, movilidad, proliferación, quiescencia y muerte celular. La diversidad de funciones depende mucho del tipo celular y de su contexto, pudiendo llevar a cabo tareas opuestas. C/EBP δ reduce la incidencia de tumores en un modelo de cáncer de mama por ejemplo, pero promueve la metástasis. La visión actual que se tiene de C/EBP δ no es de ser un factor necesario meramente para un solo proceso celular. Se trata por el contrario de un factor que modula y matiza las funciones y respuestas celulares a situaciones concretas dependiendo de los estímulos que llegan a una célula determinada y en función del contexto (Balamurugan & Sterneck, 2013).

C/EBP β

C/EBP β es una proteína que guarda una alta homología (71%) de secuencia en los dominios bZIP - región básica y *leuzine zipper* - con C/EBP α (P. Descombes, Chojkier, Lichtsteiner, Falvey, & Schibler, 1990). Como ya se ha mencionado antes, el gen de C/EBP β es un gen sin intrones que puede dar lugar a varias isoformas de diferente longitud al estar algunas de ellas truncadas en el extremo amino-terminal. Estas isoformas se producen por medio de la iniciación de la transcripción alternativa al contener el gen de *C/ebp β* varios codones AUG *in frame* (Figura 32) (Ossipow et al., 1993; Welm, Timchenko, & Darlington, 1999). El hecho de que de un solo mRNA puedan surgir varias proteínas no es solo una característica compartida entre miembros de los C/EBPs, sino que es un mecanismo común en los vertebrados. El mRNA que se obtiene tras la transcripción contiene un pequeño *Open Reading Frame* (ORF) situado 5' al segundo codón de inicio o AUG. Es éste ORF el que permite que el escaneo ribosómico sea menos eficiente y el mecanismo se salte el primer codon de iniciación comenzando la traducción en los AUGs internos (Wethmar et al., 2010). Este fenómeno posibilita la síntesis de las 3 isoformas proteicas provenientes de la traducción del gen de *C/ebp β* : Las *Liver-enriched transcriptional Activating Proteins* (LAPs), la forma completa de 38 kDa (LAP*) y la ligeramente menos pesada de 35 kDa (LAP) que funcionan como activadoras de la transcripción y la *Liver-enriched transcriptional Inhibitory Protein* (LIP) de solo 20 kDa. Al carecer la isoforma LIP de la mayor parte del dominio de transactivación hace las veces de un represor transcripcional dominante-negativo (Patrick Descombes & Schibler, 1991; Ossipow et al., 1993; Welm et al., 1999).

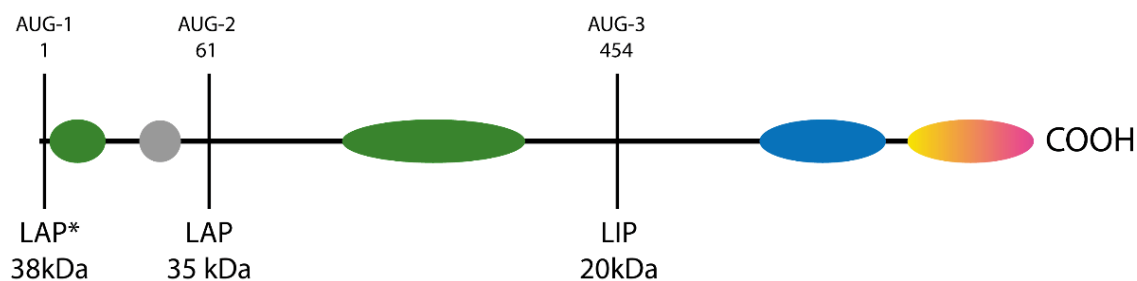


Figura 32. Mapa de inicio de traducción en el mRNA de C/EBP β . Comenzando por la región codificante para el extremo carboxiterminal (COOH) se encuentra el dominio de dimerización. Este dominio se compone de la leuzine zipper (amarillo) y de su extensión (rosa). En azul se indica la región básica de unión a DNA. En verde se identifican los dominios de transactivación y en gris se sitúa el ORF que permite el escaneo laxo por parte de las ribosomas. Este hecho dará lugar a las diferentes isoformas, dependiendo del codón de iniciación que sea elegido. El número de nucleótido indica la posición de la A de cada codón de iniciación. A partir de Uematsu et al. 2007; Tsukada et al. 2011 y Wethmar et al. 2010.

Los C/EBPs en general y C/EBP β en particular están involucrados en diferentes procesos. Por eso y porque C/EBP β tiene formas activadoras e inhibidoras (LAPs y LIP respectivamente) los procesos que regulan qué isoformas se sintetizarán son de gran importancia.

REGULACIÓN DE C/EBP β

- Regulación transcripcional génica

El promotor de C/EBP β contiene varias regiones de unión a factores de transcripción y proteínas reguladoras. Dentro de la región reguladora 5' del gen *C/ebp β* de ratón existen 3 motivos de unión a factores proteicos denominados UF1 (-376 \rightarrow -352), UF2 (-254 \rightarrow -223) y UF3 (-220 \rightarrow -190) y dos motivos Sp1 (-309 \rightarrow -277 y -264 \rightarrow -241). Al tratar ratones con la molécula proinflamatoria lipopolisacárido (LPS), se constató que la proteína C/EBP β se une a los motivos UF1 y UF2 de su propio promotor. Este hecho evidencia la capacidad autorreguladora de C/EBP β en la respuesta de fase aguda (Chang, Shen, & Lee, 1995). En la región reguladora 5' proximal, *upstream* al inicio de transcripción, se halla también una región (-121 \rightarrow -71) próxima a la TATA box importante para la regulación de la expresión de C/EBP β . Dentro de esta región se encontraron 2 localizaciones fundamentales para la formación de complejos. Mediante experimentos de *cross-link*, *super-shift* y competitividad se demostró que CREB (*cAMP-response-element-binding protein*) se une a estas dos localizaciones del promotor de C/EBP β (Niehof, Manns, & Trautwein, 1997). Al mutar estas dos localizaciones se observó que no solo son necesarias para mantener los niveles basales de expresión de *C/ebp β* , sino que también se requieren para la expresión de C/EBP β inducida por CREB. La regeneración hepática en las ratas hace que CREB se fosforile. Mediante análisis por western blot se comprobó cómo en las ratas a las que se les había eliminado quirúrgicamente 2/3 de hígado y lo estaban regenerando, podía encontrarse una relación funcional entre la fosforilación de CREB y la transcripción de C/EBP β (Niehof et al., 1997). Puesto que CREB se fosforila a través de diversas vías, la regulación de la expresión de C/EBP β vía CREB es importante en diferentes situaciones fisiológicas.

Al lado de estas dos localizaciones donde CREB es capaz de unirse se encuentra también un motivo para la unión del propio C/EBP β . Este hecho es importante ya que cuando CREB y C/EBP β dimerizan y se unen a sus respectivos motivos tienen un efecto sinérgico sobre la expresión de C/EBP β . Así también C/EBP β puede autorregular su expresión (Niehof, Kubicka, Zender, Manns, & Trautwein, 2001; Schrem, Klempnauer, & Borlak, 2004).

Estas regiones de unión también están vinculadas a la expresión de C/EBP β mediante la vía de señalización de NF- κ B por medio de IL-6. En procesos inflamatorios la vía de señalización NF- κ B se activa y una de las citoquinas proinflamatorias que se encuentra altamente expresada es la IL-6. La IL-6 fosforila el factor de transcripción STAT3 activándolo y permitiendo así su dimerización y translocación al núcleo, donde se unirá al dímero CREB-C/EBP β . Además de con el dímero CREB-C/EBP β , STAT3 interactúa directamente con el motivo de unión Sp1 del promotor de *C/ebp β* (Berrier, Siu, & Calame, 1998). La interacción de C/EBP β con miembros de las familias CREB o NF- κ B le confiere el control específico de la transcripción de *C/ebp β* en contextos fisiológicos como la inflamación o la respuesta a la fase aguda.

Una vez se activa la transcripción del gen que codifica para C/EBP β , la regulación prosigue de manera postranscripcional sobre el RNA mensajero (mRNA) y postraduccionally sobre las proteínas sintetizadas para dar así lugar a las isoformas funcionales finales.

- Regulación Postranscripcional

- Regulación traduccional de las isoformas de C/EBP β por CUGBP1.

La proteína CUGBP1 (CUG triplet repeat, RNA binding protein 1) se une al mRNA en regiones con tripletes de CUG repetidos. En el mRNA de C/EBP β existen dos regiones con estas características situados en la región 5', entre los codones de inicio de transcripción 1 y 2 (Figura 3). CUGBP1 tiene también la cualidad de asociarse con un polisoma que predominantemente traduce proteínas de bajo peso molecular, como LIP.

Experimentalmente, en un sistema de traducción de extractos celulares de hepatocitos de ratas tratadas con LPS, aumentando la concentración de CUGBP1 en el medio se favorece la síntesis de isoformas de bajo peso molecular. Por lo que cuando CUGBP1 se une al mRNA de C/EBP β , se lleva a cabo la traducción sintetizando predominantemente la isoforma LIP en respuesta de fase aguda (N. A. Timchenko, Welm, Lu, & Timchenko, 1999; Welm, Mackey, Timchenko, Darlington, & Timchenko, 2000).

- Inhibición de la traducción por calreticulina.

La calreticulina (CRT) es una proteína de unión a calcio multifuncional que reside en el retículo endoplasmático y que puede unirse a las estructuras tipo horquilla (hairpin) del mRNA. Los tripletes de nucleótidos GCN repetidos pueden formar estas estructuras hairpin, como en el caso del mRNA de C/EBP β . La interacción de la CRT con las estructuras hairpin hace que la traducción de C/EBPs se inhiba tanto in vitro como in vivo. La mutación de estas regiones GCN hace que las estructuras no se formen y por ende la CRT no se pueda unir, evitando así la inhibición de la síntesis. (L. T. Timchenko, Iakova, Welm, Cai, & Timchenko, 2002). Además, la CRT está involucrada en el desarrollo cardíaco fetal. Durante el desarrollo esta proteína se encuentra altamente expresada y tras la edad fetal su expresión cardíaca desciende rápidamente hasta volverse indetectable en este órgano. Los ratones KO para la calreticulina mueren a día 14.5 de edad fetal y muestran paredes ventriculares con un grosor marcadamente inferior (Mesaeli et al., 1999). Por otra parte, si la CRT se sobreexpresa de manera transgénica tras el nacimiento los ratones mueren de manera súbita por un bloqueo cardíaco acompañado de varios defectos estructurales y funcionales (K. Hattori et al., 2007; Nakamura et al., 2001).

- Regulación Postraduccional

- Regulación proteosomal hepática de las isoformas de C/EBP β por C/EBP α .

Por medio de un sistema de traducción in vitro se describió como la isoforma LIP puede sintetizarse de dos maneras: por traducción alternativa, ya descrito anteriormente, y por medio de proteólisis de la isoforma completa (LAP). En un cultivo celular hepático en el que se sobreexpresaba C/EBP α , la proteólisis de C/EBP β estaba aumentada y por consiguiente la producción de la isoforma LIP (Welm et al., 1999). En un modelo in vivo de ratón que carecía de *C/ebp α* , se demostró que la degradación proteosomal de C/EBP β estaba impedida. El

descenso en los niveles de actividad proteosomal se correlacionaban con el descenso de la isoforma LIP en los hígados de estos animales *C/ebpα^{-/-}* (Burgess-Beusse, Timchenko, & Darlington, 1999).

- Fosforilaciones postraduccionales.
C/EBPβ está sujeto a modificaciones postraduccionales, básicamente fosforilaciones, que hacen que presente distinta afinidad a sus regiones de unión o module su eficacia como factor de transcripción, viéndose así afectada la expresión de sus genes diana. En la siguiente tabla (Tabla 7) se enumeran algunas de las fosforilaciones descritas para C/EBPβ con sus consecuentes resultados.

Lugar de Fosforilación	Quinasa	Resultado
Ser299, Ser277	PK-C, M-K	↓ unión a CCAAT
Ser240	cAMPdPK-A, PK-C	Inhibe unión a DNA
Ser105	PK-C	Aumenta eficacia transcripcional

Tabla 7. Fosforilaciones postraduccionales de C/EBPβ

UNIÓN DE C/EBPβ A ELEMENTOS REGULADORES GÉNICOS

Al caracterizarse C/EBPβ, se identificó como un factor nuclear capaz de unirse al elemento de respuesta IL-1 en el gen de IL-6 (Akira et al., 1990). Desde entonces la secuencia de unión para C/EBPβ se ha identificado en la región reguladora de varios genes asociados a la respuesta aguda, inflamación y hematopoyesis entre otros. Algunos de estos genes son los codificantes para la proteína reactiva C; glicoproteína acida-α1; macroglobulina-α2; hemopexina; haptoglobina; citoquinas como TNFα, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, G-CSF, MIP-1a; y receptores para G-CSF, GM-CSF y M-CSF.

En la caracterización del factor nuclear capaz de incrementar la expresión de IL-6, hoy C/EBPβ, se le atribuyo la misma secuencia consenso de unión a DNA que la isoforma C/EBPα, TKNNGYAAK (donde K = T o G, Y = C o T) (Akira et al., 1990). Posteriores esfuerzos para especificar las secuencias de unión de los C/EBPs a DNA demostraron que las isoformas -α, -β y -δ compartían motivos muy similares con pequeñas variaciones, evidenciando la alta conservación de la región básica de los dominios bZIP (Osada, Yamamoto, Nishihara, & Imagawa, 1996).

Los motivos óptimos de unión de C/EBPs se conforman por secuencias palindrómicas que contienen la secuencia de 5 nucleótidos 5'-ATTGC-3'. Normalmente la secuencia de unión se representa como RTTGC·GYAAY (donde R = A o G, Y = C o T) aunque se han encontrado patrones de unión más complejos (Tabla 8) (Mahony, Auron, & Benos, 2007). Al comparar la afinidad de la unión de la proteína a diferentes motivos del DNA con experimentos de EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) se descubrió que las posiciones ±3 y ±4 eran las más críticas para el reconocimiento y la aidez. Después les seguía la posición ±2; las posiciones ±1 y ±5 situadas en

los extremos de la zona de contacto entre DNA y región básica de unión aportaban baja selectividad (Osada et al., 1996). Por este motivo los homodímeros de C/EBPs pueden unirse a un rango bastante más amplio de secuencias de DNA que otros miembros bZIP. Los factores CREB/ATF de la familia bZIP por ejemplo, presentan una especificidad mayor por las secuencias consenso. Sus secuencias de unión también son palindrómicas pero se componen de dos medias secuencias idénticas e invertidas: TGAC·GTCA (Craig et al., 2001).

Lugar*	Lugar C/EBP homotípico
ALB (AlbD)	TTTT•GTAA
GSTP1 (GPS1)	TTGG•TAAA
CRP	TGGC•GCAA
ORM1	TTGT•GCAA
IL6	TTGT•GCAA
HPX	TGAT•GTAA
TNF	TTTG•GAAA
IL8	TAAT•GAAA
CCR1	TTGT•GTAA
CSF3	TTGT•GAAA
CSF3	TTGT•GGAA
LECT2 (MIM-60)	TTGG•CCAA
LECT2 (MIM-160)	TTTC•CCAA
SV40	TGTG•GAAA
Polyoma	TTTT•GCAA
MSV	GTGG•CCAA
	Lugar compuesto C/EBP•CRE
SLC7A1	TTTC•ATCA
ASNS (NSRE-1)	TTTC•ATCA
DDIT 3	TTGC•ATCA
SLC38A2 (SNAT 2)	TTGC•ATCA
ELANE	TTGC•CCCA
CFS3R	TTGC•AACA
PCK2 (PEPCK)	TTAC•GTCA
IL1B	TTAC•GTCA
BGLAP (OSE1)	TTAC•ATCA

Tabla 8. Lugares de unión de C/EBP β a DNA. * Locus designado o nombre alternativo de la unión. (Junichi Tsukada et al., 2011)

Como ya se ha comentado, se han identificado varios lugares de unión para los C/EBPs en genes celulares y virales. Los motivos de unión varían en algunos casos de las secuencias consenso pero esto puede deberse a que los C/EBPs forman heterodímeros con otros miembros bZIP (Tabla 8). Este hecho amplía aún más el rango de los motivos con los que los C/EBPs pueden interactuar para modular las actividades funcionales y transcripcionales (Junichi Tsukada et al., 2011).

Para unirse a sus elementos de respuesta y poder así activar la transcripción, C/EBP β ha de dimerizarse, formando homodímeros o heterodímeros, tanto con otros miembros de la familia C/EBP o incluso con otras proteínas bZIP. Esta unión aumenta su rango de unión a DNA. Las proteínas pueden formar el dímero y posteriormente unirse al DNA o hacerlo secuencialmente; un monómero se ancla al DNA primero y después la segunda proteína se une al complejo. Esta manera secuencial es la forma más habitual de acoplamiento y también permite que las proteínas encuentren su región de unión más rápidamente (J J Kohler, Metallo, Schneider, & Schepartz, 1999; J. J. Kohler & Schepartz, 2001).

- HOMODÍMEROS

Al formar homodímeros, C/EBP β lo puede hacer con cualquiera de sus tres isoformas. La isoforma LIP se une a la secuencia consenso del DNA con una afinidad mayor que las isoformas activadoras, lo que le hace antagonizar con el potencial activador de las LAP al competir por las regiones de unión al DNA. A la hora de dimerizarse, LIP puede formar homodímeros LIP-LIP o LAP-LIP, lo que puede hacerle inhibir la actividad transactivadora de LAP incluso en ratios subestequiometricos, haciéndose valer de su mayor afinidad de unión a DNA. Es por esto que se dota a LIP de una función dominante-negativa (Patrick Descombes & Schibler, 1991; Ossipow et al., 1993; Zahnnow, 2002).

El ratio en el que las isoformas están presentes varía dependiendo del tipo celular, estadio de desarrollo o como ya se ha descrito antes, mediante procesos que harán que unas isoformas se sinteticen más abundantemente que otras. Por lo tanto, más que las cantidades absolutas, es el ratio LAP:LIP el que es determinante para la actividad de transcripción de C/EBP β (Patrick Descombes & Schibler, 1991; Uematsu et al., 2007).

Como el resto de miembros de C/EBP, LAP y LIP pueden formar dímeros con otros C/EBPs y también con otros factores de transcripción mediante el dominio de multimerización *leuzine zipper*.

- HETERODÍMEROS con C/EBPs

La capacidad de C/EBP β para activar la transcripción puede verse afectada también cuando dimeriza con las isoformas $-\zeta$ y $-\gamma$. La isoforma C/EBP ζ (también llamada CHOP y expresada en respuesta de fase aguda, diferenciación adipocitaria y estrés celular) guarda un gran parecido en lo que respecta a los dominios bZIP comparado con el resto de los C/EBPs, pero difiere en que tiene residuos de prolina y glicina en el dominio de unión a DNA. Estas substituciones impiden la correcta formación de la hélice α en el dominio de unión a DNA (ver Fig 2) y favorecen la heterodimerización con otros C/EBPs (J J Kohler et al., 1999; Metallo & Schepartz, 1997). Este cambio de estructura es el motivo por el cual los dímeros C/EBP ζ -C/EBP β son incapaces de unirse a la secuencia consenso presente por ejemplo en los genes codificantes para *angiotensinogen gene acute-response element* (APRE), *albumin promoter D box* (AlbD) o *fos promoter serum response element* (SRE). Como consecuencia, C/EBP ζ actúa como un regulador negativo al generar dímeros no funcionales impidiendo su unión al DNA (Ron & Habener, 1992). C/EBP ζ se describe también como potenciador de la actividad transcripcional de IL-6. Al presentar C/EBP ζ

una mayor afinidad para dimerizarse con LIP que con las isoformas LAP, secuestra la isoforma inhibidora de C/EBP β impidiendo que se asocie con las formas activadoras LAP*/LAP que si activaran la expresión de IL-6 (T. Hattori, Ohoka, Hayashi, & Onozaki, 2003).

Cuando el heterodímero intrafamiliar es el C/EBP γ -C/EBP β la capacidad activadora también se ve afectada pero no por falta de unión a DNA, puesto que salvando el caso de C/EBP ζ , los C/EBPs contienen dominios de unión básicos casi idénticos. La isoforma γ , que se expresa ubicuamente, carece de dominio de transactivación (Fig 2) y al unirse con C/EBP β reprime el potencial activador en los promotores C/EBP dependientes (Cooper, Henderson, Artandi, Avitahl, & Calame, 1995). En experimentos de transfección, C/EBP γ no actúa ni como activador ni como represor de la transcripción por sí solo. Si tiene por contrario la capacidad de actuar como un regulador dominante negativo al asociarse con C/EBP α o β ya que inhibe su capacidad transcripcional. Funcionalmente, se ha propuesto que C/EBP γ inhibe la transcripción C/EBP-dependiente en células B inmaduras mediante su dimerización con C/EBP β (H M Hu et al., 2000).

- HETERODÍMEROS con bZIPs

Como ya se ha mencionado, la tercera manera que tiene C/EBP β de dimerizarse es mediante unión a otros factores de transcripción bZIP. Este hecho se observó al identificar que el tratamiento con LPS activaba la unión alternativas de dos heterodímeros homotípicos distintos al promotor de IL1B (J Tsukada, Saito, Waterman, Webb, & Auron, 1994). Al tratar una línea de monocitos humana con LPS para inducir la respuesta proinflamatoria y la sobreexpresión de IL1B, se observó cómo C/EBP β se unía a un elemento de respuesta a LPS en el promotor de IL1B. C/EBP β se unía en forma de heterodímero, interaccionando con uno de los factores CREB/ATF4. Los heterodímeros C/EBP β -CREB y C/EBP β -ATF4 se unen eficientemente al elemento de respuesta, pero no sus homodímeros. El primero de los heterodímeros responsable de la inducción de IL1B en presencia de LPS es C/EBP β -ATF4. El segundo es C/EBP β - CREB, que en ausencia de AMPc compite por unirse al elemento de respuesta con C/EBP β -ATF4, lo que suaviza la inducción de IL1B. En presencia del coestimulador AMPc, CREB se fosforila lo que hace que la expresión de ILB1 se super-induzca (Chandra et al., 1995; J Tsukada et al., 1994).

Otro ejemplo en el que el dímero C/EBP β -ATF4 es necesario es en el promotor del gen OSE1, que codifica para la osteocalcina (Tominaga et al., 2008). El factor de transcripción Runx2 es vital para la función de los osteoblastos ya que ATF4 y Runx2 interactúan directamente para la diferenciación osteoblástica. El heterodímero C/EBP β -ATF4 tiene la función de reclutar a Runx2 al promotor de OSE1.

DESARROLLO DE RATONES C/EBP $^{-/-}$

La creación de modelos de ratón carentes de los genes C/ebp ha permitido entender mejor las funciones que las proteínas C/EBPs llevan a cabo. En los ratones C/EBP β -deficientes se pudo comprobar que eran viables pero presentaban varias anomalías; esterilidad de las hembras (Sterneck, Tessarollo, & Johnson, 1997), diferenciación defectuosa del tejido mamario (Zahnow, 2002) y del tejido adiposo (Tanaka, Yoshida, Kishimoto, & Akira, 1997) o función inmunológica

deficiente (Screpanti et al., 1995; Tanaka et al., 1995). Del fenotipo resultante se podían deducir dos grupos de anomalías: 1. Las dadas por defectos específicos en la expresión de genes en células correctamente diferenciadas y desarrolladas (gluconeogénesis hepática, función antibacteriana de macrófagos), o 2. Incapacidad de las células por alcanzar el estadio final de diferenciación (adipocitos, granulocitos, células del epitelio mamario).

La creación del ratón C/EBP β ^{-/-} también sirvió para dejar en evidencia otro fenómeno, el de la posible redundancia entre las isoformas C/EBP. Como se ha mencionado antes, C/EBP β es necesario para la diferenciación de los osteoblastos. La sobreexpresión de LIP bajo el promotor Cola1 específico de hueso causa osteopenia en un modelo animal transgénico (Harrison et al., 2005). Un fenotipo similar se puede conseguir sobreexpresando C/EBP ζ , la isoforma reguladora negativa, en osteoblastos (Pereira, Stadmeier, Smith, Rydzziel, & Canalis, 2007). El hecho de que los animales carentes de C/EBP β no muestren fenotipo óseo alguno, promueve la idea de cierta redundancia con las isoformas C/EBP α y C/EBP δ . Esta teoría también está avalada por experimentos hechos en la línea celular P388 de linfoblastos. Estas células carecen de expresión endógena de C/EBPs lo que impide la inducción de citoquinas proinflamatorias por LPS. La expresión de cualquiera de las isoformas C/EBP α , β o δ es suficiente para promover la expresión de IL-6 o MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) en linfoblastos. Puesto que los animales KO para C/EBP β muestran una expresión normal de citoquinas proinflamatorias, es probable que la falta de C/EBP β se compense con la sobreexpresión de la isoforma δ (H M Hu et al., 2000; Hsien-ming M Hu, Baer, Williams, Johnson, & Schwartz, 1998).

Algunos de los procesos fisiológicos en los que C/EBP β tiene un papel fundamental son la adipogénesis y la respuesta inmune, procesos que también tienen un impacto en las adaptaciones fisiológicas y cardíacas durante la gestación.

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE C/EBP β

Diferenciación adipocitaria

El tejido adiposo blanco, es el tejido adiposo mayoritario y se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo. En mamíferos se encuentra en zonas de tejido conjuntivo laxo, como en las capas subcutáneas entre el músculo y la dermis, pero también rodeando el corazón, los riñones y otros órganos internos. Tradicionalmente, el tejido adiposo blanco se ha considerado un reservorio pasivo de energía. Esta visión ha cambiado actualmente ya que su regulación por medio del sistema nervioso y el endocrino es bien conocida. También tiene un papel importante en la regulación del metabolismo y la homeostasis corporal mediante la producción y secreción de factores endocrinos y paracrinicos, conocidos como adipoquinas (Havel, 2004; Kershaw & Flier, 2004). C/EBP β se ha probado necesario para el desarrollo del tejido adiposo blanco. El linaje adipocitario proviene de células progenitoras mesodérmicas. Si bien los eventos moleculares que permiten que estos progenitores deriven en preadipocitos son desconocidos, los eventos posteriores que dan lugar a los adipocitos a partir de los preadipocitos si están establecidos (Gregoire, Smas, & Sul, 1998).

En la diferenciación *in vitro*, los preadipocitos alcanzan primero el final de su proliferación por contacto o confluencia, no siendo éste el único modo posible (Gregoire et al., 1998; Pairault & Green, 1979). Posteriormente comenzarán los procesos de activación transcripcional de genes marcadores del adipocito, haciendo así posible la adquisición del fenotipo. La activación de la transcripción se da en dos fases. En la primera fase C/EBP β y C/EBP δ activan la expresión de los genes necesarios (PPAR γ y C/EBP α) para la segunda fase (Junichi Tsukada et al., 2011). Para ello, C/EBP β ha de recibir dos fosforilaciones para poder dimerizarse y unirse al DNA con el propósito de que el proceso pueda avanzar. En el ratón, ERK fosforila la Thr188 (homóloga de la humana Thr235) y la glicógeno sintasa kinasa (GSK-3 β) fosforila la Ser184 o la Thr179 (en humanos, Ser231 y Thr 226 respectivamente) (Tang et al., 2005). PPAR γ y C/EBP α son a partir de ahora los responsables del resto del proceso de diferenciación ya que activarán la expresión de si no todos, la mayoría de genes que dotan a la célula del fenotipo adipocitario; estos son la fatty-acid synthase (FAS), glycerophosphate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxilase (ACO), el transportador de glucosa GLUT4, el receptor de insulina y la proteína aP2/FABP específica del adipocito, entre otros (Spiegelman, Choy, Hotamisligil, Graves, & Tontonoz, 1993).

Activación de macrófagos

Los macrófagos son células inmunes que forman parte del sistema de fagocitos mononucleares. Los macrófagos se describen clásicamente como células *housekeeping* encargadas de reconocer antígenos extraños, señales de peligro y resolver el daño tisular eliminando células necróticas y restos celulares por medio de fagocitosis (Lescaudron et al., 1999). Actualmente se tiene una visión más versátil de este tipo celular por el espectro de funciones que son capaces de llevar a cabo y que afectan a la homeostasis tisular y a la respuesta a daño celular. Los últimos avances en el área apuntan además a que estarían involucrados en la regeneración de los tejidos, en la regulación del sistema inmune adaptativo mediante la presentación de antígenos a células T y a que podrían participar en la activación y movilización de células madre (Arnold et al., 2007; Mantovani, Biswas, Galdiero, Sica, & Locati, 2013; Pinto, Godwin, & Rosenthal, 2014).

En condiciones de inflamación o infección, los monocitos sanguíneos se reclutan al tejido dañado, donde se diferenciarán en macrófagos. Dependiendo del microambiente, los macrófagos pueden adquirir diferentes fenotipos funcionales. Los dos fenotipos polarizados que mejor se conocen son los macrófagos activados clásicamente (macrófagos M1) y los activados alternativamente (macrófagos M2) (Tabla 9) (Lawrence & Natoli, 2011). Al llegar al lugar donde son requeridos, los macrófagos interactúan con varias moléculas, lo que hará que se activen. La activación implica que sufrirán varios cambios funcionales, morfológicos y bioquímicos por medio de la expresión de varios genes. Al interactuar con LPS o con citoquinas tipo Th1 como interferón γ (IFN- γ) se activará la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) con el objetivo de destruir microorganismos u otros agentes patógenos (Tabla 9). Esta vía de activación es la clásica o M1. Una vez el estímulo patógeno ha sido eliminado del lugar de inflamación, la localización ha de ser reparada atenuando el microambiente proinflamatorio, eliminando las células apoptóticas o produciendo colágeno, por ejemplo. En esta segunda etapa las citoquinas Th2 (IL-4, IL-10 o IL-13) son las que entran en contacto con los macrófagos, activándolos de manera alternativa (M2) (Classen, Lloberas, & Celada, 2009; Gordon, 2003; Mantovani, Sozzani, Locati, Allavena, & Sica, 2002). En la Tabla 9 se resumen las moléculas que dan lugar a la

activación de cada tipo de macrófago. Una vez el macrófago se ha activado, expresará un grupo de genes característicos a su fenotipo. Entre estas características destaca la expresión de una enzima encargada de metabolizar la arginina, dando lugar a diferentes productos que participarán en la respuesta del macrófago.

Tipo	Citocinas activadoras	Enzima	Productos de Arg	Genes Expresados
M1	Th1: IFN- γ , LPS	iNOS	NO	Il1, Il6, Tnfa, Il12
M2	Th2: IL-4, IL-10, IL-13	ARG1	Prolina Poliaminas	Mrc1, Il10, Il13ra

Tabla 9. Tipos de macrófagos y sus vías de activación asociadas. iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible. ARG1: Arginasa1.

C/EBP β es un factor clave en la activación de macrófagos M2 (Figura 33). Tras la unión de citoquinas Th2 al receptor celular TLR (*Toll-like receptor*), CREB se unirá al promotor de *C/ebp β* activando su expresión. C/EBP β es necesario para la expresión de la arginasa 1 (*Arg1*). Mediante esta enzima el macrófago M2 metabolizará la arginina en urea y ornitina, que a su vez se degradará en prolina y poliaminas (putresceína, espermidina y espermina) (Classen et al., 2009). La prolina servirá para la síntesis de colágeno y posterior reparación del tejido. A su vez, las poliaminas estimulan la proliferación celular. C/EBP β también regula específicamente la expresión de otros genes marcadores del fenotipo M2 además de *Arg1*, como son *Il13ra*, *Il10* y *Mrc1* (Fig 4). Curiosamente los fenotipos M1 y M2 son mutuamente excluyentes, ya que la Arginasa 1 bloquea a nivel transcripcional la expresión de iNOS, la enzima que dota a la célula de fenotipo M1 (J. Lee, Ryu, Ferrante, Morris, & Ratan, 2003).

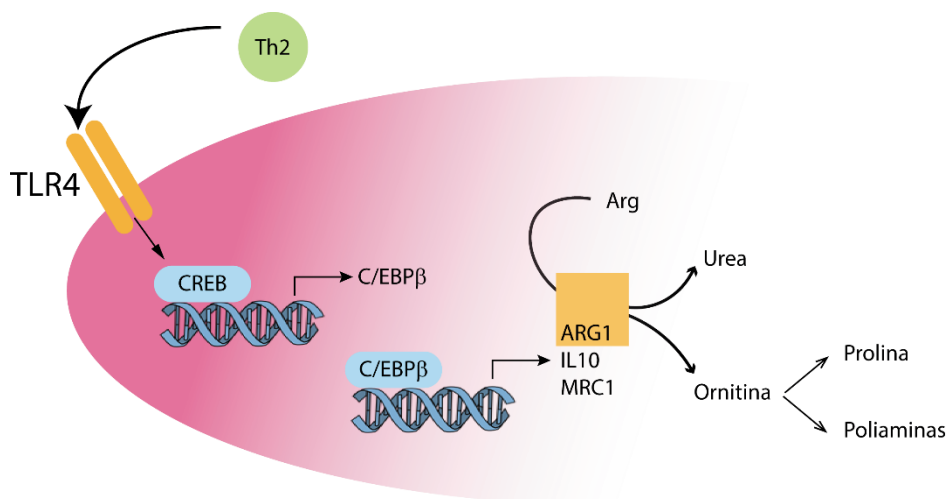


Figura 33. C/EBP β en la activación de macrófagos M2. A partir de (Lawrence & Natoli, 2011; Pinto, Godwin, & Rosenthal, 2014; Ruffell et al., 2009).

La importancia de C/EBP β en la activación de macrófagos M2 también quedó patente al mutar los motivos de unión de CREB en el promotor *C/ebp β* . Al experimentar con ratones portadores de esta mutación y tratarlos con LPS se observó cómo la unión de CREB era necesaria para la expresión de *C/ebp β* . Al no sobreexpresar C/EBP β los genes asociados a M2 (*Arg1*, *Il10* y *Mrc1*) se veían inhibidos (Gordon & Martinez, 2010). Estos mismos ratones eran incapaces de reparar daños musculares. A los ratones con el promotor de *C/ebp β* mutado se les inyectó cardiotoxina en los músculos tibial anterior y cuádriceps. Este agente causa necrosis, seguida de respuesta inflamatoria e invasión de macrófagos que se resuelve reconstituyendo el músculo dañado. El proceso de regeneración muscular se deteriora notablemente con la falta de expresión de *C/ebp β* . La activación de macrófagos M2 por la vía C/EBP β -CREB es por lo tanto indispensable para este proceso (Ruffell et al., 2009). Cabe resaltar que solamente la expresión de los genes que caracterizan el fenotipo M2 se inhibía por la falta de expresión de *C/ebp β* dependiente de CREB, ya que los genes M1 dianas de C/EBP β (*Il12*, *Il6* y *Nos2*) (Gorgoni, Maritano, Marthyn, Righi, & Poli, 2002) no lo estaban y se expresaban de manera normal. El hecho de que la expresión de C/EBP β dependiente de CREB no sea necesaria para la expresión de genes proinflamatorios podría apuntar a una redundancia funcional de las isoformas C/EBP (Hsien-ming M Hu et al., 1998), aunque también es cierto que podría regularse de manera independiente a CREB.

El óxido nítrico producido en el corazón por la acción de la NOS, es, como se ha descrito anteriormente, una molécula señalizadora altamente reactiva que modula importantes funciones del miocardio. NOS cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina y NO, pero si esta reacción se desacopla, en vez de NO se producirán ROS. En el corazón existen 3 isoformas de NOS: nNOS o NOS1, la NOS neuronal y la eNOS o NOS3, la NOS endotelial que se expresan constitutivamente en el corazón en diferentes localizaciones subcelulares del cardiomiocito. Por último esta la iNOS o NOS2, la NOS inducible que no se encuentra en el miocardio sano, pero que se induce bajo estímulos pro-inflamatorios. En el tejido, el NO tiene dos funciones principales: Por una parte NO estimula la actividad de la guanilato ciclasa, que generará cGMP que activa la proteína quinasa G (PKG) (Figura 13). Por otra, el NO nitrosila la tirosina y los grupos tiol de la cisteína en proteínas. Estas nitrosilaciones hacen variar la función de las proteínas. Los cambios en la expresión de NOS y de su actividad, la localización intracelular de la actividad NOS y el desacoplamiento pueden dar lugar a varios efectos inducidos por NO. Muchos de estos efectos son visibles cuando ocurre daño cardíaco producido por constricción de la aorta (TAC), sobrecarga del corazón o infarto del miocardio (MI). Muchas de las acciones de NOS se consideran cardioprotectoras, pero sobre todo si la NOS se desacopla y ocurre la producción de ROS junto con la baja disponibilidad de NO, los efectos serían deletéreos y predispondrían al corazón a sufrir más daño aun (Hataishi et al., 2006; Umar & van der Laarse, 2010; Zheng et al., 2004).

Recientemente se ha encontrado una población celular anteriormente desconocida que reside en el músculo cardíaco. Se han denominado macrófagos del tejido cardíaco (*cardiac tissue macrophages*, cTMs) y se encuentran por todo el órgano, en los espacios intersticiales, interactuando directamente con células endoteliales de los capilares y con los cardiomiocitos. El perfil de expresión génica los sitúa muy cerca de los macrófagos M2 ya que expresan varios de sus marcadores (*Mrc1*, *CD163* y *Lyve-1*). Estos cTMs realizan funciones homeostáticas típicas de los macrófagos, pero además de eso también poseen un fenotipo propio al secretar IGF-1 y

modular la respuesta inmune (Pinto et al., 2012). Los cTMs modulan posiblemente también los progenitores del epicardio (Pinto, Godwin, Chandran, et al., 2014) ya que expresan constitutivamente varios genes involucrados en el desarrollo del epicardio y la homeostasis de células madre (timosina β y C/EBP β) (G. N. Huang et al., 2012; Pinto, Godwin, & Rosenthal, 2014).

Como más adelante se explicará, C/EBP β también es crucial para la reparación del músculo cardiaco. Tras un daño en el corazón, los macrófagos residentes y exógenos crean un ambiente inflamatorio propicio para la regeneración del órgano. Inyectando progenitores del epicardio se ha demostrado que el daño se repara mejor (Zhou et al., 2011), el mismo resultado se obtiene si C/EBP β se sobreexpresa exógenamente en el epicardio (G. N. Huang et al., 2012). Ambas vías de acción sobre la reparación del daño cardiaco muestran cómo la modulación del microambiente paracrino es clave para una mejor reparación del musculo cardiaco (Pinto, Godwin, & Rosenthal, 2014).

C/EBP β en corazón

En el contexto cardiaco, no fue hasta 2010 cuando se descubrió que C/EBP β estaba involucrado y tenía un papel importante en la hipertrofia cardiaca. La hipertrofia cardiaca ocurre frente a varios estímulos, que dependiendo de su naturaleza, tendrán como consecuencia la hipertrofia fisiológica o patológica del corazón. Si bien las dos hipertrofias se asemejan morfológicamente en los primeros estadios después acarrear consecuencias diferentes, ya que la patológica dará lugar a enfermedades cardiovasculares como fallo cardiaco o arritmias, mientras que la fisiológica no. Conocer que mecanismos transcripcionales diferencian estas dos vías hipertróficas tiene una implicación clínica importante. Trabajos anteriores se han centrado en entender los mecanismos moleculares detrás de las hipertrofias patológicas (Akazawa, 2003; Frey & Olson, 2003), sin embargo, las vías de expresión que permiten el desarrollo de la hipertrofia fisiológica no son muy conocidas. Al mismo tiempo también se ha descrito como los cardiomiocitos adultos de mamífero son capaces de proliferar, proceso que resultaría sin ninguna duda muy útil para la regeneración del corazón con las consiguientes aplicaciones en medicina regenerativa. En estos trabajos de investigación se demostraba como los cardiomiocitos adultos poseen la capacidad de proliferar frente a ciertos estímulos (Bergmann et al., 2009, 2015; Bersell, Arab, Haring, & Kühn, 2009; Kajstura et al., 2010). A los 25 años de vida, en humanos, el índice de renovación anual de cardiomiocitos es del 1%, esta tasa decrece progresivamente hasta alcanzar la renovación anual del 0.45% a los 75 años. Estos datos suponen que menos del 50% de las células del corazón se sustituyen a lo largo de la vida de un ser humano. Se desconoce si esta renovación celular cardiaca podría incrementarse mediante intervenciones fisiológicas. Se han descrito algunas vías de transducción de señales extracelulares que dan lugar a la proliferación y renovación, como la de Neuregulin1/ErbB4, pero los mecanismos moleculares y los factores de transcripción que posibilitan este proceso son aún desconocidos.

El primer estudio que se publicó sobre el papel de C/EBP β en corazón fue el de Boström et al. en el año 2010 donde mostraban en un modelo de hipertrofia cardiaca fisiológica inducida por ejercicio como se daba una reducción de C/EBP β (reducción del 61% en la expresión de C/*ebp* β a nivel de mRNA y de alrededor del 50% en proteína). En este modelo, efectivamente, el corazón se hipertrofiaba sin signos de patología (marcadores patológicos, fibrosis, angiogénesis) y el marcador de proliferación celular PCNA se sobreexpresaba. La proliferación celular se comprobó

también mediante otras técnicas (densidad de núcleos de cardiomiocitos, biosíntesis de DNA con incorporación de BrdU) confirmando la cardiomiogénesis tras el ejercicio. En los animales a los que la hipertrofia se les producía patológicamente por TAC (constricción de la aorta) no se observaba esta reducción de *C/ebpβ* y los marcadores patológicos si estaban alterados. La disminución de la expresión se atribuía exclusivamente a la fracción de cardiomiocitos dentro del corazón.

Además, la reducción en la expresión de *C/ebpβ* se simuló en cultivo primario de cardiomiocitos de rata mediante el uso de un siRNA. Esta reducción de los niveles del mRNA de *C/ebpβ* conseguía un efecto similar al del ejercicio con ratones: El tamaño celular aumentaba y se observaba proliferación celular. No solo eso, también se vio como la infraexpresión de C/EBPβ evitaba la expresión del marcador patológico ANF en las células tratadas con fenilefrina (PE, agente prohipertrófico patológico). Este estudio concluyó que la reducción en la expresión de *C/ebpβ* es suficiente para inducir hipertrofia y proliferación de cardiomiocitos en cultivo.

También describieron cómo en el modelo de hipertrofia cardiaca asociada al ejercicio había una sobreexpresión de PGC1α, marcador que ya se había descrito anteriormente como importante frente a disfunción cardiaca (Z. Arany et al., 2006). Junto a PGC1α, varios de sus genes diana *downstream* - *Vegf*, *Ndufs1*, *Ndufv2*, *Atp5o*- también se hallaban sobreexpresados. El cultivo celular presentaba un patrón de expresión muy similar al inhibir la expresión de *C/ebpβ*. C/EBPβ, actúa por lo tanto, *upstream* de la expresión de otros componentes transcripcionales que también se regulan en la hipertrofia fisiológica. Otro de los factores regulados por C/EBPβ y que se encuentra sobreexpresado en este modelo es *Gata4*, que participa en la proliferación celular durante la regeneración cardiaca en el modelo de zebrafish (Kazu Kikuchi et al., 2010). Varios de estos genes que se sobreexpresan tanto en el modelo de ejercicio como en el cultivo tratado con siRNA tienen motivos de respuesta SRE (Serum response element) en sus promotores y son por tanto dianas del factor de transcripción SFR (*Serum response factor*) (Akazawa, 2003). C/EBPβ tiene la capacidad de interactuar físicamente con SFR (Hanlon & Sealy, 1999), y de hecho así lo hace en el cultivo primario. Cuando C/EBPβ se une a SFR evita que éste último se una a los promotores de sus genes diana, previniendo la expresión. Es por esto que en el modelo de ejercicio o en el cultivo con siRNA, al haber menos C/EBPβ hay más SFR disponible y por lo tanto se da la sobreexpresión de los marcadores prohipertróficos fisiológicos (PGC1α, GATA4, α-MHC). Por el contrario, cuando sobreexpresan C/EBPβ mediante un vector adenovírico, C/EBPβ se une a SFR secuestrándolo y evitando así la transcripción de sus genes diana.

Tras describir el rol de C/EBPβ en la hipertrofia cardiaca fisiológica por ejercicio, quedaba aun por describir el papel de este factor de transcripción en la hipertrofia patológica. A este respecto se han publicado recientemente sendos trabajos que demuestran como C/EBPβ se sobreexpresa frente a insultos cardiacos, tanto *in vitro* (tratamiento con fenilefrina en cultivo primario) como *in vivo* (ligamiento de la aorta abdominal en ratas) (J. Zou et al., 2014). La sobreexpresión de C/EBPβ se acompaña de hipertrofia de los cardiomiocitos y del corazón en el caso del modelo *in vivo*. Mediante el uso de siRNA se redujo la expresión de C/EBPβ a nivel de mRNA y proteína (un 78% y un 81% respectivamente), lo que inhibió la hipertrofia de los cardiomiocitos en cultivo al tratarlos con PE. Al truncar la expresión de C/EBPβ también se inhibe la expresión de los marcadores ANF, BNP y MHC-β, ligados a la hipertrofia patológica.

En este trabajo se propone que la hipertrofia se debe a la interacción de C/EBP β con p65-NF κ B. Al tratar los cardiomiocitos con el agonista hipertrófico PE, se favorece la dimerización de p65-NF κ B con C/EBP β favoreciendo así su translocación al núcleo dando lugar a la expresión génica pertinente. En el caso de NF κ B se conoce que su activación causa respuesta inflamatoria e hipertrofia en cardiomiocitos (Hirota et al., 2002; Purcell et al., 2001). La transfección de las células con siC/EBP β o sip65 reduce la formación de dímeros y su consecutiva translocación al núcleo. Esto a su vez inhibe la expresión de los marcadores patológicos ANF, BNP y MHC- β y la propia hipertrofia de los cardiomiocitos.

En el último trabajo que se relaciona C/EBP β con la hipertrofia cardiaca se describe al ácido alfa-lipoico (ALA) como un agente antihipertrófico que actúa mediante la inhibición de C/EBP β (J. Zou et al., 2015). El ALA es un compuesto que existe de manera natural en verduras y hortalizas (Deng et al., 2013). Se le han atribuido cualidades antioxidantes y beneficiosas frente a varias enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, cardiomiopatía diabética o fibrosis cardiaca (C. Li, Lv, Li, & Yu, 2012). Su efectividad se ha probado en varios modelos in vivo frente a isquemia reperusión, fallo cardiaco e hipertensión (Ghibu et al., 2009). El cotratamiento de cardiomiocitos en cultivo con PE y ALA es capaz de inhibir la hipertrofia que el agente hipertrófico causa por sí solo. Del mismo modo, en un modelo de rata de ligamiento de arteria coronaria (CAL), el cuadro hipertrófico ocasionado por el procedimiento (expresión de marcadores patológicos, función cardiaca e hipertrofia) se revierte al tratar con ALA las ratas en las semanas siguientes a la operación. El tratamiento con ALA impide la sobreexpresión de C/EBP β que se da con los estímulos prohipertróficos (PE y CAL). Esta inhibición de C/EBP β hace que su capacidad de transactivación disminuya, al igual que su capacidad de dimerizarse para activar la vía de señalización NF κ B mediante la translocación al núcleo.

Finalmente se ha descrito como C/EBP β se encuentra involucrado en la activación del epicardio durante el desarrollo embrionario y en el daño cardiaco producido por infarto de miocardio (G. N. Huang et al., 2012). Durante la embriogénesis el epicardio secreta factores mitogénicos que hacen que los cardiomiocitos proliferen y aporta células progenitoras multipotentes que darán forma a los vasos coronarios y a la estructura fibrosa del corazón (Sucov, Gu, Thomas, Li, & Pashmforoush, 2009). El desarrollo del epicardio es un proceso conservado evolutivamente desde los peces hasta los mamíferos (Serluca, 2008; Winter & Gittenberger-de Groot, 2007). Los factores de transcripción RALDH2 (retinaldehído deshidrogenasa 2) y WT1 (Wilms tumor 1) se encuentran altamente expresados en este tejido tanto en *zebrafish* como en ratón durante la embriogénesis y son importantes reguladores de las funciones del epicardio y del desarrollo del corazón (Sucov et al., 2009; von Gise et al., 2011).

Al estudiar qué mecanismos regulan la expresión de estos factores que activan el epicardio, encontraron que C/EBP β se encontraba altamente expresado a nivel de mRNA y proteína. Los promotores de *Raldh2* y *Wt1* presentan además varias secuencias consenso de unión a C/EBPs a las que C/EBP β se une efectivamente de manera robusta. En cultivo de células HEK293 la sobreexpresión de *C/ebp β* (- α y - δ también) hacía que los promotores se activaran. Por el contrario, en un cultivo de células del epicardio, la inhibición individual de *C/ebp β* , - α y - δ supone una expresión menor de *raldh2* y *wt1*. Estos datos apuntan a una regulación redundante de la expresión génica de *Raldh2* y *Wt1* por parte de *C/ebp β* , *C/ebp α* y *C/ebp δ* . Al mutar las secuencias

de unión de los C/EBPs en los promotores de *raldh2* y *wt1* se observó una disminución en la activación de los promotores tanto en embriones mutados como en cultivo de corazones. Esto indica que estas secuencias son necesarias para que C/EBP β se una e impulse la expresión de *Raldh2* y *Wt1*.

En el corazón adulto, las células del epicardio son quiescentes, y solo se activan frente a daño cardíaco, lo que hace que entren de nuevo en ciclo celular (K. Kikuchi et al., 2011; Lepilina et al., 2006; Zhou et al., 2011). Al activarse, se expresa de nuevo el patrón de genes de la fase embrionaria, entre ellos *raldh2* y *wt1* (Limana et al., 2010). Además, entre las células del epicardio adulto reactivado se pueden encontrar células multipotentes progenitoras cardiovasculares. Al producir infarto de miocardio (MI) o daño cardíaco por isquemia reperusión en corazones de ratones adultos, se demostró cómo se reactivaba la expresión de estos dos genes. La expresión era muy notoria a las 24 horas de producir el daño y se mantenía al menos por 7 días más. La interacción de C/EBP β resulta necesaria también para la activación del epicardio tras daño cardíaco, ya que mutando sus motivos de unión en los promotores de *Raldh2* y *Wt1* no se observa inducción en su expresión. La sobreexpresión de C/*ebp* β se observa a nivel de mRNA y proteína después de producir los daños, la sobreexpresión también se da para el caso de C/*ebp* α pero la de la isoforma $-\delta$ es muy débil.

Al inyectar un adenovirus para que el epicardio exprese una forma dominante negativa de los C/EBPs se consigue que las formas activas de C/EBP se secuestren y así se evita que desarrollen su potencial transactivador. Al inyectar estos adenovirus en el espacio pericárdico, se atenuó la expresión de *raldh2* y *wt1* en el pericardio tras daño por MI o I/R. La función cardíaca se evaluó mediante la fracción de eyección (EF). Se comprobó que los animales que no re-expresaban *raldh2* y *wt1* gracias a la inyección del adenovirus dominante negativo presentaban una función cardíaca mejorada tras MI o IR. El área de fibrosis también era menor al inhibir la activación por C/EBP β . Por lo tanto, la interrupción de la activación de C/EBPs en el epicardio adulto tras daño cardíaco mejora la función contráctil (EF) y disminuye la fibrosis del miocardio. Este hecho lo atribuían a una menor infiltración de neutrófilos en la zona dañada. Al inhibir la activación por C/EBPs por medio del adenovirus se observaba una disminución del 75% en la infiltración de neutrófilos al área afectada. La infiltración conlleva inflamación, que es uno de los primeros síntomas que se observan tras producir daños cardíacos. Los C/EBP orquestarían por lo tanto la secuencia de respuesta inmune tras los daños, favoreciendo la infiltración de leucocitos y neutrófilos al tejido dañado, causando inflamación.

The bottom of the page features several thick, expressive blue brushstrokes that sweep across the width of the page. The strokes vary in intensity and direction, creating a dynamic, artistic background for the text.

Objetivos

La gestación es un modelo adaptativo y reversible que conlleva cambios metabólicos substanciales acompañados además de la hipertrofia del corazón. Los mecanismos moleculares que determinan este tipo de hipertrofia cardiaca fisiológica no son muy conocidos. El factor de transcripción C/EBP β se ha relacionado con otro tipo de hipertrofia fisiológica, la hipertrofia cardiaca inducida por ejercicio, pero la vinculación de este factor de transcripción con otros modelos de hipertrofia cardiaca no se ha establecido.

El *fibroblast growth factor 21* (FGF21) es una proteína secretable que hace las veces de hormona. A FGF21 se le han atribuido varias funciones que influyen en la mejora del perfil metabólico. Estas funciones implicadas en la regulación del metabolismo realizan acciones como la sensibilización a insulina o la activación de la lipólisis. Su rol en el corazón es desconocido.


Los objetivos de esta tesis han sido:

- 1) Analizar el papel de FGF21 en corazón
 - Establecer si el corazón es una diana potencial y/o un órgano productor de FGF21.
 - Describir los efectos endocrinos/autocrinos de FGF21 sobre el corazón en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.

- 2) Analizar el papel de FGF21 en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca gestacional
 - Determinar la implicación de FGF21 en los cambios metabólicos asociados a la gestación.
 - Analizar la señalización de FGF21 en los órganos que guían las adaptaciones metabólicas de la gestación.

- 3) Establecer el papel de C/EBP β en las adaptaciones cardiacas durante la gestación.
 - Determinar la implicación de C/EBP β en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca gestacional.

- 4) Determinar el rol de C/EBP β en la respuesta inflamatoria cardiaca
 - Establecer el papel que C/EBP β juega en la modulación de la respuesta inflamatoria cardiaca y en la activación de macrófagos M2 durante la gestación.
 - Establecer el papel que C/EBP β juega en la modulación de la respuesta inflamatoria cardiaca y en la activación de macrófagos M2 bajo estímulos patológicos.



Informe de los directores

Informe del director en relación a la Tesis Doctoral de Ibon Redondo Angulo (publicaciones y papel del doctorando)

Como directores de la Tesis doctoral de Ibon Redondo Angulo, hacemos constar que, en la memoria de la Tesis, los resultados obtenidos se estructuran en cuatro artículos científicos y una revisión.

Artículos científicos que forman parte de la Tesis:

1)

Planavila A, **Redondo I**, Hondares E, Vinciguerra M, Munts C, Iglesias R, Gabrielli LA, Sitges M, Giralt M, van Bilsen M, Villarroya F.

Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice.

Nat Commun. 2013; 4:2019.

Este primer artículo se publicó en la revista Nature Communications. Esta revista pertenece al prestigioso grupo Nature con un gran reconocimiento internacional en el ámbito de las ciencias. Esta revista tiene un factor de impacto, según el ISI, de 10.74 siendo la tercera revista en el primer cuartil del área de MULTIDISCIPLINARY SCIENCES. El doctorando, segundo autor de esta publicación, ha participado activamente en la realización de la mayoría de los experimentos en los que se describió por primera vez como Fgf21 jugaba un papel muy importante en patologías cardíacas.

2)

Redondo-Angulo I, Mas-Stachurska A, Sitges M, Giralt M, Villarroya F, Planavila A.

Cardioprotective role of Fgf21 during pregnancy

Submitted to Cardiovascular Research

Este segundo artículo ha sido enviado para publicar a la revista Cardiovascular Research, la cual posee un gran prestigio internacional en el ámbito de la cardiología. Su factor de impacto es de 5.94 y se encuentra en el primer cuartil del área CARDIAC AND CARDIOVASCULAR SYSTEMS. El doctorando es el primer autor de esta publicación y ha participado activamente en la realización de todos los experimentos, la mayoría de ellos en el modelo animal de ratón, con gran implicación. También ha participado en la discusión de los resultados y en la confección del artículo.

3)

Redondo-Angulo I, Mas-Stachurska A, Sitges M, Giralt M, Villarroya F, Planavila A.

C/EBP β is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy

International Journal of Cardiology. 2015 October 5; In Press accepted manuscript

Este tercer artículo ha sido publicado en la revista International Journal of Cardiology. Esta revista forma parte de la International Society for Adult Congenital Heart Disease y tiene un gran prestigio internacional en el ámbito de la cardiología. Esta revista tiene un factor de impacto de 4.036 (según el ISI) estando en el primer cuartil en el área de CARDIAC AND CARDIOVASCULAR SYSTEMS. El doctorando es el primer autor de esta publicación y ha tenido todo el protagonismo en la obtención experimental de los datos y del modelo animal así como en la evolución y progresión de los experimentos, y ha participado con gran protagonismo en la discusión de los resultados.

4)

Planavila A, **Redondo-Angulo I**, Villarroya F.

FGF21 and Cardiac Physiopathology.

Front Endocrinol (Lausanne). 2015 Aug 31; 6:133. Review.

El último artículo que se presenta en esta tesis doctoral es una revisión general del papel cardíaco de Fgf21 en el corazón. Se trata de una revisión realizada por invitación de la revista *Frontiers in Endocrinology* que pertenece al grupo *Frontiers*. De momento la revista no tiene índice de impacto pero sí está indexada en Pubmed. En esta revisión el doctorando es segundo autor y participó activamente en la confección tanto de la revisión como de las figuras que se incluyen en ella.

En Barcelona, el

Firmado:

Francesc Villarroya Gombau
Co-Director

Anna Planavila Porta
Co-Director

A large, textured splash of red watercolor paint occupies the bottom half of the page. The splash is irregular in shape, with darker red tones in the center and lighter, more translucent red tones towards the edges. The word "Publicaciones" is printed in white, bold, sans-serif font over the right side of this splash.

Publicaciones

Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice

Publicación: Nature Communications

PMID: 23771152

Título: El *fibroblast growth factor 21* protege frente a la hipertrofia cardiaca en ratones

El *fibroblast growth factor 21* (FGF21) es un factor endocrino, secretado principalmente por el hígado, que lleva a cabo acciones metabólicas que favorecen el metabolismo de la glucosa. Su papel en el corazón es desconocido. En este trabajo mostramos que los ratones *Fgf21*^{-/-} presentan un mayor peso cardiaco relativo y que desarrollan una mayor dilatación y disfunción cardiaca en respuesta a la infusión de isoproterenol, lo que indica el desarrollo de hipertrofia excéntrica. Además, los ratones *Fgf21*^{-/-} padecen una inducción mayor de marcadores de hipertrofia cardiaca y de vías pro-inflamatorias al igual que una represión de la oxidación de ácidos grasos. La mayoría de estas alteraciones están ya presentes en los neonatos de *Fgf21*^{-/-} pudiendo el tratamiento con *fibroblast growth factor 21* revertirlas, tanto in vivo como en cardiomiocitos en cultivo. El fibroblast growth factor 21 se expresa también en el corazón y los cardiomiocitos pueden secretarlo. El FGF21 secretado por los cardiomiocitos protege a las células cardiacas frente a insultos hipertróficos. Por todo esto, el corazón parece ser una diana del FGF21 producido sistémicamente, y posiblemente localmente también, que ejerce una acción protectora frente a la hipertrofia cardiaca.

ARTICLE

Received 25 Jan 2013 | Accepted 17 May 2013 | Published 17 Jun 2013

DOI: 10.1038/ncomms3019

Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice

A. Planavila¹, I. Redondo¹, E. Hondares¹, M. Vinciguerra^{2,3}, C. Munts⁴, R. Iglesias¹, L.A Gabrielli^{5,6}, M. Sitges⁵, M. Giral¹, M. van Bilsen⁴ & F. Villarroya¹

Fibroblast growth factor 21 is an endocrine factor, secreted mainly by the liver, that exerts metabolic actions that favour glucose metabolism. Its role in the heart is unknown. Here we show that *Fgf21*^{-/-} mice exhibit an increased relative heart weight and develop enhanced signs of dilatation and cardiac dysfunction in response to isoproterenol infusion, indicating eccentric hypertrophy development. In addition, *Fgf21*^{-/-} mice exhibit enhanced induction of cardiac hypertrophy markers and pro-inflammatory pathways and show greater repression of fatty acid oxidation. Most of these alterations are already present in *Fgf21*^{-/-} neonates, and treatment with fibroblast growth factor 21 reverses them *in vivo* and in cultured cardiomyocytes. Moreover, fibroblast growth factor 21 is expressed in the heart and is released by cardiomyocytes. Fibroblast growth factor 21 released by cardiomyocytes protects cardiac cells against hypertrophic insults. Therefore, the heart appears to be a target of systemic, and possibly locally generated, fibroblast growth factor 21, which exerts a protective action against cardiac hypertrophy.

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. ²Institute for Liver and Digestive Health, UCL Medical School—Royal Free Campus—University College London (UCL), Rowland Hill Street, London NW3 2PF, UK. ³Mouse Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), 00015 Monterotondo, Italy. ⁴Department of Physiology, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht University, PO Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands. ⁵Department of Cardiology, Thorax Institute, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. ⁶Cardiovascular Disease Division, Pontificia Universidad Católica de Chile, Avda. Libertador Bernardo O'Higgins 340, 32349 Santiago, Chile. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.P. (email: aplanavila@ub.edu).

Cardiac hypertrophy and subsequent progression to heart failure represents a major cause of morbidity and mortality. The defining features of cardiac hypertrophy are an increase in cardiomyocyte (CM) size, enhanced protein synthesis, a greater degree of sarcomere organization and a shift from fatty acids to glucose as an energy source¹. Chronic inflammation has an important role in hypertrophic responses in the heart^{2,3}. Heart failure remains a critical health problem and the identification of underlying molecular targets and novel protective agents is of crucial importance for improving preventive and therapeutic strategies.

Communication among cardiac cells via secreted factors may contribute to myocardial hypertrophic remodelling^{4,5}. The term cardiomyokine has emerged to describe proteins secreted from the heart that have autocrine, paracrine and/or endocrine functions crucial for the maintenance of cardiac function⁶. The number of cardiomyokines has been estimated at between 30 and 60 (refs 7,8). Because of their extracellular localization, secreted cardiomyokines, show promise as therapeutic targets, or possibly even therapeutic agents.

Fibroblast growth factor 21 (FGF21), a secreted protein that acts as a metabolic regulator, is involved in the control of glucose homeostasis, insulin sensitivity and ketogenesis^{9,10}. The liver is considered the main site of production and release of FGF21 into the blood^{9,11}, but extra-hepatic tissues, such as white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) and skeletal muscle also express FGF21 (refs 12–14). The endocrine actions of FGF21 are involved in the activation of BAT thermogenesis¹⁵ and the promotion of glucose uptake by white adipocytes¹⁶. FGF21 also has autocrine/paracrine effects, inducing hepatic ketogenesis⁹ and promoting sensitization to antidiabetic agents in WAT¹⁷. The cellular actions of FGF21 are mediated by FGF receptors (mainly FGFR1 and FGFR4 in adipose tissues and liver, respectively) and β -Klotho, a single-pass transmembrane protein that functions as an obligate coreceptor for FGF21 signalling^{18,19}. Despite the importance of FGF21 as an endocrine factor, to date, no studies have focused directly on the role of FGF21 in the heart.

In the present study, we analyse the role of FGF21 in cardiac tissue. We observe that mice lacking FGF21 are more prone to

develop cardiac hypertrophy, and treatment of these mice with FGF21 protects against hypertrophic responses. Moreover, the signals that promote hypertrophy induce cardiac FGF21 expression and protein secretion *in vivo* and *in vitro*.

Results

Cardiac hypertrophy is enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice. We first undertook an analysis of the role of FGF21 in the heart by determining the impact of FGF21 ablation (*Fgf21*^{-/-}) in mice. *Fgf21*^{-/-} mice did not show marked alterations in morphometric, metabolic or endocrine profiles under basal, fed conditions, in agreement with previous reports of independently generated mouse models of *FGF21* gene inactivation (Supplementary Tables S1 and S2). We compared the morphology of hearts from adult *Fgf21*^{-/-} mice at baseline and after 7 days of exposure to continuous isoproterenol infusion to induce cardiac hypertrophy. In control animals, total heart weight (HW), as well as HW expressed relative to body weight (HW/BW) and tibia length (HW/TL) were significantly higher in *Fgf21*^{-/-} mice than in wild-type mice (Table 1). After 7 days of isoproterenol infusion, HW was significantly increased in both wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice. The increase in HW was more pronounced in isoproterenol-treated *Fgf21*^{-/-} mice than in isoproterenol-treated wild-type mice, whether expressed as HW/TL or HW/BW. No differences in blood pressure or heart rate were found under any conditions tested (Supplementary Table S3). Under basal conditions, diastolic and systolic interventricular septum and posterior wall thickness, determined by echocardiography (Table 1 and Supplementary Table S4), were not significantly different between wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice. Isoproterenol significantly increased interventricular septum thickness and posterior wall thickness in *Fgf21*^{-/-} mice during diastole. Histological examination of hematoxylin and eosin (H&E)-stained left ventricle (LV) tissue sections revealed that the CM cross-sectional area was larger in *Fgf21*^{-/-} than in wild-type mice (Fig. 1a–c and Supplementary Table S5). Isoproterenol treatment significantly increased cross-sectional area in both *Fgf21*^{-/-} and wild-type mice but the increase in cross-sectional area after isoproterenol was greater in *Fgf21*^{-/-} mice.

Table 1 | Morphometric and echocardiography data from wild-type and *FGF21*^{-/-} mice after ISO-induced hypertrophy.

	Wild-type		<i>FGF21</i> ^{-/-}	
	CT (n = 4)	ISO (n = 5)	CT (n = 4)	ISO (n = 5)
BW(g)	30.47 ± 4.78	32.37 ± 2.33	34.21 ± 3.13	33.01 ± 0.39
HW(mg)	149.2 ± 9.3	220.6 ± 10.1*	183.1 ± 11.1†	248.5 ± 12*†
HW/BW (mg g ⁻¹)	5.09 ± 0.31	6.83 ± 1.35*	5.40 ± 0.13†	7.53 ± 1.32*†
HW/TL (mg mm ⁻¹)	8.51 ± 0.55	13.43 ± 0.66*	10.32 ± 0.45†	15.43 ± 0.11*†
LVIDd (mm)	3.68 ± 0.15	3.91 ± 0.12	4.04 ± 0.11	4.70 ± 0.11*†
LVIDs (mm)	2.14 ± 0.13	2.52 ± 0.09*	2.38 ± 0.12	2.87 ± 0.16*†
IVSd (mm)	0.95 ± 0.05	1.16 ± 0.08	0.87 ± 0.05	1.01 ± 0.03*
IVSs (mm)	1.53 ± 0.05	1.51 ± 0.05	1.49 ± 0.08	1.59 ± 0.03
PWTd (mm)	1.01 ± 0.04	1.14 ± 0.08	0.82 ± 0.03	0.98 ± 0.03*
PWTs (mm)	1.35 ± 0.05	1.50 ± 0.12	1.21 ± 0.05	1.40 ± 0.06*
EDV (mm ³)	59.31 ± 5.34	67.99 ± 4.72	71.92 ± 4.64	103.7 ± 5.43*†
ESV (mm ³)	16.31 ± 2.51	23.71 ± 2.04*	20.50 ± 2.41	33.76 ± 4.10*†
H/R ratio	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.05	0.46 ± 0.02†	0.42 ± 0.02†
SI	2.21 ± 0.05	2.14 ± 0.04	2.09 ± 0.04	1.89 ± 0.03*†
EF (%)	73.67 ± 1.96	69.69 ± 2.95	72.01 ± 2.28	62.4 ± 2.6*
FS (%)	42.2 ± 1.5	38.45 ± 1.9	41.67 ± 1.9	35.1 ± 1.8*

BW, body weight; CT, corresponding control; EDV, end-diastolic volume; ESV, end-systolic volume; FGF21, fibroblast growth factor 21; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; HW, heart weight; HW/BW, heart weight/body weight ratio; HW/TL, heart weight/tibia length ratio; ISO, isoproterenol; IVSd, internal ventricular septum during diastole; IVSs, internal ventricular septum during systole; LV, left ventricle; LVIDd, LV internal diameter during diastole; LVIDs, LV internal diameter during systole; PWTd, posterior wall thickness during diastole; PWTs, posterior wall thickness during systole; SI, sphericity index.

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. All measurements are means ± s.e.m. Data were analysed by one-way ANOVA (**P* < 0.05 compared with CT animals. †*P* < 0.05 compared with corresponding wild-type animals).

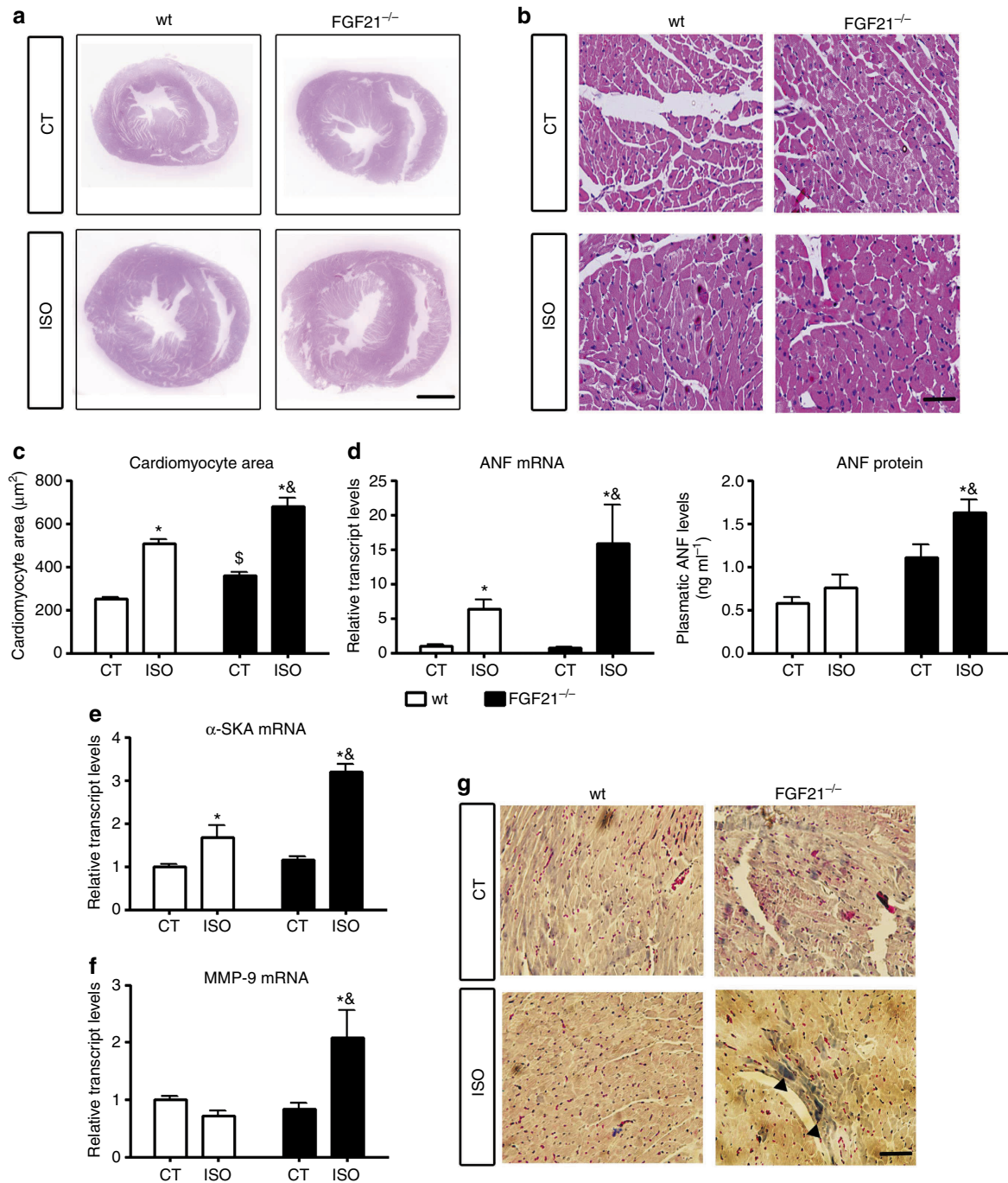


Figure 1 | Cardiac hypertrophy is enhanced in *Fgf21*-null mice. Adult wild-type (wt; white bars) and *FGF21*^{-/-} mice (black bars) were continuously infused with isoproterenol (ISO) for 7 days to experimentally induce heart hypertrophy. **(a)** Representative two-chamber (axial) histological sections of hearts stained with H&E. Scale bar, 1 mm. **(b)** Magnified (×20) images of histological sections in **(a)** used to determine CM cross-sectional area (CSA). Scale bar, 50 µm. **(c)** Quantification of CM cross-sectional area in the left ventricular wall. **(d)** mRNA expression and plasma protein levels of the hypertrophy marker ANF. mRNA expression levels of the hypertrophy marker α -SKA **(e)** and fibrosis marker matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) **(f)**. **(g)** Determination of fibrosis in histological sections by Masson's Trichrome staining. Original magnification, ×20. Scale bar, 50 µm. Arrows show fibrotic areas (blue). Results are expressed as means ± s.e.m., n = 4–5 mice per group. Data were analysed by one-way ANOVA (*P < 0.05 compared with corresponding control [CT] mice; §P < 0.05 compared with wild-type CT mice; &P < 0.05 compared with wild-type isoproterenol-treated mice).

In wild-type mice, isoproterenol increased systolic LV internal diameter and end-systolic volume (Table 1). In *Fgf21*^{-/-} mice, isoproterenol infusion led to a significant increase in both end-diastolic and end-systolic LV internal diameter and volumes (end-diastolic volume and end-systolic volume), an increase significantly higher than in wild-type mice. The H/R ratio, a

measure of concentric versus eccentric cardiac hypertrophy, was decreased in the *Fgf21*^{-/-} mice after isoproterenol infusion, indicating eccentric cardiac hypertrophic response. The sphericity index was also decreased in the *Fgf21*^{-/-} mice in response to isoproterenol. Finally, LV ejection fraction and fractional shortening were not affected by isoproterenol in wild-type mice, but

both parameters were significantly decreased by isoproterenol treatment in *Fgf21*^{-/-} mice.

The expression of the hypertrophic markers atrial natriuretic factor (ANF) and α -skeletal actin (α -SKA) mRNAs, was similar in wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice under basal conditions (Fig. 1d,e). Isoproterenol infusion caused an increase in ANF mRNA and plasma protein and α -SKA mRNA, an effect that was significantly more pronounced in *Fgf21*^{-/-} mice than in wild-type mice. To assess fibrosis, we performed Masson's Trichrome staining and evaluated the expression of matrix metalloproteinase-9 (Fig. 1f,g). By both measures, isoproterenol led to a substantial increase in fibrosis in *Fgf21*^{-/-} mice but not in wild-type mice. Collectively, it is concluded that the lack of FGF21

promotes cardiac hypertrophy and sensitizes mice to hypertrophic stimuli and associated derangements such as fibrosis.

Cardiac inflammatory signals and metabolism in *Fgf21*^{-/-} mice. Considering that a pro-inflammatory status is often associated with cardiac hypertrophy development, we investigated the effects of the absence of FGF21 on cardiac expression of pro-inflammatory marker genes, nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activity, and pro-inflammatory plasma cytokine levels in response to isoproterenol. We measured transcript levels for the cytokines interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor- α (TNF α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Fig. 2a). With the

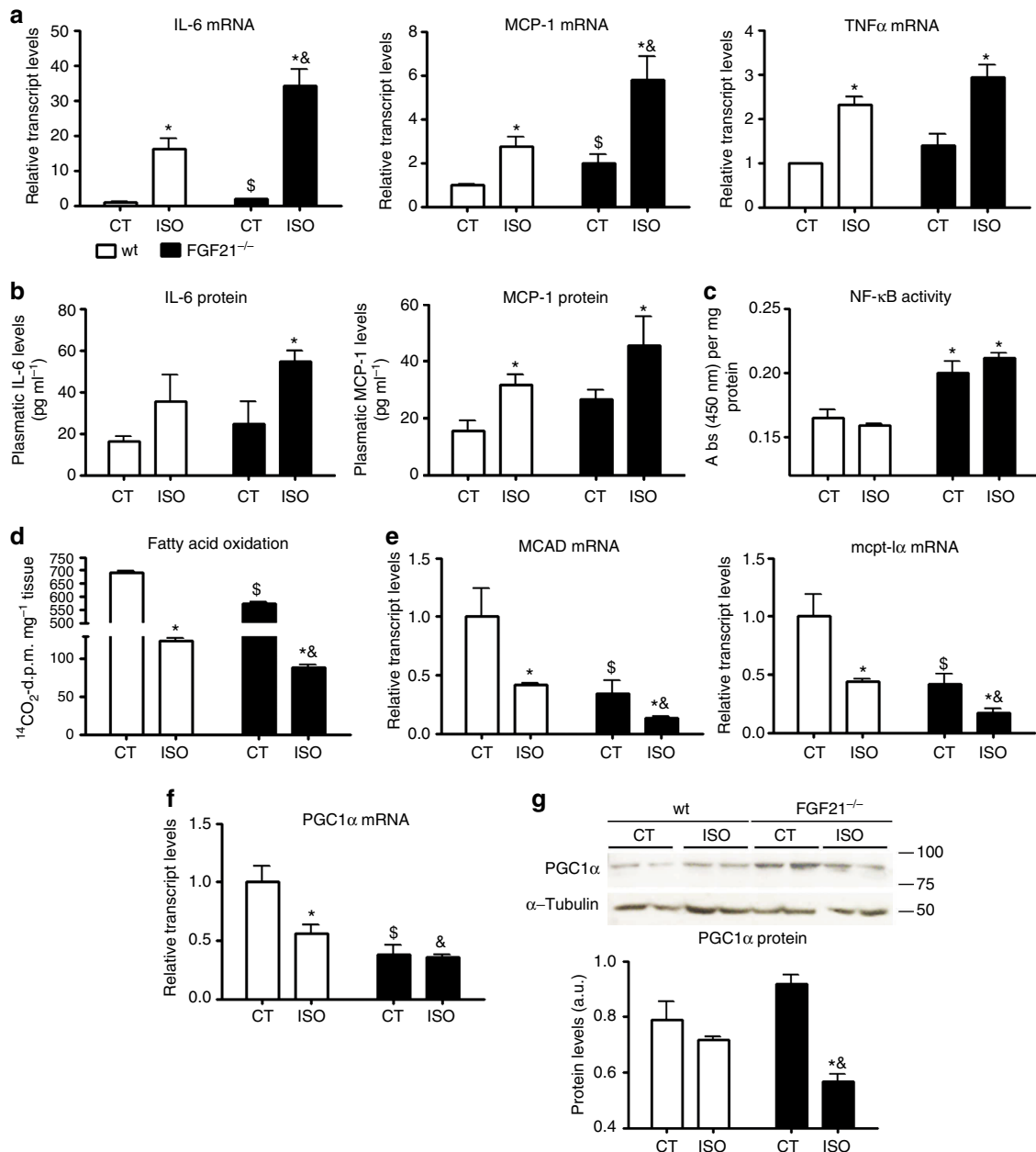


Figure 2 | Cardiac inflammatory signals and metabolism in *Fgf21*^{-/-} mice. (a) mRNA expression levels of the pro-inflammatory genes *IL-6*, *MCP-1* and *TNF α* . (b) Plasma protein levels of IL-6 and MCP-1. (c) NF- κ B activity in nuclear extracts from hearts. (d) FAO rates in homogenates from freshly isolated hearts. (e) mRNA expression levels of the lipid catabolism genes *MCAD* and *mcpt-1 α* . (f) mRNA level of *PGC1 α* . (g) *PGC1 α* protein levels in nuclear extracts from hearts. Top: representative images from western-blot; bottom: protein quantification. Results are expressed as means \pm s.e.m., $n = 4$ –5 mice per group. Data were analysed by one-way ANOVA (* $P < 0.05$ compared with corresponding control [CT] mice; $\$P < 0.05$ compared with wild-type (wt) CT mice; $\&P < 0.05$ compared with wild-type isoproterenol-treated mice).

exception of TNF α , inflammatory gene expression was significantly higher in *Fgf21*^{-/-} mice than in wild-type mice before treatment. The expression of inflammatory genes was markedly increased in both wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice in association with isoproterenol treatment-induced cardiac hypertrophy; however, under these conditions, IL-6 and MCP-1 mRNA levels were significantly higher in *Fgf21*^{-/-} mice than in wild-type mice. A similar pattern was observed for plasma levels of IL-6 and MCP-1 (Fig. 2b). Moreover, NF- κ B activity in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice was elevated under basal conditions and following isoproterenol infusion (Fig. 2c).

Considering the close association between impaired fatty acid oxidation (FAO) and cardiac hypertrophy, we examined FAO rates as well as the expression of FAO-associated genes and PPAR γ coactivator-1 α (PGC1 α). The FAO rate was significantly reduced in *Fgf21*^{-/-} mice compared with wild-type mice under both basal and isoproterenol-infusion conditions (Fig. 2d). Moreover, transcript levels of the FAO-related genes carnitine palmitoyltransferase (*mcpt*)-1 α and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (*MCAD*), as well as those of PGC1 α were markedly decreased in *Fgf21*^{-/-} mice under basal conditions; after isoproterenol, expression levels were down-regulated in both wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 2e,f). However, the levels of PGC1 α , *MCAD* and *mcpt*-1 α mRNA in isoproterenol-infused mice were significantly lower in *Fgf21*^{-/-} mice than in wild-type mice. The levels of PGC1 α protein were also lower in *Fgf21*^{-/-} mice than in wild-type mice infused with isoproterenol (Fig. 2g).

Overall these findings indicate that the absence of FGF21 and subsequent cardiac hypertrophy are associated with enhanced pro-inflammatory signalling and repression of FAO pathways.

FGF21 protects against cardiac hypertrophy *in vivo*. In order to ascertain whether enhanced cardiac hypertrophy in *Fgf21*^{-/-} mice was a pathological consequence of progressive processes acting throughout the life of the mouse or was a more primary event that occurred before putative long-acting metabolic challenges, we analysed hearts from *Fgf21*^{-/-} mice in the immediate neonatal period (Fig. 3a). Although absolute values for BW and HW were not different between the two genotypes owing to individual variability within each experimental group, the HW/BW ratio for individuals did change (See supplementary Table S6). The increase in HW/BW ratio (Δ HW/BW) in response to isoproterenol was significantly enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice compared with wild-type mice, indicating that, in the absence of FGF21, the hypertrophic response to isoproterenol in the heart is enhanced (Fig. 3b). Administration of FGF21 prevented the increase in HW/BW in wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice. Consistent with heart enlargement, the CM cross-sectional area in the LV wall was also increased in isoproterenol-treated mice, and the increase was significantly higher in *Fgf21*^{-/-} neonates than in wild-type pups. FGF21 significantly reduced isoproterenol-induced CM enlargement in wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 3c).

Expression of ANF and α -SKA were also induced in isoproterenol-treated neonates (Fig. 4a), and the induction of ANF expression was significantly more pronounced in *Fgf21*^{-/-} pups. FGF21 significantly attenuated isoproterenol-induced α -SKA expression in wild-type mice and decreased expression of both ANF and α -SKA in *Fgf21*^{-/-} neonates. In addition, IL-6 mRNA levels were significantly increased in hearts from isoproterenol-treated neonates, but were more markedly elevated in *Fgf21*^{-/-} pups. FGF21 treatment significantly attenuated the expression of IL-6 in *Fgf21*^{-/-} mice. A similar pattern was

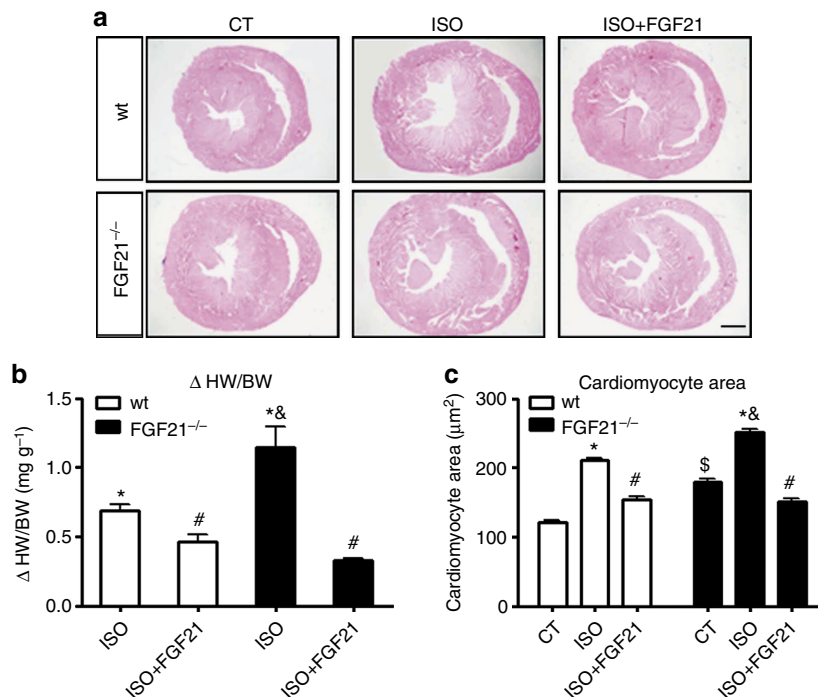


Figure 3 | FGF21 prevents the development of cardiac hypertrophy *in vivo*. Six-day-old wild-type (wt; white bars) and *Fgf21*^{-/-} mice (black bars) were injected (i.p.) with isoproterenol (ISO) for 7 days (alone or combination with FGF21) to induce cardiac hypertrophy. **(a)** Representative two-chamber (axial) histological sections of hearts stained with H&E. Scale bar, 600 μ m. **(b)** HW/BW, expressed in milligrams per gram. **(c)** Quantification of the CM cross-sectional area (CSA) in the left ventricular wall. Results are expressed as means \pm s.e.m., $n = 3$ –6 mice per group. Data were analysed by one-way ANOVA (* $P < 0.05$ compared with corresponding control [CT] mice; # $P < 0.05$ compared with corresponding isoproterenol-treated mice; \$ $P < 0.05$ compared with wild-type CT mice; & $P < 0.05$ compared with wild-type isoproterenol-treated mice).

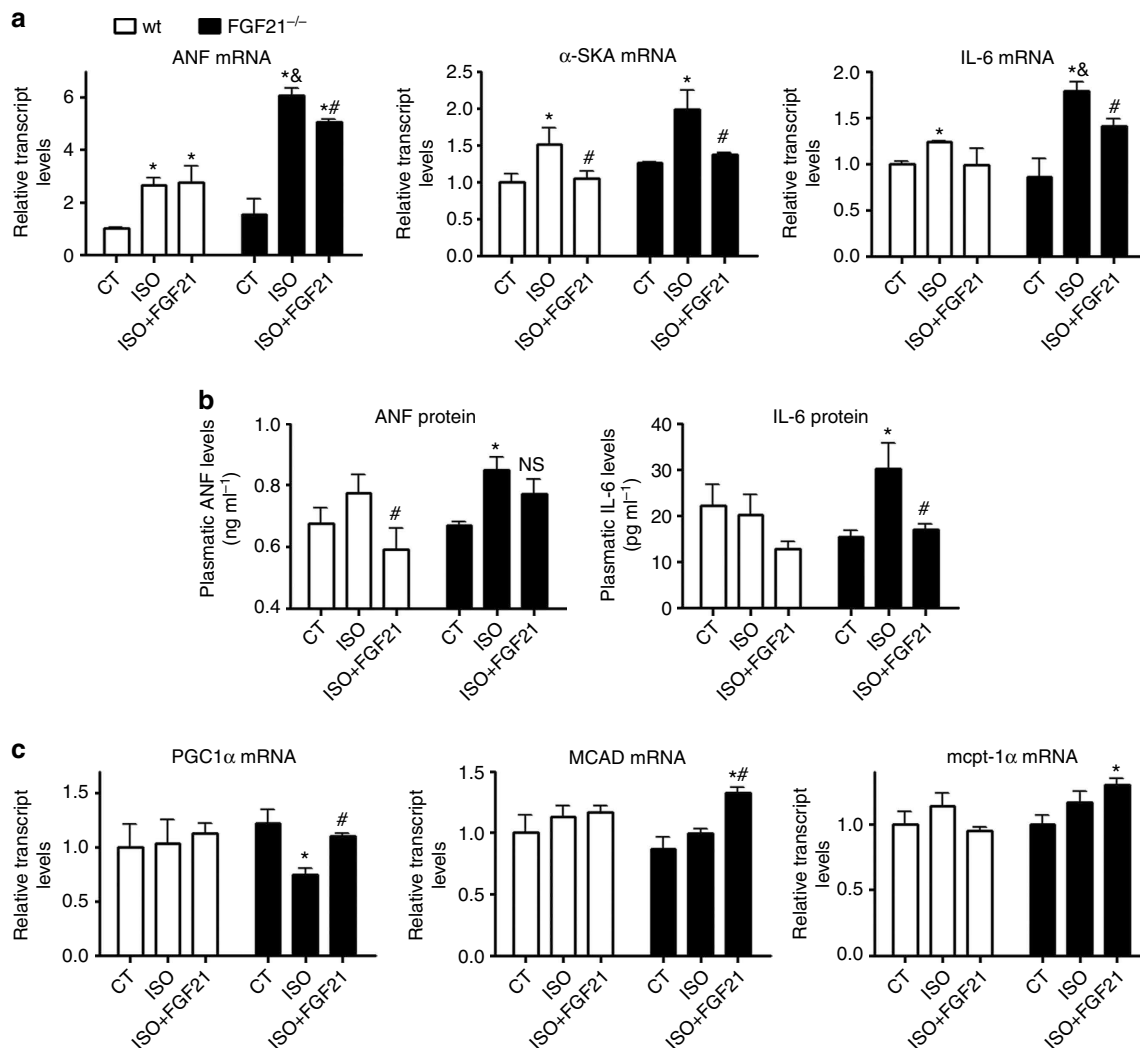


Figure 4 | Cardiac gene expression and plasma levels in *Fgf21*^{-/-} neonates. (a) mRNA expression levels of the hypertrophy markers ANF and α -SKA and pro-inflammatory marker IL-6. (b) Plasma protein levels of ANF and IL-6. (c) mRNA expression levels of PGC1 α and lipid catabolism genes *MCAD* and *mcpt-1 α* . Results are expressed as means \pm s.e.m., $n = 3-6$ mice per group. Data were analysed by one-way ANOVA (* $P < 0.05$ compared with corresponding control [CT] mice; # $P < 0.05$ compared with corresponding isoproterenol-treated mice; \$ $P < 0.05$ compared with wild-type (wt) CT mice; & $P < 0.05$ compared with wild-type isoproterenol-treated mice). NS, not significant.

found in the plasma levels of ANF and IL-6 (Fig. 4b). Finally, the FAO-associated genes *mcpt-1 α* and *MCAD* were upregulated after FGF21 treatment in *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 4c). PGC1 α mRNA levels were downregulated after isoproterenol-induced cardiac hypertrophy only in *Fgf21*^{-/-} mice and were restored after FGF21 treatment.

FGF21 directly targets cardiac cells. In order to establish whether the effects of FGF21 observed in *in vivo* studies involved a direct action of FGF21 on cardiac cells, we used cultured rat neonatal CMs (NCMs). Phenylephrine treatment increased cross-sectional area, an indication of hypertrophy, and FGF21 significantly attenuated the phenylephrine-induced cell enlargement (Fig. 5a). Transcript levels of ANF and α -SKA were increased in association with phenylephrine, and this effect was reduced by treatment with FGF21 (Fig. 5b). Exposure of NCMs to phenylephrine significantly decreased PGC1 α mRNA levels and induced an increase in IL-6 mRNA levels; both effects were abrogated by FGF21 treatment. Moreover, exposure of NCMs to FGF21 attenuated the formation of reactive oxygen species (ROS)

and stimulation of NF- κ B activity induced by phenylephrine (Fig. 5c,d).

To further investigate the effects of FGF21 in the inflammatory process, we studied the influence of FGF21 on the cardiac response to lipopolysaccharide (LPS) (Supplementary Fig. S1). FGF21 significantly reduced LPS-induced expression of pro-inflammatory genes in NCMs. Results obtained *in vivo* indicated that cardiac transcript levels and plasma protein levels of IL-6 and MCP-1 were significantly enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice compared with wild-type mice following LPS injection. Overall, a protective role of FGF21 against the induction of inflammation was confirmed.

Given the evidence of direct effects of FGF21 on cardiac cells, we further analysed the expression levels of FGF21 receptors (FGFR1 and -R4) and coreceptor (β -Klotho) in the heart compared with that in liver, BAT and WAT. We detected transcripts for both FGFR1 and -R4 and the coreceptor β -Klotho in the heart (Fig. 5e). The most highly expressed FGF receptor form was FGFR1, which was found at levels at least as high as those in adipose tissues, whereas FGFR4 was less abundant, in agreement with previous reports²⁰. Transcript levels of β -Klotho,

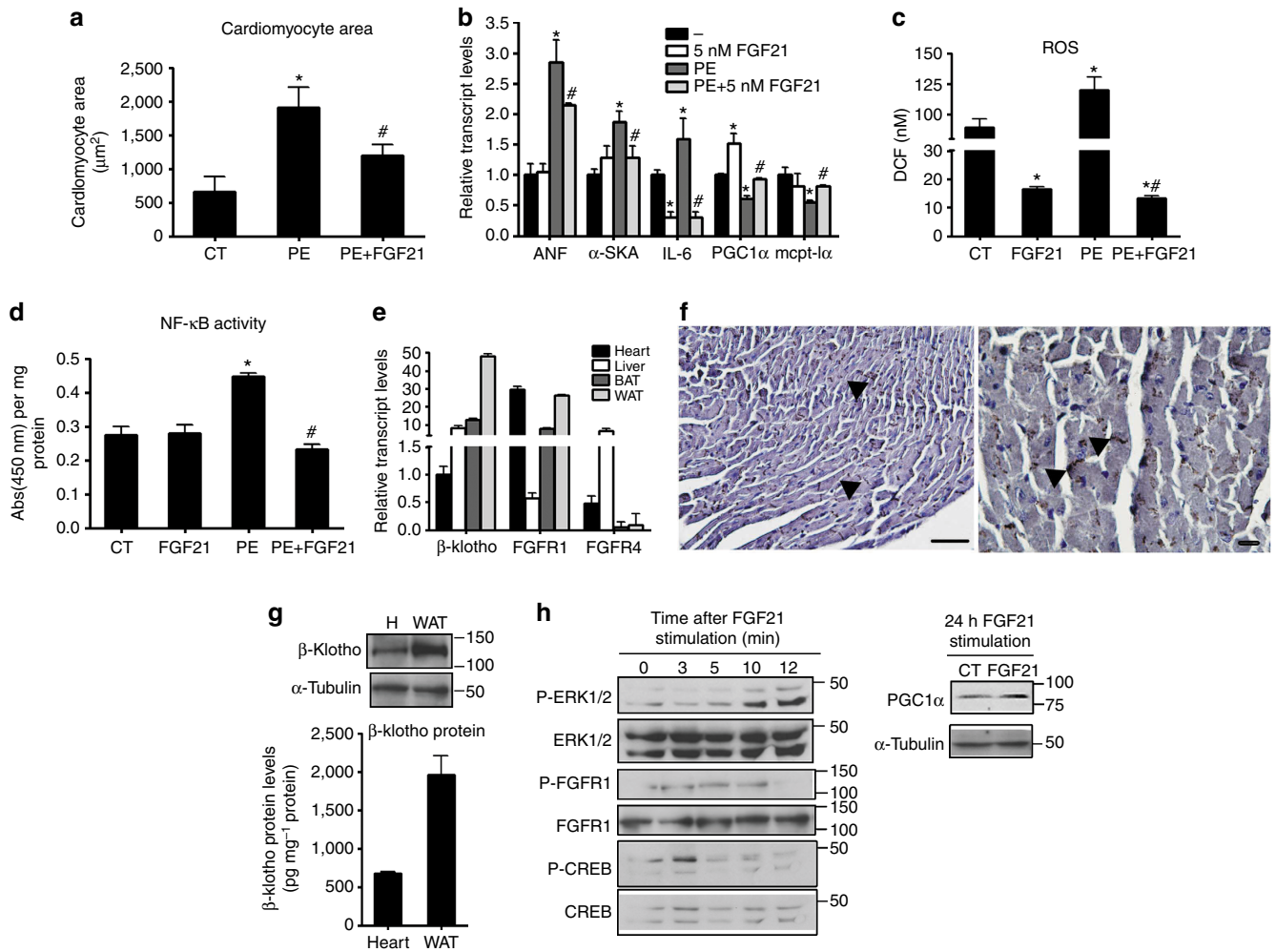


Figure 5 | FGF21 protects CMs against phenylephrine-induced hypertrophy. (a) CM cross-sectional area (CSA) and (b) mRNA expression levels in neonatal CMs (NCMs) after phenylephrine (PE)-induced hypertrophy alone or with FGF21 pretreatment (5 nM) for 24 h. (c) ROS levels and (d) NF-κB activity in NCMs. (e) mRNA levels of FGF receptors (FGFR1, FGFR4) and coreceptor β-Klotho. (f) Detection of β-Klotho in paraffin sections of the heart by immunohistochemistry. Left: original magnification, × 20. Scale bar, 100 µm. Right: original magnification × 50. Scale bar, 50 µm. Arrows indicate β-Klotho staining (brown). (g) β-Klotho protein levels (pg mg⁻¹ protein) quantified by ELISA, and a representative immunoblot showing the levels of β-Klotho protein in the heart and in WAT. (h) Representative western blot of P-ERK1/2, ERK1/2, P-FGFR1, FGFR1, P-CREB, CREB and PGC1α in NCMs stimulated with 5 nM FGF21 at different time points. Data are presented as means ± s.e.m. Each experiment was conducted in triplicate in at least two independent CM isolations. Data were analysed by one-way ANOVA (**P* < 0.05 compared with control cells; #*P* < 0.05 compared with phenylephrine-treated cells).

which is considered to confer specific responsiveness to FGF21, were less abundant in the heart than in other tissues analysed (Fig. 5e). However, immunohistochemistry confirmed the presence of β-Klotho in the heart (Fig. 5f). Western blot analysis also showed that β-Klotho protein was expressed at lower levels in the heart than in other FGF21 target tissues such as WAT (Fig. 5g), although the difference was less marked at the protein level than at the mRNA level. Using specific ELISAs to quantify these differences, we found β-Klotho levels in the heart were about one-third those in WAT. Finally, in order to further confirm that FGF21 acts directly on cardiac cells, we analysed the activation of FGFR1 and the MAP kinase cascade, bona fide indicators of a β-Klotho/FGF receptor-dependent cellular response to FGF21 (ref. 21). The results indicated that FGF21 induced the phosphorylation of FGFR1 and ERK (extracellular signal-regulated kinase)-1/2 in NCMs (Fig. 5h), confirming that cardiac cells are genuine targets of FGF21. Moreover, we found that FGF21 treatment also induced CREB phosphorylation and increased PGC1α protein levels.

FGF21 is expressed and secreted by cardiac cells. Considering that, to date, FGF21 target tissues are, in turn, FGF21-producing tissues, we sought to determine whether the heart is also an FGF21-producing tissue. The adult heart expressed the FGF21 transcript, although at lower levels compared with other tissues such as liver and WAT (Supplementary Fig. S2A). FGF21 mRNA expression in the heart was rapidly induced during the transition from the fetal to neonatal period; in fact, FGF21 expression levels in hearts from 1-day-old pups were similar to those in adult hearts (Fig. 6a). Treatment with isoproterenol significantly increased the expression levels of FGF21 mRNA in the heart (Fig. 6b and Supplementary Fig. S2B). Other pathological cardiac interventions, such as transverse aortic constriction (TAC) and myocardial infarction (MI), induced mRNA expression in the heart, whereas ischaemia/reperfusion (I/R) did not, probably due to the short-term nature of this intervention (1 day) (Fig. 6b). Isolation of cardiac cells from adult hearts confirmed that FGF21 was mainly expressed by the CM fraction (Fig. 6c), rather than in non-cardiac (non-CM) cells in which the FGF21 transcript was

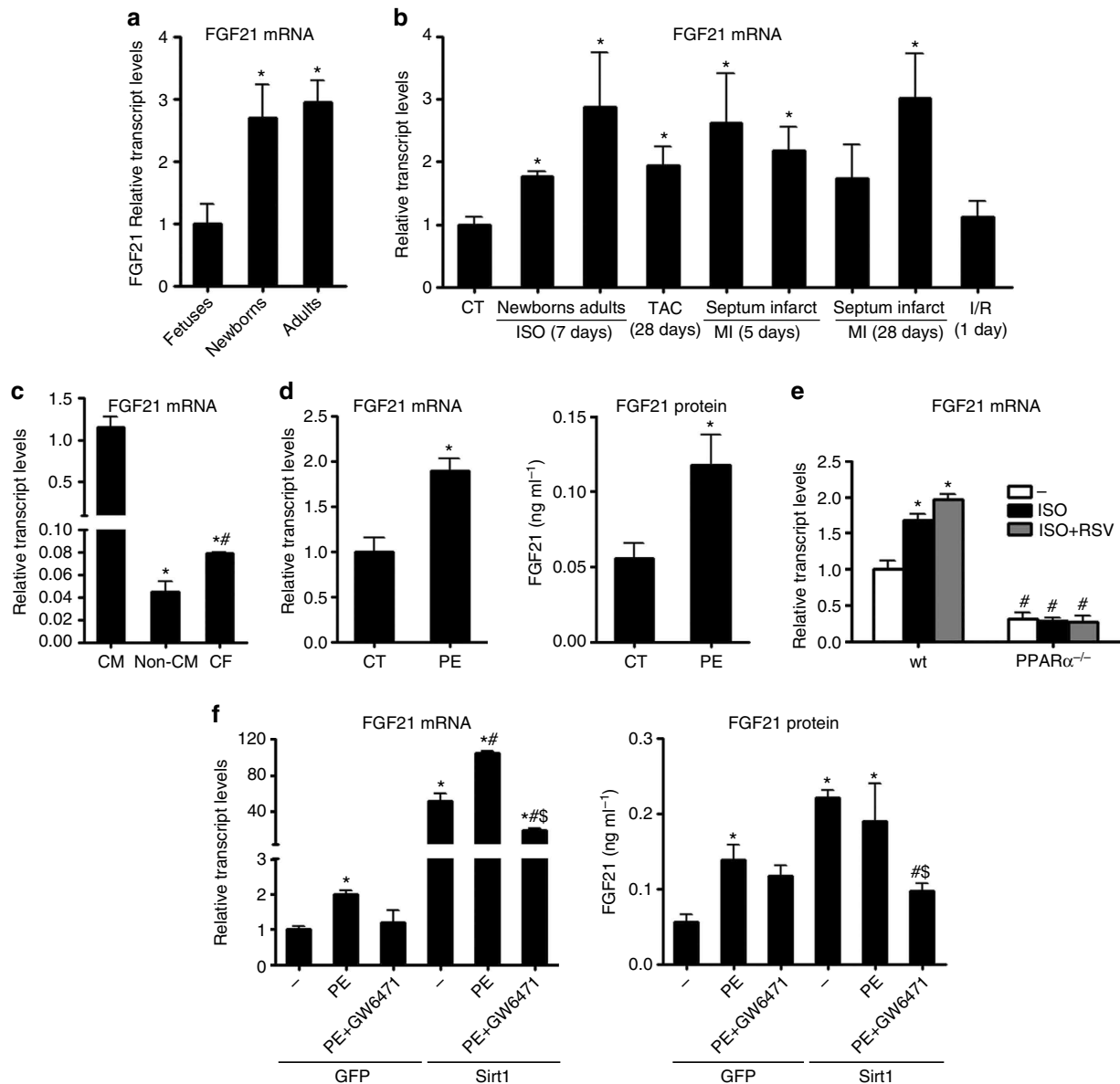


Figure 6 | FGF21 is expressed and released by cardiac cells. (a) FGF21 expression levels in fetuses (18 days), newborns (1 day old) and adult mice (4 months old); $n = 5$ mice per group. (b) FGF21 mRNA levels in the heart after different interventions to induce cardiac damage: cardiac hypertrophy induced by isoproterenol (ISO) (7days) and TAC (28 days); early (5 days) and late (28 days) MI in the septum or in the left ventricle infarcted area; and 1 day reperfusion after 30 min ischemia; $n = 5$ mice per group. (c) FGF21 mRNA levels in the CM, non-CM (Non-CM) and cardiac fibroblast (CF) fractions from isolated adult wild-type (wt) mouse hearts. (d) FGF21 mRNA levels in neonatal CMs (NCMs) and protein levels in culture media after phenylephrine (PE) stimulation for 24 h. (e) FGF21 mRNA levels in wild-type and $PPAR\alpha^{-/-}$ mice injected with isoproterenol (i.p.) for 7 days; $n = 5$ mice per group. (f) NCMs overexpressing Sirt1 or GFP control vector (10 IFU per cell) were treated with phenylephrine and the $PPAR\alpha$ antagonist GW6471 (1 μ M), alone or in combination, for 24 h. Results are expressed as means \pm s.e.m. The *in vitro* experiments were conducted in triplicate in at least two independent CM isolations. Data were analysed by one-way ANOVA (* $P < 0.05$ compared with wild-type (wt) control mice, cells or CM fraction [C]; # $P < 0.05$ compared with isoproterenol-treated wild-type animals [E], Ad-Sirt1-infected control cells [F] or Non-CM [C]; \$ $P < 0.05$ compared with Ad-Sirt1-infected phenylephrine-stimulated cells [F]).

almost undetectable. The expression levels of FGF21 in cardiac fibroblasts were also much lower than in CMs.

Our analysis of FGF21 expression in NCMs showed that FGF21 mRNA levels were significantly increased following exposure to phenylephrine (Fig. 6d). Finally, to determine whether FGF21 was actually secreted by CMs, we analysed FGF21 protein levels in NCMs culture media. The basal rate of FGF21 secretion in media under control conditions was $\sim 0.05 \text{ ng ml}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$. This basal CM FGF21 secretion rate was lower than that of mouse primary hepatocytes

($\sim 0.17 \text{ ng ml}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$)²² and brown adipocytes ($\sim 0.3 \text{ ng ml}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$)¹⁴. After treatment with phenylephrine, the rate of FGF21 protein secretion by NCMs in culture significantly increased reaching $\sim 0.15 \text{ ng ml}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$, closer to secretion rates in classical FGF21-producing cells.

Next, we analysed the mechanisms controlling FGF21 expression and responsiveness in the heart in the context of hypertrophy-inducing conditions. We first studied FGF21 expression in hearts from $Ppar\alpha$ -null mice under basal conditions and after 7 days of isoproterenol treatment (Fig. 6e).

Cardiac FGF21 expression was reduced in *Pparα*-null mice under basal conditions. Isoproterenol treatment induced an increase in FGF21 mRNA expression levels in wild-type mice. However, the induction of FGF21 by isoproterenol was completely abrogated in *Pparα*-null mice. Co-treatment with the Sirt1 activator, resveratrol, tended to increase FGF21 expression levels in wild-type hearts, but not in *Pparα*-null mice.

The involvement of the PPARα pathway in the control of cardiac FGF21 expression was further confirmed by treatment of NCMs with the PPARα agonist GW7647, which led to a 3.46 ± 0.22 -fold induction of FGF21 mRNA levels ($P < 0.05$).

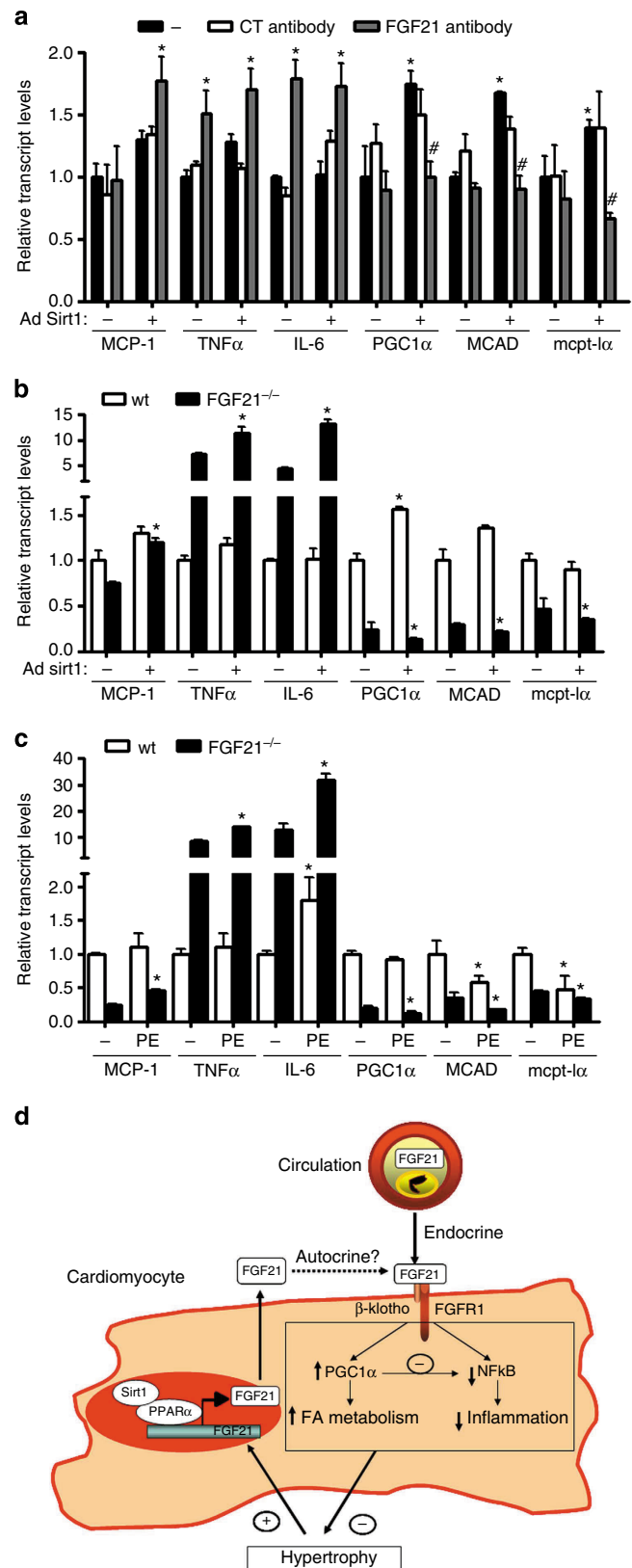
Next, we investigated the actions of the PPARα antagonist GW6471 on FGF21 expression in NCMs, alone and in combination with adenoviral overexpression of Sirt1 (Fig. 6f). Inhibition of PPARα with GW6471 significantly attenuated the increase in FGF21 transcript levels elicited by phenylephrine. Sirt1 overexpression induced an increase in FGF21 transcript levels (nearly 50-fold), an effect that was further potentiated by co-treatment with phenylephrine. Increases in FGF21 mRNA in response to Sirt1 and phenylephrine were associated with enhanced release of FGF21 protein. Such overexpression of Sirt1 in this experimental setting is known to protect against phenylephrine-induced increases in CM size and expression of ANF and α-SKA³. The PPARα antagonist GW6471 abolished the induction of *FGF21* gene expression by phenylephrine and strongly blunted the combined effects of Sirt1 overexpression and phenylephrine treatment. Again, these effects were paralleled by changes in FGF21 protein released into the cell culture medium (Fig. 6f). Collectively, these results identify the Sirt1-PPARα pathway as a pivotal mechanism of control of FGF21 expression in heart.

Role of endogenous production of FGF21 in cardiac cells.

Considering the duality of cardiac cells as both a target and a source of FGF21 and the fact that Sirt1 was the most prominent inducer of FGF21 expression, we sought to study a potential autocrine role of FGF21 by exploring the extent to which Sirt1 action on cardiac cells required the induction of FGF21 expression and release (Fig. 7a). Sirt1 overexpression in NCMs did not significantly modify the expression of ANF and α-SKA, as previously reported³, or pro-inflammatory genes (Fig. 7a). However, overexpression of Sirt1 significantly increased the expression levels of PGC1α, MCAD and *mcpt-1α*. In order to assess the involvement of FGF21 in the actions of Sirt1, we first treated Sirt1-overexpressing NCMs with FGF21-neutralizing or control antibodies (Supplementary Fig. S3A). Notably, incubating NCMs with an anti-FGF21 antibody abolished the Sirt1-induced upregulation of PGC1α, MCAD and *mcpt-1α*. Although Sirt1 overexpression had no effect on the expression levels of pro-inflammatory genes, the presence of FGF21-neutralizing antibody significantly increased TNFα and IL-6 mRNA levels in NCMs in the absence of Sirt1 overexpression. Moreover, blockade of FGF21

significantly induced MCP-1, TNFα and IL-6 transcript levels in the presence of overexpressed Sirt1.

In order to confirm the involvement of endogenous FGF21 expression in the actions of Sirt1 using an independent experimental approach, we next overexpressed Sirt1 in neonatal



mouse CMs obtained from wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 7b and Supplementary Fig. S3B). As in rat NCMs, Sirt1 overexpression in wild-type mouse NCMs significantly induced PGC1 α , whereas it did not significantly modify the expression of pro-inflammatory marker genes. However, Sirt1 overexpression in mouse NCMs from *Fgf21*^{-/-} mice induced the expression of pro-inflammatory markers and strongly reduced PGC1 α , MCAD and mcp1- α expression levels. Finally, we explored the role of endogenous production of FGF21 in cardiac cells by studying the effects of the hypertrophic agent phenylephrine in mouse NCMs from wild-type and *Fgf21*-null mice (Fig. 7c). Although phenylephrine is unable to induce an increase in CM size in the mouse CM cell culture model²³, in contrast to its actions in rat NCMs cultures, the hypertrophy-associated pro-inflammatory response is known to be mimicked in this model. In cardiac cells from wild-type mice, phenylephrine exposure significantly induced only the expression of IL-6. However, the pro-inflammatory response was dramatically enhanced in phenylephrine-treated mouse NCMs from *Fgf21*^{-/-} mice, and phenylephrine treatment of *Fgf21*^{-/-} mouse NCMs not only enhanced the induction of IL-6 but also induced a significant increase in the expression of MCP-1 and TNF α . Moreover, phenylephrine downregulated PGC1 α expression only in mouse NCMs from *Fgf21*^{-/-} mice.

Collectively, these data indicate that the effects of Sirt1/phenylephrine in cardiac cells require FGF21 expression and release.

Discussion

In the present study, we demonstrate that the heart is a target of systemic FGF21 as well as a potential source of FGF21 expression and release, as summarized in Fig. 7d. The absence of FGF21 is associated with cardiac alterations, including signs of hypertrophy, dilatation and cardiac dysfunction. A more pronounced hypertrophic response of the murine heart following isoproterenol is observed in mice lacking FGF21, whereas treatment with FGF21 protects against cardiac hypertrophy. *FGF21* gene expression in cardiac cells is, in turn, stimulated by hypertrophic stimuli, and it is under the transcriptional regulation of the Sirt1-PPAR α pathway.

This study is the first to establish the importance of FGF21 in the heart. A few previous reports have provided some evidence that the heart is a potential target of FGF21 (refs 24,25). A recent study claimed significant cardioprotective effects of FGF21 in a mouse model of experimental MI²⁶; and a patent has been filed to exploit this therapeutic potential²⁷. Our present data clearly establish that FGF21 has a strong impact on cardiac function. FGF receptors are highly expressed in the heart, as shown here and observed previously²⁵. We found in heart significant levels of β -Klotho protein, the coreceptor required for the biological action of FGF21 (refs 19,21). Moreover, we found that, in cardiac cells, FGF21 induced ERK1/2 activation, the canonical mechanism known to transduce FGF21 actions on the cell surface to intracellular targets^{19,21}. In summary, our present results are consistent with the heart being a direct target of FGF21 effects.

The current findings indicate that FGF21 may exert protective effects on cardiac muscle both *in vivo* and *in vitro*. The first signs of cardiac hypertrophy developed spontaneously in *Fgf21*^{-/-} mice. The lack of other systemic alterations in the *Fgf21*^{-/-} mice strain and the very early appearance of heart alteration (propensity to hypertrophy in 6-day-old *Fgf21*^{-/-} mice) suggest that the alterations in the heart owing to FGF21 deficiency were direct. Using the continuous isoproterenol-infusion model in mice to induce cardiac hypertrophy²⁸, we found that the

hypertrophic response was enhanced in *Fgf21*^{-/-} mice, as evidenced by a substantially increase in the LV mass and cross-sectional area of CMs. Despite the fact that LV wall thickness was not increased in *Fgf21*^{-/-} mice compared with wild-type mice after isoproterenol treatment, we observed a marked dilatation and cardiac dysfunction in *Fgf21*^{-/-} mice, with indications of eccentric hypertrophic development. Our data also indicate that the lack of FGF21 makes the heart more prone to develop cardiac dilatation and pump dysfunction after isoproterenol treatment, features that, in wild-type mice, are known to develop only after very long-term isoproterenol administration (6 months)²⁸.

Results evidenced the dependence of proper cardiac function on FGF21 as an early event in the developing postnatal mouse: increased sensitization to hypertrophic induction was already present in *Fgf21*^{-/-} neonates, and normal cardiac growth could be restored by FGF21 treatment in *Fgf21*^{-/-} neonates. Notably, in newborns and adult *Fgf21*^{-/-} mice treated with isoproterenol, upregulation of pro-inflammatory markers was accompanied by a decrease in PGC1 α expression levels. It has been previously shown that PGC1 α is repressed by hypertrophic²⁹ and pro-inflammatory^{30,31} stimuli. We show here that the inhibitory action of FGF21 on cardiac hypertrophy and inflammation was associated with the induction of PGC1 α . The ability of FGF21 to induce PGC1 α expression has been previously reported in adipose tissues^{15,32}. We observed a rapid induction of CREB phosphorylation in response to FGF21, a finding in accord with previous studies on FGFR1-mediated induction of CREB in other cell types³³. This last event may explain the fact that FGF21 induced the expression of PGC1 α , a target of CREB³⁴, and an established repressor of the NF- κ B pro-inflammatory pathway³⁵.

We further report that cardiac cells are not only targets of FGF21 effects but they may also be an active site of FGF21 expression and release. Moreover, the Sirt1-PPAR α pathway, which is known to be involved in the regulation of FGF21 expression in the liver in the context of the control of carbohydrate and lipid metabolism³⁶, was found to have a pivotal role in controlling FGF21 expression and release in cardiac cells. Pro-inflammatory pathways are considered critical elements in the development of cardiac pathologies, such as hypertrophy and heart failure². Under conditions of cardiac stress, the heart releases proteins (for example, ANF) that function in an endogenous feedback mechanism to control growth-promoting stimuli, a system that is considered to serve as a compensatory mechanism to mitigate the initial damage. Although FGF21 cardiac secretion was lower than in classical FGF21-expressing cells, FGF21 protein was substantially secreted by cardiac cells in response to cardiac stress, and cardiac FGF21 secretion was able to inhibit isoproterenol/phenylephrine-induced cardiac hypertrophic damage. The enhanced pro-inflammatory response observed in the hearts of *Fgf21*^{-/-} mice is consistent with the protective role of FGF21 under hypertrophic conditions.

We obtained two lines of evidence supporting an endogenous role of FGF21 expression and secretion in cardiac cells in mediating responsiveness to Sirt1 and phenylephrine: altered responses in cardiac cells from *Fgf21*^{-/-} mice and suppression of the action of Sirt1 by FGF21 antibodies. This leads us to hypothesize that, in addition to the protective role of systemic, circulating FGF21 on the heart, the local secretion of FGF21 in the context of cardiac damage may serve as an endogenous, autoregulatory, cardioprotective signalling pathway. Confirmation of an autocrine role of cardiac FGF21 *in vivo* will require further experimental research based on tissue-specific FGF21 loss-of-function models.

Collectively, the findings reported in this study indicate positive effects of FGF21 on the heart in the context of

pathological conditions, such as the hypertrophic state. Further research is warranted to explore FGF21 as a potential tool in the development of medical strategies to prevent and/or treat cardiac damage.

Methods

Animals. *Fgf21*^{-/-} mice (B6N;129S5-*Fgf21*^{tm1Lex/Mmcd}) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Centre (MMRRC), an NCR-NIH-funded strain repository, and were donated to the MMRRC by Genentech, Inc. *Ppar α* -null mice (B6.129S4-*Ppara*^{tm1Gonz/J}) were obtained from Jackson laboratory (Bar Harbour, ME, USA). Wild-type littermates were used as controls for all experiments with *Fgf21*-null mice and *Ppar α* -null mice. All experiments were performed in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Interventions in neonatal mice. Cardiac hypertrophy was induced in neonatal mice by intraperitoneally (i.p.) injecting wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice 6-day-old neonates with isoproterenol (15 mg kg⁻¹ per day; Sigma, St Louis, MO, USA) alone or combined with FGF21 (2.5 µg g⁻¹ per day; Biovendor, Modrice, Czech Republic), for 7 days. Wild-type and *Ppar α* -null mice 6-day-old neonates were injected (i.p.) with isoproterenol alone or in combination with resveratrol (RSV = 50 mg kg⁻¹ per day; Sigma), for 7 days. The effects of the inflammatory process were assessed by injecting (i.p.) 1-day-old wild-type and *Fgf21*^{-/-} neonates with LPS (5 mg Kg⁻¹; Sigma) for 6 h.

Isoproterenol infusion in adult mice and echocardiography. Four-month-old male mice age-matched from wild-type and *Fgf21*^{-/-} mice were anesthetized with 1.5% isoflurane and subcutaneous Alzet osmotic minipumps containing PBS or isoproterenol, the latter calibrated to release the drug at a rate of 15 mg kg⁻¹ per day for 7 days, were surgically implanted subcutaneously in the interscapular region of the mouse. This treatment did not significantly modify circulating FGF21 levels (501 ± 42 pg ml⁻¹ in controls versus 541 ± 63 pg ml⁻¹ in isoproterenol-treated mice, *P* = 0.399). Hypertrophy was assessed by echocardiography with a Vivid Q (GE healthcare, Piscataway, NJ, USA) instrument equipped with a 12-MHz microprobe. Ventricular measurements in M-mode were made after 7 days of isoproterenol treatment. Three different cardiac cycles were measured for each assessment, and average values were obtained. Analyses of echocardiographic images were performed by two different observers in a blinded manner.

Cardiac interventions in adult mice. The TAC surgical procedure in mice has been performed by opening the chest and ligating the transverse aorta between the truncus brachiocephalicus and the left common carotid artery by tying a 6–0 silk suture against a 25-G (gauge) needle. Mice were killed 28 days after TAC. MI was induced by coronary artery ligation. After opening the left thorax intracostally and exposing the heart, the left descending coronary artery was ligated just proximal to its main branching point with a 6–0 polypropylene suture. Mice were killed either 5 or 28 days after MI surgery. I/R was induced by ligation of the left descending coronary artery just proximal to its main branching point with a 6–0 polypropylene suture. The suture was tied over a 3-mm long polyethylene tube (PE-10) that was left in place for 30 min. Blood flow was then re-established by removal of the tube. Mice were killed after 24 h of reperfusion.

Histological analysis and detection of β -klotho. Hearts were fixed for 12–24 h in 10% neutral-buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned. Sections were deparaffinized and subsequently stained with H&E to determine CM short axis cross-sectional area in the LV. H&E-stained sections were quantified using Image J software. Fibrosis was assessed using Masson's Trichrome staining. β -klotho expression was detected in paraffin sections by immunohistochemistry using 10 µg ml⁻¹ of anti- β -klotho antibody (LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA), according to the manufacturer's protocol. Nuclei were stained with hematoxylin.

Fatty acid oxidation. Oxidation of [¹⁴C]-oleic acid from freshly isolated heart homogenates was performed to assess FAO. Heart tissue was homogenized in sucrose/Tris/EDTA buffer and incubated for 60 min in reaction mixture (pH 8.0) containing [1-¹⁴C]-oleic acid, after which trapped CO₂ was measured.

Blood pressure and heart rate. Mouse blood pressure was measured using the tail-cuff method. Mice were trained on the Leticia/Panlab (Barcelona, Spain) Blood Pressure Analysis System, used according to the manufacturer's instructions for 4 days. Six consecutive measurements on the last day were averaged to calculate systolic, diastolic and mean arterial blood pressure, and heart rate.

Cell culture. Hearts from neonatal rats were digested with a collagenase solution (Collagenase Type I; Life Technologies Ltd, Paisley, UK) followed by differential plating to obtain the NCMs.

Mouse NCMs were obtained from wild-type and *Fgf21*-null mice. The experimental procedure for the culture of mouse NCMs was basically the same as that for rat NCMs. The collagenase used was type II, and instead of newborn calf serum, fetal calf serum was used.

NCMs were stimulated with either the α_1 -adrenergic agonist phenylephrine (10 µmol l⁻¹; Sigma), a hypertrophic growth factor, or the pro-inflammatory agent LPS (10 ng ml⁻¹; Sigma). After treating for 24 h, cells were harvested for RNA isolation. Where indicated, cells were treated with the PPAR α antagonist GW6471 (1 µmol l⁻¹; Sigma) or FGF21 (Biovendor) for 24 h before phenylephrine exposure for additional 24 h. Antibodies against IgG (Sigma) or FGF21 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) were added after the 24 h pretreatment.

Isolation of adult primary CMs. Excised mouse hearts were perfused with calcium-free KRB solution containing collagenase (1 mg ml⁻¹) using a Langendorff perfusion apparatus until they became flaccid. The resulting cell suspension was filtered to remove undigested material, and the CM were separated from non-CMs (Non-CM) by sedimentation. Cardiac fibroblasts were isolated from neonatal wild-type mice. Briefly, excised ventricular tissues were minced into small pieces in a mixture of 0.2% collagenase type 2 and 0.25% trypsin. Minced tissue was then incubated with agitation at 37 °C for 1 h. The supernatant was collected, and the remaining tissue was immersed in digestion solution. The supernatants were pooled and filtered through a 400-µm nylon mesh filter, then centrifuged at 1,000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed, and cells were placed into fibroblast culture media and incubated for 2 h at 37 °C.

Detection of myosin heavy chain in mouse NCMs by immunohistochemistry.

Mouse NCMs were immunostained using a specific anti-mouse myosin heavy chain antibody, developed by Fischman and colleagues (MF-20; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA).

RNA isolation and RT-PCR. Total RNA was extracted using Tripure (Roche, Indianapolis, IN, USA). RT was performed, using random hexamers primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 0.5 µg RNA in a total reaction volume of 20 µl. PCR was conducted in duplicate for increased accuracy. Taqman Gene Expression Assays were used (Supplementary table S7), and each 25 µl of reaction mixture contained 1 µl cDNA, 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM probes and 900 nM primers from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix or Assays-by-Design Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems). Each sample was run in duplicate and the mean value was used to calculate the mRNA expression of the gene of interest and the housekeeping reference gene (*Cyclophilin A*, *PPIA*). The mRNA level of the gene of interest in each sample was normalized to that of the reference control using the comparative (2^{- Δ CT}) method following the manufacturer's instructions.

Adenoviral-mediated gene transduction. A recombinant adenovirus expressing murine Sirt1 cDNA was constructed (Ad5-CMV-Sirt1, CEBATEG, Barcelona)³⁷. NCMs were infected with the Sirt1 adenoviral vector (Sirt1) or an AdCMV-GFP control vector (GFP) at 10 IFU per cell for 24 h in serum-free medium.

Analysis of plasma metabolite and hormone levels. Glucose and triglycerides levels were measured using the Accutrend Technology system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Free fatty acids and ketone bodies were measured using a colorimetric kit (Wako Chemicals USA Inc, Richmond, VA, USA). Leptin, insulin, IL-6, MCP-1 and resistin were quantified in 20 µl of plasma using a multiplex system (MADPK-71K, Linco Research/Millipore, Saint Charles, MO, USA) and a Luminex 100ISv2 equipment. ANF plasma levels were determined using an ELISA kit specific for ANF (Abcam, San Francisco, CA, USA).

Cellular ROS levels. Intracellular ROS generation was assessed using an intracellular ROS assay kit from Cell Biolabs (San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

NF- κ B activity and western blotting. NF- κ B activity was measured in protein extracts using the NF- κ B (p65) Transcription Factor Assay kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA). FGF21 protein levels in NCMs culture media were detected using an FGF21 ELISA kit (Biovendor). β -Klotho protein levels were determined using specific mouse β -Klotho ELISA kits (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China). Western blot analyses (Supplementary table S8) were performed using antibodies against ERK, P-ERK, FGFR1, P-FGFR1, CREB and P-CREB (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA); β -Klotho (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); α -tubulin (Sigma) and PGCI α (Santa Cruz). Full-length images of immunoblots are shown in Supplementary Fig. S4.

Statistics. Results are presented as means ± s.e.m.s. Data were analysed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni or Dunnet's post-hoc tests as appropriate, using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

References

- van Bilsen, M., van der Vusse, G. J. & Reneman, R. S. Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflugers Arch.* **437**, 2–14 (1998).
- Smeets, P. J. *et al.* Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPARalpha and PPARdelta. *J. Biol. Chem.* **283**, 29109–29118 (2008).
- Planavila, A., Iglesias, R., Giral, M. & Villarroya, F. Sirt1 acts in association with PPAR{alpha} to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **90**, 276–284 (2011).
- Fredj, S., Bescond, J., Louault, C. & Potreau, D. Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J. Cell Physiol.* **202**, 891–899 (2005).
- Gnecchi, M. *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* **11**, 367–368 (2005).
- Doroudgar, S. & Glembotski, C. C. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. *Trends Mol. Med.* **17**, 207–214 (2011).
- Frost, R. J. & Engelhardt, S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation* **116**, 1768–1775 (2007).
- Stastna, M., Chimenti, I., Marban, E. & Van Eyk, J. E. Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics* **10**, 245–253 (2010).
- Badman, M. K. *et al.* Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell. Metab.* **5**, 426–437 (2007).
- Galman, C. *et al.* The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell. Metab.* **8**, 169–174 (2008).
- Inagaki, T. *et al.* Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell. Metab.* **5**, 415–425 (2007).
- Muise, E. S. *et al.* Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol. Pharmacol.* **74**, 403–412 (2008).
- Izumiyama, Y. *et al.* FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* **582**, 3805–3810 (2008).
- Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **286**, 12983–12990 (2011).
- Hondares, E. *et al.* 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**, 206–212 (2010).
- Kharitonov, A. *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* **115**, 1627–1635 (2005).
- Dutchak, P. A. *et al.* Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* **148**, 556–567 (2012).
- Kharitonov, A. *et al.* FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J. Cell Physiol.* **215**, 1–7 (2008).
- Kurosu, H. *et al.* Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* **282**, 26687–26695 (2007).
- Jin, Y. *et al.* Cloning and expression of fibroblast growth factor receptor-1 isoforms in the mouse heart: evidence for isoform switching during heart development. *J. Mol. Cell Cardiol.* **26**, 1449–1459 (1994).
- Ogawa, Y. *et al.* BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 7432–7437 (2007).
- Uebanso, T. *et al.* Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: is FGF21 a nutritional adaptation factor? *PLoS One* **6**, e22976 (2011).
- Karlinter, J. S. *et al.* Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 1779–1786 (2000).
- Xu, J. *et al.* Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**, 250–259 (2009).
- Xu, J. *et al.* Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin resistant mouse models---Association with liver and adipose tissue effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, 1105–1114 (2009).
- Liu, S. Q. *et al.* Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischaemia. *Mol. Cell Biomech.* **8**, 319–338 (2011).
- Liu, S. Q. Cardioprotective role of hepatic cells and hepatocyte secretory factors in myocardial ischemia. US patent. WO 2011/006072 A2.
- Booyens, H. L., Norton, G. R., Opie, L. H. & Woodiwiss, A. J. Reverse chamber remodelling following adrenergic-induced advanced cardiac dilatation and pump dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 238 (2012).
- Lehman, J. J. & Kelly, D. P. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **29**, 339–345 (2002).
- Schilling, J. *et al.* Toll-Like Receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} coactivator-1 signaling. *Circ. Heart Fail* **4**, 474–482 (2011).
- Alvarez-Guardia, D. *et al.* The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc. Res.* **87**, 449–458 (2010).
- Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
- Stachowiak, E. K., Fang, X., Myers, J., Dunham, S. & Stachowiak, M. K. cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *J. Neurochem.* **84**, 1296–1312 (2003).
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc. Res.* **79**, 208–217 (2008).
- Eisele, P. S., Salatino, S., Sobek, J., Hottiger, M. O. & Handschin, C. The PGC-1 coactivators repress the transcriptional activity of NF-kappaB in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 2246–2260 (2012).
- Purushotham, A. *et al.* Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell. Metab.* **9**, 327–338 (2009).
- Amat, R. *et al.* SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J. Biol. Chem.* **284**, 21872–21880 (2009).

Acknowledgements

We thank I. Navarro, J. Correas and E. Verdaguer for technical support. This work was supported by Grant SAF2011-23636 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, funded in part by the European Community's Seventh Framework Program (FP7 BetaBat). A.P. was supported by a post-doctoral grant from Instituto de Salud Carlos III. IR was supported by a pre-doctoral fellowship from Gobierno Vasco (Programa de Formación de investigadores del DEUI).

Author contributions

The experiments were conceived and designed by A.P. and F.V.; experiments were performed by A.P., I.R., E.H. and R.I.; echocardiography was performed by L.A.G. and M.S.; experiments in adult CMs were performed by M.V.; TAC, MI and I/R experiments were performed by C.M. and M.v.B.; data were analysed by A.P., M.G. and F.V. The paper was written by A.P. and F.V.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Planavila, A. *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat. Commun.* 4:2019 doi: 10.1038/ncomms3019 (2013).

Cardioprotective Role of FGF21 during pregnancy

Título: **El papel cardioprotector de FGF21 durante la gestación**

Objetivo: FGF21 es un factor endocrino involucrado en varios procesos fisiológicos y patológicos en los que actúa como un regulador metabólico. Estudios recientes han mostrado que FGF21 tiene también un rol importante en el miocardio. La gestación es un modelo fisiológico de hipertrofia cardíaca adaptativa y reversible, cuyos mecanismos determinantes para este tipo de hipertrofia no son del todo conocidos. En este trabajo analizamos el papel de Fgf21 durante el desarrollo de la gestación y su relevancia fisiológica.

Resultados: Ratones hembra a día 18 de gestación se usaron como modelo de gestación en fase terminal o tardía. Encontramos que los niveles de expresión de Fgf21 estaban específicamente elevados en hígado y corazón de las hembras Wt gestantes de manera dependiente de PPAR α . Este aumento ocurría de manera conjunta a niveles elevados de FGF21 en plasma. Además, la gestación inducía cambios en la expresión de los receptores de FGF21, FGFR y β -klotho, y activaba la vía de señalización intracelular de FGF21 específicamente en corazón. Finalmente, encontramos que las hembras de ratones Fgf21^{-/-} no desarrollaban hipertrofia cardíaca gestacional en comparación con las hembras Wt. Los corazones de hembras Fgf21^{-/-} además, mostraban niveles de oxidación de ácidos grasos reducidos y niveles mayores del transportador de glucosa GLUT4 que podría comprometer la función metabólica cardíaca durante la gestación.

Conclusiones: Mostramos cómo durante la gestación el FGF21 producido sistémicamente y endógenamente en el corazón actúa de forma específica en el corazón guiando la respuesta cardíaca fisiológica normal. Es por esto que FGF21 actúa como un factor endocrino/autocrino requerido para la respuesta hipertrófica del corazón durante la gestación.

Cardioprotective role of Fgf21 during pregnancy

Redondo-Angulo I.¹, Mas-Stachurska A.², Sitges M.², Giralt M.¹, Villarroya F.¹ and Planavila

A.^{1*}

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), 08028 Barcelona, Spain.

² Cardiology Department, Thorax Institute, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain.

* To whom correspondence should be addressed: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028-Barcelona. Spain. Tel. 34-93-4021549; Fax: 34-93-4021559; E-mail: aplanavila@ub.edu

Abstract

Aim. Fgf21 is an endocrine factor involved in many physiological and pathological processes acting mainly as a metabolic regulator. Recent studies have also shown an important role of Fgf21 in cardiac tissue. Pregnancy is a physiological model of adaptive and reversible heart enlargement, but the molecular mechanisms determining this kind of physiologic cardiac hypertrophy are poorly known. Here, we analyzed the role of Fgf21 during the development of pregnancy and its physiological relevance.

Results. Female mice at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. We found that Fgf21 expression levels were specifically increased in the liver and heart from wt pregnant mice in a PPAR α -dependent manner. This increase was associated with higher levels of plasma Fgf21. Moreover, pregnancy induced changes in the levels of the Fgf21 receptors, FGFR and β -klotho, and activate the Fgf21 intracellular signalling pathway specifically in the heart. Finally, we found that Fgf21^{-/-} mice did not develop pregnancy-induced cardiac hypertrophy relative to wt mice. Furthermore, hearts from Fgf21^{-/-} mice have reduced fatty acid oxidation levels and increased levels of the glucose transporter Glut4 that may compromise metabolic cardiac function during pregnancy.

Conclusions. Here we found that during pregnancy the systemic and cardiac endogenously produced Fgf21 acts specifically in the heart leading to the normal physiological cardiac response. Thus, Fgf21 acts as an endocrine/autocrine factor required for cardiac hypertrophy response to gestation.

Introduction

Fgf21 is a secreted protein that acts as a metabolic regulator and plays an important role in the control of glucose homeostasis, insulin sensitivity, and ketogenesis (1,2). The main site of Fgf21 production and release into the blood is considered to be the liver and is under the control of transcription factor PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor- α) (1,3). Extra-hepatic tissues, such as white and brown adipose tissues and skeletal muscle, also express Fgf21 (4-6). The action of Fgf21 on target cells requires FGF receptors (FGFR) and β -Klotho, a single-pass transmembrane protein that functions as an obligate cofactor for Fgf21 signaling (7,8).

Endocrine actions of Fgf21 include the promotion of glucose uptake by white adipocytes through induction of the glucose transporter, Glut1 (9), activation of brown fat thermogenic activity (10), and promotion of the appearance of brown fat-like cells in white fat—the so-called “browning” process (11). Fgf21 also has autocrine/paracrine effects, such as induction of hepatic ketogenesis (1). Despite initial evidence excluding the heart as a target tissue of Fgf21, recent studies have demonstrated that Fgf21 plays an important role in cardiac remodeling (12-15). Actually, it has been shown that the heart is a target as well as a source of Fgf21. It expresses both, the FGFR1 and the co-receptor β -klotho, and it is also an Fgf21 producing tissue (12). Fgf21 protects the heart against pathologic cardiac hypertrophy and myocardial infarction in mice models (12,13,15). While the therapeutic potential of Fgf21 is clear, the complete range of naturally occurring conditions where Fgf21 is functionally important is still poorly known. Recent studies have shown that the circulating levels of Fgf21 are increased in late pregnancy in the mouse being the liver the main contributor to these systemic levels (16). However, the physiologic relevance of this Fgf21 increase during pregnancy and the potential cardiac involvement remains to be defined.

During pregnancy, the heart enlarges to compensate for the increased cardiac output. This increase in volume overload induces eccentric hypertrophy characterized by chamber

enlargement and a proportional change in wall thickness (17). This kind of cardiac hypertrophy is reversible and occurs without morbid effects on cardiac function (18). The molecular mechanisms involved in this physiological form of cardiac hypertrophy have been poorly studied. Understanding the molecular mechanisms controlling specifically physiological hypertrophy may have important implications for the treatment of cardiac disease. One of the features of pregnancy is an increase in fatty acid oxidation in the heart and a decrease in glucose utilization (19). By contrast, cardiac dysfunction is usually accompanied by a switch from fatty acid to glucose metabolism which has been considered a cause instead of a consequence of the pathologic cardiac response due to the inability of the heart to maintain a constant contractile function when energy comes from glucose instead of fatty acids (20-23).

The aim of this study is to determine the physiological role of Fgf21 during pregnancy. We show that pregnancy increases systemic and cardiac Fgf21 production which is associated with an activation of the Fgf21 intracellular signalling pathway specifically in the heart. Moreover, we demonstrate that Fgf21 insufficiency (*Fgf21*^{-/-} mice) blocks the physiological cardiac hypertrophy response associated to pregnancy. Therefore, the systemic and cardiac endogenous production of Fgf21 is identified as a major mediator of the physiologic development of cardiac hypertrophy during late pregnancy.

Materials and methods

Animals

Fgf21^{-/-} mice (B6N;129S5-*Fgf21*^{tm1Lex}/Mmcd) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), an NCRR-NIH-funded strain repository, and were donated to the MMRRC by Genentech, Inc. *Ppara*^{-/-} mice (B6.129S4-*Ppara*^{tm1Gonz}/J) were obtained from Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Wild-type littermates were used as controls for all experiments with *Fgf21*-null mice and *Ppara*-null mice. Wild-type, *Ppara*^{-/-} and *Fgf21*^{-/-} female

mice were mated overnight with genotype-matched male mice. The male was removed from the cage the next morning. Female mice were closely observed to confirm pregnancy by weight increase and abdominal bulging. When pregnant, the night after being mated was considered d0. At day 18 (d18) pregnant mice (P) were sacrificed. Age-matched non-pregnant female mice (NP) served as control mice (n=5-6 animals per group).

All experiments were performed according to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

Echocardiography in pregnant mice

Four month-old wild-type and *Fgf21*^{-/-} pregnant and non-pregnant mice were anesthetized with 1.5% isoflurane. Cardiac dimensions were assessed by echocardiography with a commercially available system (Vivid Q, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) instrument equipped with a 12-MHz linear probe. Ventricular dimensions were measured using M-mode scans across the left ventricle at day 18 of pregnancy. Three different cardiac cycles were measured for each assessment, and average values were obtained. Analyses of echocardiographic images were performed by two different observers in a blinded manner.

Analysis of plasma metabolites and hormone levels

Glucose and triglycerides levels were measured using the Accutrend Technology system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Non-esterified fatty acids (NEFAs) and Ketone bodies (KB) were measured in serum using an *in vitro* enzymatic colorimetric assay (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA). Leptin, insulin, resisitn, IL-6, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were quantified in 20 µl of plasma using a multiplex system (MADPK-71K, Linco

Research/Millipore, Saint Charles, MO, USA) and a Luminex 100ISv2 equipment. Fgf21 plasma levels were measured using a mouse FGF21 ELISA kit (Biovendor, Modrice, Czech Republic).

Administration of Fgf21 *in vivo*

For analysis of acute signalling events in the heart, recombinant mouse Fgf21 (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, CA, USA) was administered via the inferior vena cava to anesthetized adult mice. Briefly, mice were anesthetized with 1.5% isoflurane inhalation. The peritoneal cavity was then exposed and either Fgf21 (50ng/g) or saline was injected directly into the inferior vena cava in a total volume of 100 μ l. After 10 min, the heart was dissected, frozen and stored at -80° .

Heart histology

The heart was extracted and cut at mid-height transversely. One half was preserved in 4% formaldehyde for fixation and was later embedded in paraffin and sectioned. Sections were deparaffinized and subsequently stained with H&E to determine cardiomyocyte size. Using ImageJ software individual cardiomyocyte contours were selected and cellular surface measured. To determine presence of fibrosis Masson's Trichrome Staining (Panreac, Barcelona) was performed.

Gene expression

Total RNA from left-ventricular tissue was isolated with TriPure (Roche, Indianapolis, IN, USA). RNA from the liver, brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) was extracted with the aid of NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, Germany). RT was performed, using random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 0.5 μ g RNA in a total reaction volume of 20 μ l. Taqman Gene Expression Assays

were used, and each 20 μ l of reaction mixture contained 1 μ l cDNA, 10 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM probes and 900 nM primers from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix or Assays-by-Design Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems). The mRNA level of the gene of interest in each sample was normalized to that of the reference control using the comparative ($2^{-\Delta\text{CT}}$) method following the manufacturer's instructions. In the heart Cyclophilin A, Ppia was used as the reference gene whereas 18S rRNA was the reference gene for the liver, BAT and WAT.

Protein extraction and Western-blot

Western blot analyses were performed using antibodies against total ERK, phosphorylated-ERK (P-ERK; Cell Signaling Technology); β -Klotho (R&D Systems); Tubulin, and GAPDH (Sigma). Whole tissue lysates were obtained as described before(24). Proteins were separated by SDS-PAGE on 10% gels, and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore).

Fatty Acid oxidation measurement

Oxidation of [^{14}C]-oleic acid from freshly isolated heart homogenates was performed as previously reported (25). Briefly, tissue was homogenized in sucrose/Tris/EDTA buffer, and was incubated for 60 min in the reaction mixture (pH 8.0), containing [$1\text{-}^{14}\text{C}$] oleic acid, and measured for trapped CO_2 .

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Data were analyzed by independent t-tests or one-way ANOVA followed by Bonferonni or Dunnet's post-hoc tests, as appropriate, using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A p-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Systemic and cardiac expression of Fgf21 is increased during pregnancy in a PPAR α -dependent manner

To determine the role of Fgf21 during pregnancy, we first analyzed the circulating and the expression levels of Fgf21 in the liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), and heart in non-pregnant and late pregnant mice (day 18) (Fig. 1A). We found that pregnancy significantly induced the plasmatic levels of Fgf21. This increase was accompanied by a dramatic induction of the mRNA levels of Fgf21 in the liver, but not in the adipose tissues BAT and WAT. Next, we analyzed the expression levels of Fgf21 in the hearts of these mice. We found that Fgf21 transcript levels were also significantly induced in the heart of pregnant mice compared to non-pregnant mice.

In parallel, the expression levels of Fgf21 were analyzed in the PPAR α -null mice (*Ppara*^{-/-} mice) in order to elucidate the implication of PPAR α in the control of Fgf21 (Fig. 1B). We found that circulating levels of Fgf21 were decreased in pregnant *Ppara*^{-/-} mice compared to wt pregnant mice. This decrease in the plasmatic levels of Fgf21 was accompanied by a huge decrease in the transcript levels of Fgf21 in the liver –the main contributor to the systemic Fgf21 levels– of *Ppara*^{-/-} pregnant mice compared to wt pregnant mice, but not in other Fgf21-producing tissues such as the white and brown adipose tissues (WAT and BAT). Finally, the cardiac Fgf21 expression levels were decreased in pregnant *Ppara*^{-/-} mice compared to wt pregnant mice indicating an important role of PPAR α in the control of cardiac Fgf21 during pregnancy.

In summary, these data indicate that during pregnancy Fgf21 is systemically increased –mainly due to the liver– and locally produced in the heart. Moreover, this gestational induction of Fgf21 is under control of the PPAR α transcription factor.

Cardiac Fgf21 receptors are induced in late pregnancy

In order to characterize the Fgf21 system during pregnancy, we next analyzed the expression levels of the Fgf21 receptor (FGFR) and the co-receptor β -klotho in liver, WAT, BAT, and heart of non-pregnant and late pregnant mice (Fig. 2A). We found that the expression levels of the FGFR and β -klotho in the liver, WAT, and BAT were unchanged during pregnancy. By contrast, we found that the expression level of the cardiac FGFR1 was increased more than 2-folds in pregnant mice compared to non-pregnant mice. Furthermore, the transcript levels of the co-receptor β -klotho in the heart, the one conferring the specificity of the Fgf21 signaling; were clearly up-regulated (37-folds) in late pregnant mice. Next, we determined the protein levels of the co-receptor β -klotho in non-pregnant and pregnant mice (Fig. 2B). As expected, the protein levels of β -klotho were not modified in liver, WAT, and BAT in pregnant versus non-pregnant mice. However, the protein levels of β -klotho were higher in the hearts of pregnant mice compared to non-pregnant mice.

In conclusion, during pregnancy in contrast to other Fgf21-target tissues, the heart induces the expression of the Fgf21 receptors FGFR1 and β -klotho.

Pregnancy activates the Fgf21 signaling pathway in the heart

In order to determine whether the intracellular Fgf21 signaling pathway is activated in the tissues during pregnancy, we analyzed the phosphorylation of ERK (extracellular signal-regulated kinase)-1/2, bona fide indicator of a β -Klotho/FGF receptor-dependent cellular response to Fgf21 (26). We analyzed ERK-1/2 phosphorylation in pregnant and non-pregnant mice 10 minutes after systemic PBS (control) or Fgf21 injection (Fig. 3). We observed that after systemic Fgf21 injection, ERK1/2 phosphorylation was increased in non-pregnant mice in all the tissues studied, indicating that systemic administration of Fgf21 activates Fgf21 signaling in the liver, WAT, BAT, and heart. However, pregnancy alone significantly increased ERK1/2 phosphorylation

only in the heart, but not in the liver, WAT or BAT. Finally, systemic Fgf21 injection does not lead to an increase in the ERK-1/2 signaling pathway in the liver, WAT, and BAT but is not different from PBS injection in pregnant mice suggesting a sustained activation of the Fgf21 pathway during pregnancy in the heart.

The results indicate that Fgf21 induced the cardiac phosphorylation of ERK1/2 *in vivo*, confirming that Fgf21 targets the heart. Moreover, pregnancy alone leads to an increase in the cardiac ERK1/2 phosphorylation indicating that Fgf21 signaling is activated specifically in the heart of pregnant mice.

Induction of cardiac immediate early gene expression downstream of Fgf21 signaling during pregnancy

The systemic Fgf21 induction during late pregnancy suggests that Fgf21 may be important for the normal gestational performance. Therefore, we studied late pregnancy in the mouse model of Fgf21 invalidation (Fgf21^{-/-}) (Table 1). We found that wt and Fgf21^{-/-} pregnant mice exhibited a similar increase in body weight relative to non-pregnant mice. There were no differences in the litter size or fetus average weight between wt and Fgf21^{-/-} pregnant mice, indicating no different gestational performance. As expected, pregnancy induced an increase in blood triglycerides (TGs) although it was only significant for the Fgf21^{-/-} pregnant mice. No significant differences were found in the circulating glucose, NEFAs, KB, IL6, insulin or resistin levels in any of the conditions studied. Finally, PAI-1 and leptin levels were significantly higher in pregnant mice as previously described (27,28) but without genotype differences. Collectively, these results indicate that Fgf21 deficiency does not determine major alterations in body weight or metabolic profile in late gestation.

Phosphorylation of ERK1/2 by Fgf21 leads to its translocation into the nucleus where it phosphorylates and activates a subset of transcription factors. Among these are elements

regulating the “serum response” that includes rapid transcription of immediate early gene expression such as *Egr1* and *cFos* (29). To confirm *Fgf21* activation during pregnancy, we used this as a secondary readout for *Fgf21* action during pregnancy in wt and *Fgf21*^{-/-} mice (Fig. 4). We found, that in the liver, WAT, and BAT no significant differences were observed in the expression levels of *Egr1* or *cFos* in pregnant mice neither in the wt nor in the *Fgf21*^{-/-} mice. By contrast, the *Egr1* mRNA expression was robustly increased in the heart of wt pregnant mice and was completely blunted in *Fgf21*^{-/-} pregnant mice. Induction of the other immediate early gene *cFos* was also huge in pregnant wt mice and was not significantly induced in *Fgf21*^{-/-} pregnant mice.

These data indicates that pregnancy activates the ERK1/2-immediate early gene expression in the heart in an *Fgf21* dependent manner since this activation is completely lost in pregnant *Fgf21*^{-/-} mice. Therefore during pregnancy the heart seems to be the target of the *Fgf21* systemically and locally generated.

Lack of *Fgf21* impairs the cardiac hypertrophy response during late pregnancy

The specific response of the heart to *Fgf21* during pregnancy, suggests that this factor may be important for the development of the physiologic cardiac hypertrophy usually associated to pregnancy. Thus, we next analyzed the potential impact of the lack of *Fgf21* on cardiac morphology at 18-days of gestation in wt and *Fgf21*^{-/-} mice (Figure 5A). We found that the heart weight/tibia length (HW/TL) ratio, a measure of cardiac enlargement, was significantly increased in wt pregnant mice compared with corresponding control non-pregnant mice. By contrast, the HW/TL ratio was not increased in *Fgf21*^{-/-} pregnant mice compared with corresponding *Fgf21*^{-/-} non-pregnant mice (Fig. 5A).

Next, we analyzed the cross-sectional area of the cardiomyocytes in these hearts (Fig. 5B). We found that the cardiomyocyte area was significantly higher in wt pregnant mice compared to

non-pregnant wt mice. By contrast, in $Fgf21^{-/-}$ mice the cardiomyocyte area was already higher in $Fgf21^{-/-}$ non-pregnant mice and after 18-days pregnancy the cardiomyocyte area was significantly reduced.

In summary, these results indicate that 18-days pregnant mice develop cardiac hypertrophy. However, $Fgf21^{-/-}$ mice lack the capacity to develop the physiological cardiac hypertrophy response associated to pregnancy.

Effects of Fgf21 on pathological markers of cardiac hypertrophy and fibrosis

It has been shown that gestational changes associated to cardiac hypertrophy development do not induce pathologic markers of cardiac hypertrophy such as atrial natriuretic factor (Anf), α -actinin (α -Ska) or the β/α -Myosin heavy chain (Mhc) ratio (17). Effectively, we found that the Anf, α -Ska, and β/α -Mhc mRNA expression levels were not significantly altered in the hearts of wt mice either in non-pregnant or pregnant mice (Supplementary Fig. 1A). However, the expression levels of α -Ska tend to be higher in the $Fgf21^{-/-}$ non-pregnant mice compared to wt mice and the ratio β/α -Mhc was significantly increased in $Fgf21^{-/-}$ pregnant mice compared to $Fgf21^{-/-}$ non-pregnant mice. Collectively, these results further confirm the non-pathological role of the cardiac hypertrophy development in the pregnancy model in wt and $Fgf21^{-/-}$ mice.

Fibrosis develops in the heart in pathologic conditions and is often a hallmark of pathologic cardiac hypertrophy development. Pregnancy induced-physiologic cardiac hypertrophy occurs without fibrosis development (30). We analyzed the presence of fibrosis in the hearts of wt and $Fgf21^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 1B). Using Masson's Trichrome staining, no signs of fibrosis were found in pregnant wt or $Fgf21^{-/-}$ mice. The transcript levels of one of the fibrosis marker Mmp9 (matrix metalloproteinase -9) were also unchanged. Collectively, it is concluded that the physiologic induction of cardiac hypertrophy develops without changes in cardiac fibrosis.

Effects of Fgf21 insufficiency on cardiac metabolism during pregnancy

One of the features of pregnancy is an increase in fatty acid oxidation in the heart (19). To address the impact of the lack of Fgf21 on the metabolic control during late gestation, first we evaluated mRNA expression levels of genes involved in fatty acid oxidation (FAO), namely medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (Mcad), pyruvate dehydrogenase kinase-4 (Pdk4), the fatty acid transporter Cd36, and carnitine palmitoyltransferase (cpt1b) (Fig. 6A). We found that pregnancy significantly induced the expression levels of the cardiac genes involved in fatty acid uptake and oxidation such as Mcad, Pdk4, cd36 and cpt1b in wt mice. In pregnant Fgf21^{-/-} mice, the expression levels of these genes were also significantly increased but to a lower extent in the case of cd36 or cpt1b and were significantly lower in the case of pdk4 compared to wt pregnant mice. In order to determine whether these changes in the expression levels of FAO-associated genes reflect changes in the cardiac fatty acid oxidation, we examined FAO rates in these animals (Fig. 6B). FAO rate was significantly increased after pregnancy in wt mice. By contrast, Fgf21^{-/-} pregnant mice exhibit significantly lower levels of FAO rate compared to wt pregnant mice. These results indicate a reduction in fatty acid consumption in the hearts lacking Fgf21 during pregnancy.

Next, we analyzed the expression levels of the glucose transporters, Glut1 and Glut4 (Fig. 6C). Pregnancy tended to decrease the constitutive glucose transporter Glut1 mRNA expression levels in wt and Fgf21^{-/-} mice although the changes do not reach statistical significance. However, the insulin-dependent glucose transporter Glut4 was unchanged in wt mice but in Fgf21^{-/-} mice instead of being decreased was significantly increased after pregnancy. These events suggest an increase in glucose uptake in the hearts of pregnant Fgf21^{-/-} mice.

Collectively these data indicate that lack of Fgf21 during pregnancy leads to a switch from fatty acid to glucose metabolism in the heart that may compromise cardiac function during pregnancy.

Discussion

Our study shows that hepatic and cardiac Fgf21 is increased during pregnancy in a PPAR α -dependent manner. The systemic induction of Fgf21 targets directly the heart and is necessary for the development of pregnancy-induced physiological cardiac hypertrophy. Thus, lack of Fgf21 impairs the correct development of physiologic cardiac hypertrophy during pregnancy. Moreover, we show that Fgf21 controls the fatty acid oxidation pathways in the heart that may be involved in the normal control of cardiac function associated to pregnancy (Fig. 7).

Late pregnancy is the most nutritionally precarious phase of the mouse reproductive cycle, in contrast to cow, necessitating a significant mobilization of maternal reserves to meet the metabolic demands (31). We show in this paper that plasma levels of Fgf21 were increased during this stage of pregnancy (day 18) in mice, in agreement with Cui *et al.* (16), and in contrast to other species such as cows in which there is no Fgf21 plasmatic changes (32). The physiological meaning of these species differences is unclear and has been related to differences in the maternal nutritional state during late pregnancy. Data available in woman show, but only in the context of gestational diabetes and preeclampsia, a two to threefold elevation in Fgf21 circulating levels in both conditions near delivery when compared to healthy controls (33,34). However, additional data across the entire reproductive cycle in women is needed to evaluate the effects of pregnancy.

We also show that the hepatic production of Fgf21 accounts for the elevated plasma Fgf21, as previously described in other models (1,3,10). We also assessed the contribution of other known expressing tissues such as the WAT and the BAT, being this last one capable of both high Fgf21 expression and plasma contribution (6). We found no differences of expression in any of them, leaving the liver as the major source of increased plasma Fgf21 in the late pregnant mouse.

Finally, we found increased levels of Fgf21 in the heart in late pregnancy. However, the cardiac contribution to the systemic Fgf21 levels remains unknown. The magnitude of Fgf21 expression

by the heart compared with that of other tissues is relatively low (12), although a contribution of cardiac-derived Fgf21 during pregnancy, in which its production is increased, cannot be excluded. In this context, transgenic mice with cardiac-specific Fgf21 overexpression show increased circulating Fgf21 levels and altered body mass composition (35). Finally, we also demonstrate the transcriptional control of hepatic and cardiac Fgf21 by PPAR α during pregnancy, as previously reported in other physiopathologic conditions (3,12,36).

Our present data clearly establish that Fgf21 has a strong impact on cardiac function during pregnancy. In contrast to liver or adipose tissues, FGF receptors are highly increased in the heart during pregnancy. Moreover, we found in the heart a huge increase of β -Klotho protein, the co-receptor required for the biological action of Fgf21 (8,26). Furthermore, we found that systemic Fgf21 induced specifically ERK1/2 activation in the heart during pregnancy, the canonical mechanism known to transduce Fgf21 actions on the cell surface to intracellular targets, as well as, the early response genes Egr1 and cFos (8,26). In summary, our present results are consistent with the heart being a specific direct target of Fgf21 effects during pregnancy.

Pregnancy-related cardiac hypertrophy is a normal physiological compensatory response that enables the heart to enhance its pumping capacity in response to increased demand (17). Therefore, the absence of cardiac hypertrophy development observed when there is a lack of Fgf21 indicate the importance of Fgf21 to maintain the normal cardiac function. This lack of cardiac hypertrophy in Fgf21^{-/-} mice is associated with a switch in the oxidative substrate in the heart that may contribute to the impairment of cardiac function during pregnancy. The control of FAO genes by Fgf21 in the heart has been previously described in pathologic conditions (12). The switch from cardiac fatty acid metabolism to glucose metabolism (in Fgf21-null mice) is one of the features of cardiac dysfunction (20). In this model of pregnancy Fgf21 induces FAO as the normal response of the heart to gestation leading to physiologic hypertrophy. The apparent contradictory role of Fgf21 during hypertrophy development could be explained by the

differences in substrate utilization between pathologic and physiologic hypertrophy. It is still a matter of controversy whether changes in intracellular substrate and metabolite levels in the heart are the cause or the consequence of cardiac dysfunction. However several studies support a role for altered cardiac metabolism in the development of cardiac derangements (21,37-39).

In this physiological model of pregnancy-induced cardiac hypertrophy, the circulating levels of Fgf21 (16) as well as Fgf21 expression levels in the heart are increased, therefore both autocrine and endocrine cardioprotective roles of Fgf21 might be at work. In contrast, in pathological hypertrophy, circulating levels of Fgf21 are unchanged and Fgf21 expression levels are increased only in cardiac tissue, indicating a predominant autocrine role of Fgf21 in the heart in this pathological context (12,40).

In summary, we can conclude that systemic Fgf21 increases as a cardioprotective mechanism to maintain the normal cardiac function during late pregnancy. Current results provide novel insight into the role of Fgf21 in the myocardium, and establish for the first time that Fgf21 is an essential component of the molecular machinery by which physiological cardiac hypertrophy is induced during pregnancy. These findings contribute to understanding the molecular mechanisms underlying the mechanistic differences between pathologic and physiologic cardiac hypertrophy, a subject with important clinical implications in the management of cardiac disease.

Acknowledgments

We thank A. Peró and I. Navarro for technical support. This work was supported by Grants SAF2014-55702-JIN and SAF2014-55725 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Generalitat de Catalunya (2014GR-141), European Community's Seventh Framework Program (FP7 BetaBat, HEALTH-F2-2011-277713) and Fundación BBVA. IR-A was supported by a pre-doctoral fellowship from Gobierno Vasco (Programa de Formación de investigadores del DEUI).

Reference List

1. **Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E.** Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 2007;5:426-437.
2. **Galman C, Lundasen T, Kharitonov A et al.** The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab.* 2008;8:169-174.
3. **Inagaki T, Dutchak P, Zhao G et al.** Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* 2007;5:415-425.
4. **Muise ES, Azzolina B, Kuo DW et al.** Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol Pharmacol.* 2008;74:403-412.
5. **Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitonov A, Walsh K.** FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* 2008;582:3805-3810.
6. **Hondares E, Iglesias R, Giralt A et al.** Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue. *J Biol Chem.* 2011;286:12983-12990.
7. **Kharitonov A, Dunbar JD, Bina HA et al.** FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol.* 2008;215:1-7.
8. **Kurosu H, Choi M, Ogawa Y et al.** Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem.* 2007;282:26687-26695.
9. **Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A et al.** FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 2005;115:1627-1635.
10. **Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F.** 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.* 2010;11:206-212.
11. **Fisher FM, Kleiner S, Douris N et al.** FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 2012;26:271-281.
12. **Planavila A, Redondo I, Hondares E et al.** Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2019.
13. **Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F et al.** Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res.* 2014;
14. **Liu SQ, Roberts D, Kharitonov A et al.** Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci Rep.* 2013;3:2767.

15. **Joki Y, Ohashi K, Yuasa D et al.** FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459:124-130.
16. **Cui Y, Giesy SL, Hassan M, Davis K, Zhao S, Boisclair YR.** Hepatic FGF21 production is increased in late pregnancy in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;307:R290-R298.
17. **Eghbali M, Deva R, Alioua A et al.** Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res.* 2005;96:1208-1216.
18. **Schannwell CM, Zimmermann T, Schneppenheim M, Plehn G, Marx R, Strauer BE.** Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women. *Cardiology.* 2002;97:73-78.
19. **Liu LX, Arany Z.** Maternal cardiac metabolism in pregnancy. *Cardiovasc Res.* 2014;101:545-553.
20. **Planavila A, Calvo RR, Vazquez-Carrera M.** Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of fatty acid oxidation in cardiac hypertrophy. *Mini Rev Med Chem.* 2006;6:357-363.
21. **Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F.** Sirt1 acts in association with PPAR{alpha} to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2011;90:276-284.
22. **Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M.** Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2005;280:17464-17471.
23. **Planavila A, Dominguez E, Navarro M et al.** Dilated cardiomyopathy and mitochondrial dysfunction in Sirt1-deficient mice: a role for Sirt1-Mef2 in adult heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:521-531.
24. **Planavila A, Laguna JC, Vazquez-Carrera M.** Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-kappa B activation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1687:76-83.
25. **Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E et al.** SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature.* 2010;464:121-125.
26. **Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M et al.** BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7432-7437.
27. **Cerneca F, Ricci G, Simeone R, Malisano M, Alberico S, Guaschino S.** Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997;73:31-36.
28. **Zhang L, Sugiyama T, Murabayashi N et al.** The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice. *J Mol Endocrinol.* 2011;47:157-165.

29. **Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ et al.** Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*. 2010;59:2781-2789.
30. **Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR.** Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128:191-227.
31. **Makarova EN, Yakovleva TV, Shevchenko AY, Bazhan NM.** Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in A(y)/a mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;198:169-177.
32. **Schoenberg KM, Giesy SL, Harvatine KJ et al.** Plasma FGF21 is elevated by the intense lipid mobilization of lactation. *Endocrinology*. 2011;152:4652-4661.
33. **Stein S, Stepan H, Kratzsch J et al.** Serum fibroblast growth factor 21 levels in gestational diabetes mellitus in relation to insulin resistance and dyslipidemia. *Metabolism*. 2010;59:33-37.
34. **Stepan H, Kley K, Hindricks J et al.** Serum levels of the adipokine fibroblast growth factor-21 are increased in preeclampsia. *Cytokine*. 2013;62:322-326.
35. **Brahma MK, Adam RC, Pollak NM et al.** FGF21 IS INDUCED UPON CARDIAC STRESS AND ALTERS CARDIAC LIPID HOMEOSTASIS. *J Lipid Res*. 2014;
36. **Lundasen T, Hunt MC, Nilsson LM et al.** PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360:437-440.
37. **Chiu HC, Kovacs A, Ford DA et al.** A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2001;107:813-822.
38. **Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ.** Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J*. 1999;13:805-812.
39. **Taegtmeier H, Overturf ML.** Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension*. 1988;11:416-426.
40. **Planavila A, Redondo-Angulo I, Villarroya F.** FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:133.

Figure Legends

Figure 1. Fgf21 expression during late pregnancy. (A) Plasma and mRNA expression levels of Fgf21 in liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), and heart of wild-type non-pregnant (NP) and pregnant (P) female mice at day 18 of gestation. (B) Plasma and mRNA expression levels of Fgf21 in liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT) and heart of wild-type (wt, *black bars*) and PPAR α ^{-/-} (*white bars*) female mice at day 18 of gestation. Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (*p<0.05 compared to corresponding NP [A] or wt [wt] mice).

Figure 2. Pregnancy induces the Fgf21 receptors in the heart. Expression levels of Fgf21 receptors FGFR and the co-receptor β -klotho (KIB) (A) and protein levels of KIB (B) in liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), and heart of wild-type non-pregnant (NP) and pregnant (P) female mice at day 18 of gestation. (B) Representative images from western-blot (*left*) and protein quantification (*right*). Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (*p<0.05 compared to corresponding NP mice).

Figure 3. Analysis of the ERK1/2 pathway during pregnancy. PBS (saline) or Fgf21 (50ng/g) were administered via the inferior vena cava to wild-type non-pregnant (NP) and pregnant (P) female mice at day 18 of gestation. After 10min administration, the protein levels of total ERK1/2 (Erk) and phosphorylated-ERK1/2 (p-Erk) were analyzed by western blot in Liver, WAT, BAT, and heart. Representative images from western-blot (*left*) and protein quantification (*right*). Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by

one-way ANOVA (* $p < 0.05$ compared to corresponding PBS-treated mice; # $p < 0.05$ compared to corresponding NP mice).

Figure 4. Intracellular Fgf21 signaling during pregnancy. Wild-type mice (*black bars*) and Fgf21^{-/-} mice (*white bars*) at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. mRNA expression levels of Egr1 and cFOS in liver, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), and heart in non-pregnant (NP) and pregnant (P) mice. Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by one-way ANOVA (* $p < 0.05$ compared to corresponding NP mice; # $p < 0.05$ compared to corresponding wt mice).

Figure 5. Pregnancy-induced cardiac hypertrophy does not develop in Fgf21-null mice. Wild-type mice (*black bars*) and Fgf21^{-/-} mice (*white bars*) at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Heart weight (mg) to tibia length (mm) ratio of non-pregnant and pregnant wt and Fgf21^{-/-} mice. (B) H&E staining showing cellular size of left ventricular cardiac tissue (*right*) and quantification of the cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) of cardiac tissue sections (*left*). Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by one-way ANOVA (* $p < 0.05$ compared to corresponding NP mice; # $p < 0.05$ compared to corresponding wt mice).

Figure 6. Fatty acid and glucose metabolism markers during pregnancy in the heart. Wild-type mice (*black bars*) and Fgf21^{-/-} mice (*white bars*) at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Relative mRNA expression levels of the genes MCAD and Pdk4 as markers of fatty acid oxidation, and Mcpt1b and Cd36 as markers of fatty acid transport. (B) Analysis of the fatty acid oxidation rate *in vivo* in the hearts expressed in dpm per mg of protein. (C) Relative mRNA expression levels of Glut1 and Glut4 as markers of glucose metabolism.

Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by one-way ANOVA (*p<0.05 compared to corresponding NP mice; #p<0.05 compared to corresponding wt mice).

Figure 7. Schematic representation of the Fgf21 inter- and intra-organ communication during pregnancy. During gestation the liver and the heart produce large amounts of Fgf21 which lead to higher levels of circulating Fgf21 in a PPAR α -dependent manner. The endocrine actions of this Fgf21 released by the liver, together with autocrine Fgf21 originating in heart itself may act in cardiac tissue inducing fatty acid oxidation which in turn leads to the development of physiologic hypertrophy.

Supplemental Figure 1. Expression levels of pathologic cardiac hypertrophy markers and Masson's Trichrome Staining. Wild-type mice (*black bars*) and Fgf21^{-/-} mice (*white bars*) at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Relative mRNA expression levels of α -SKA, ANF, and β/α -MHC as markers of pathological cardiac hypertrophy. (B) Expression levels of the fibrotic marker Mmp9 (*Top*). Representative Masson's Trichrome Staining for detection of fibrotic areas in the left ventricular (LV) cardiac tissue (*Bottom*). Results are presented as mean \pm SEM (n= 5-6 mice/group). Groups were compared by one-way ANOVA (*p<0.05 compared to corresponding NP mice).

Figure 1

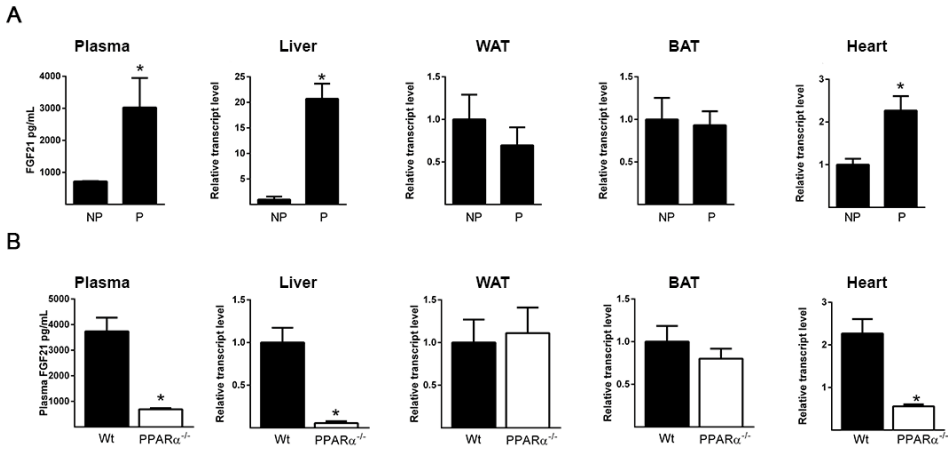


Figure 2

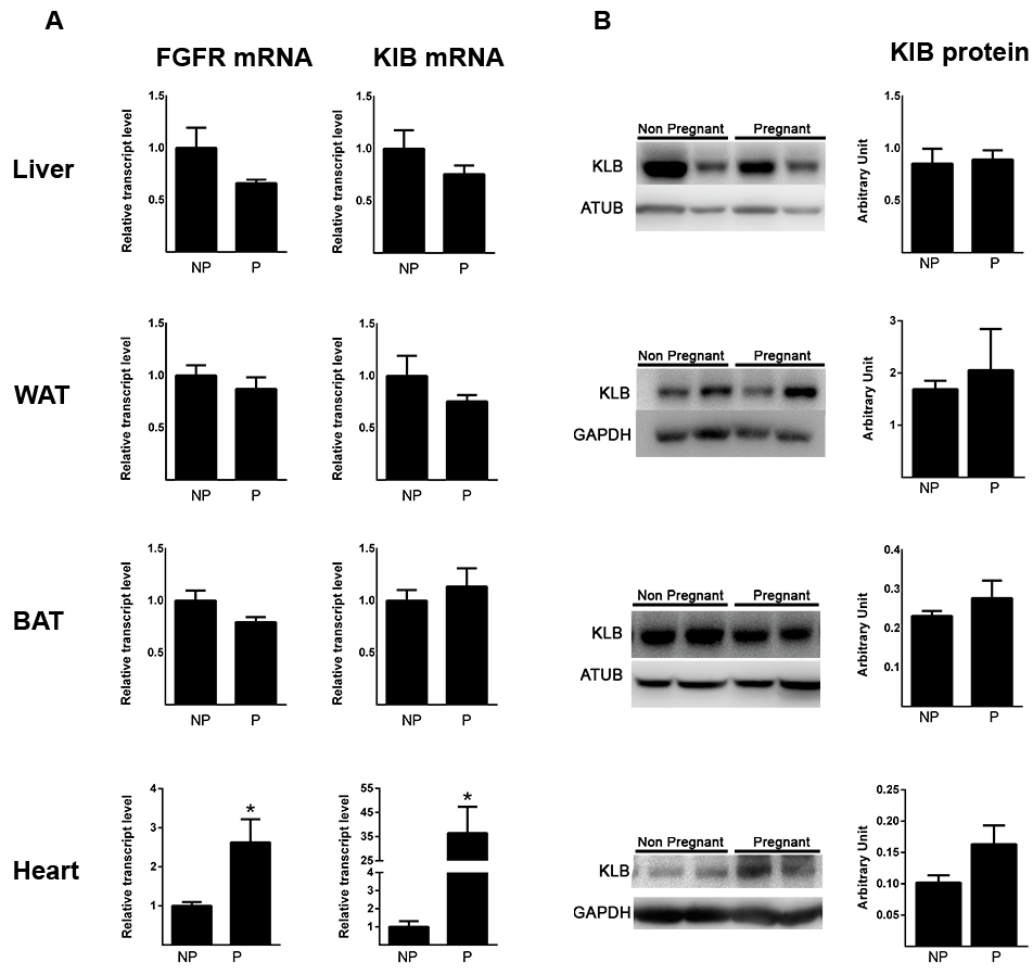


Figure 3

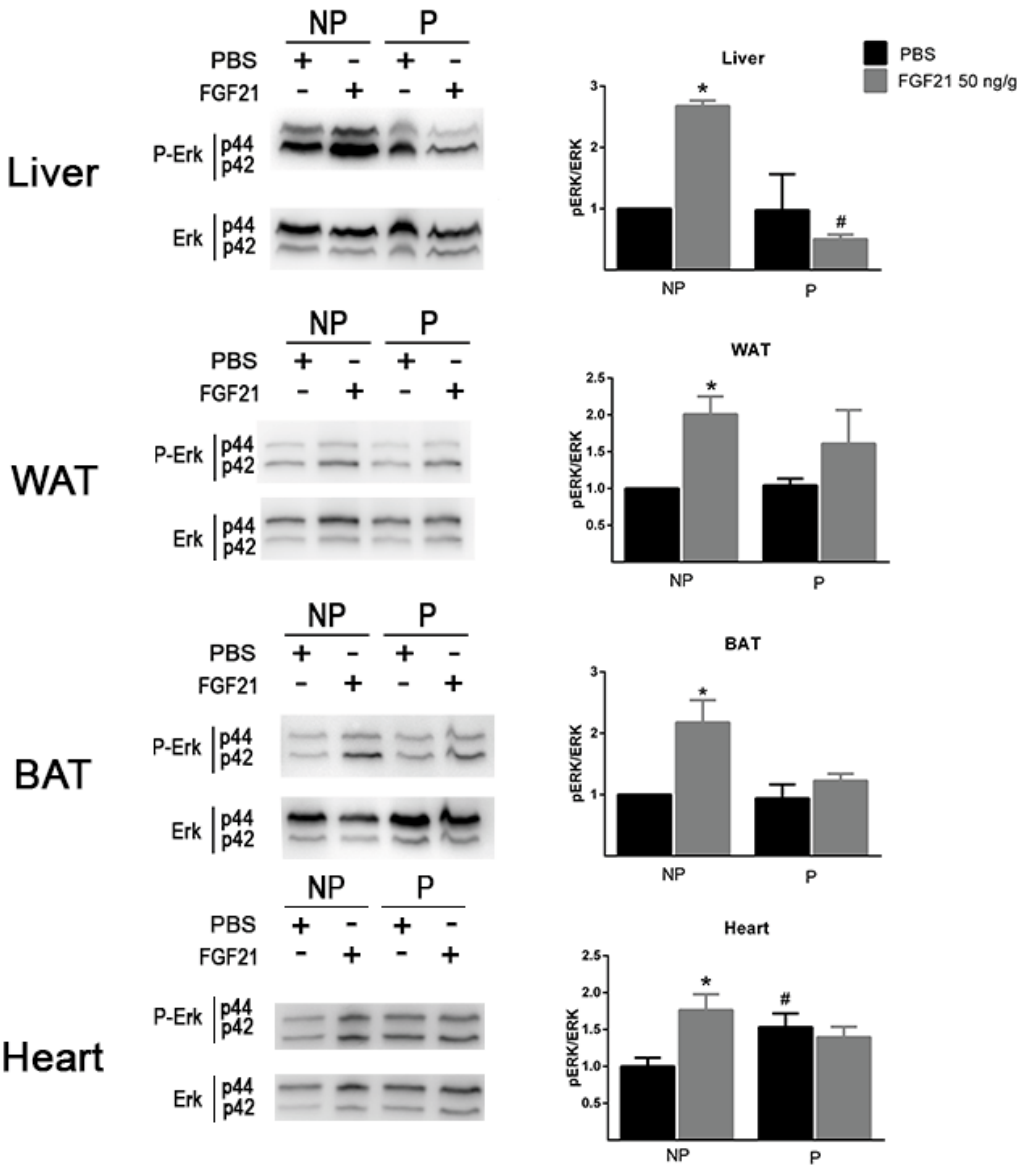


Figure 4

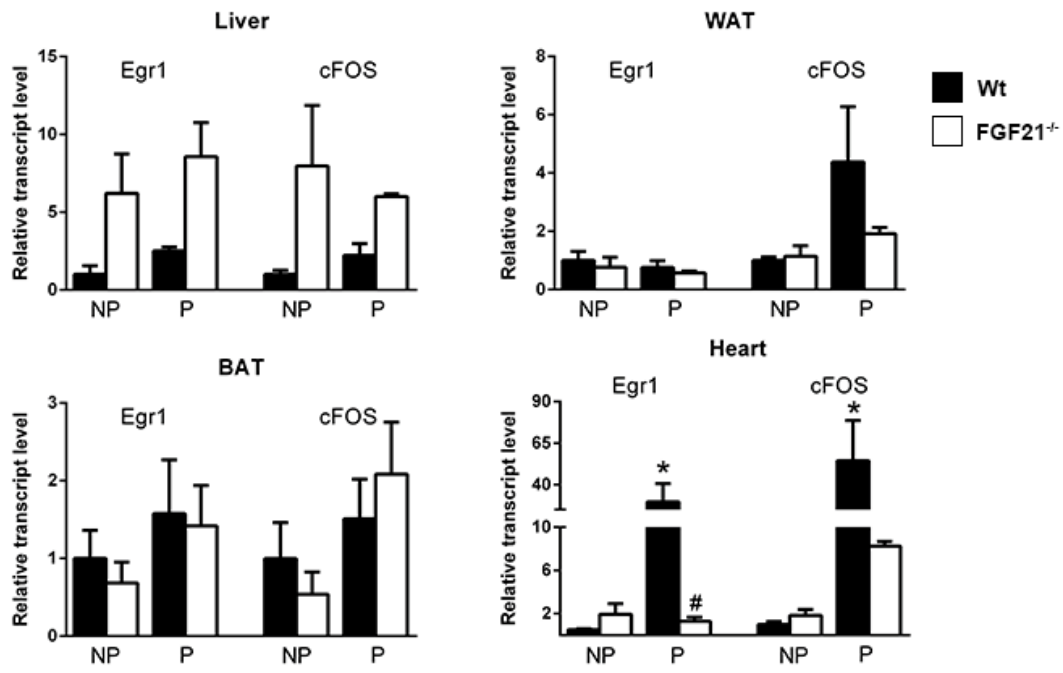


Figure 5

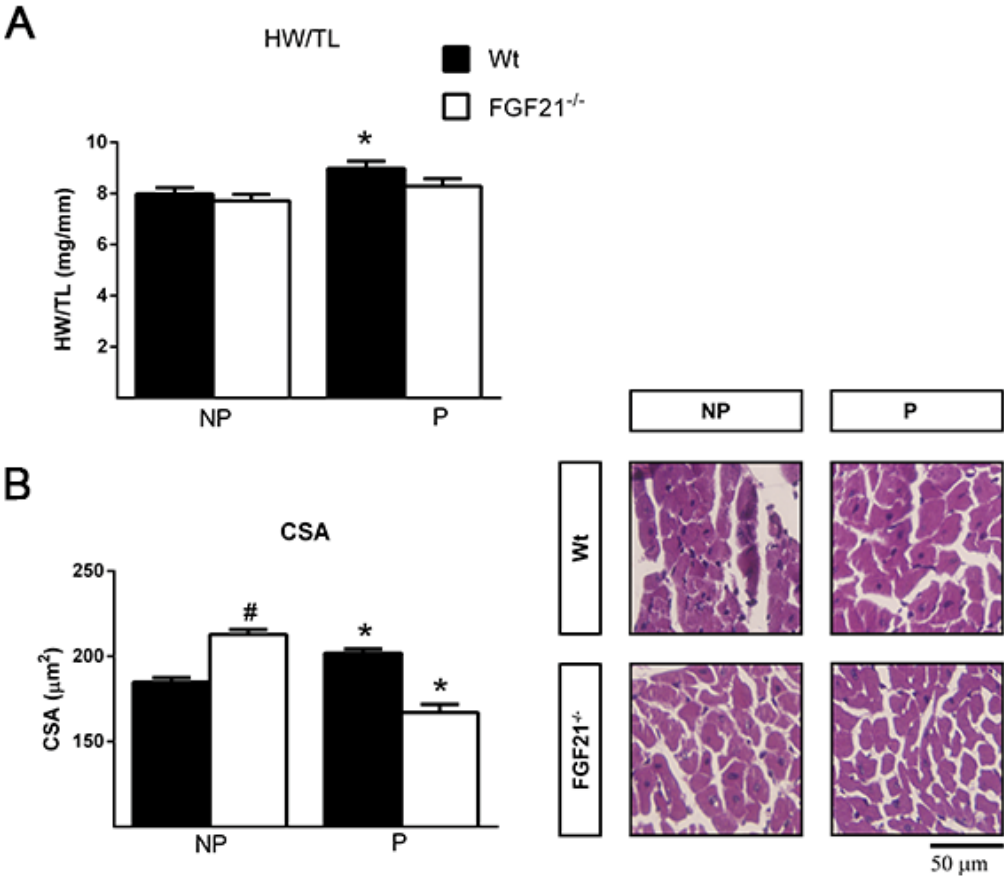


Figure 6

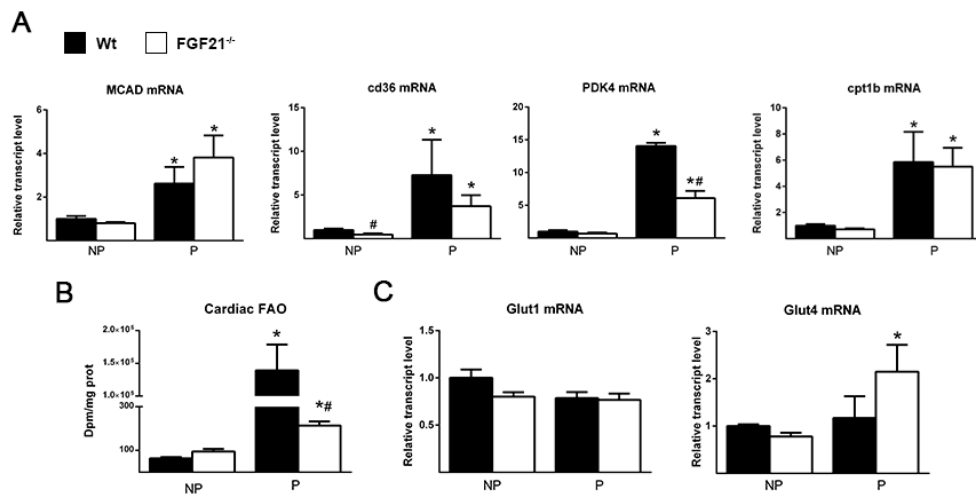


Figure 7

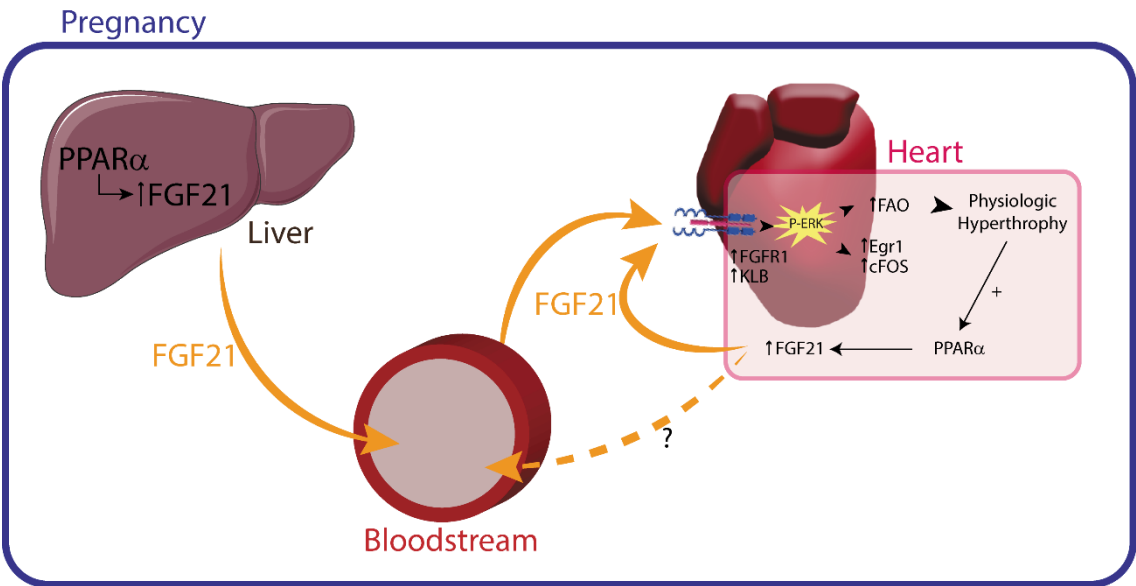


Figure S1

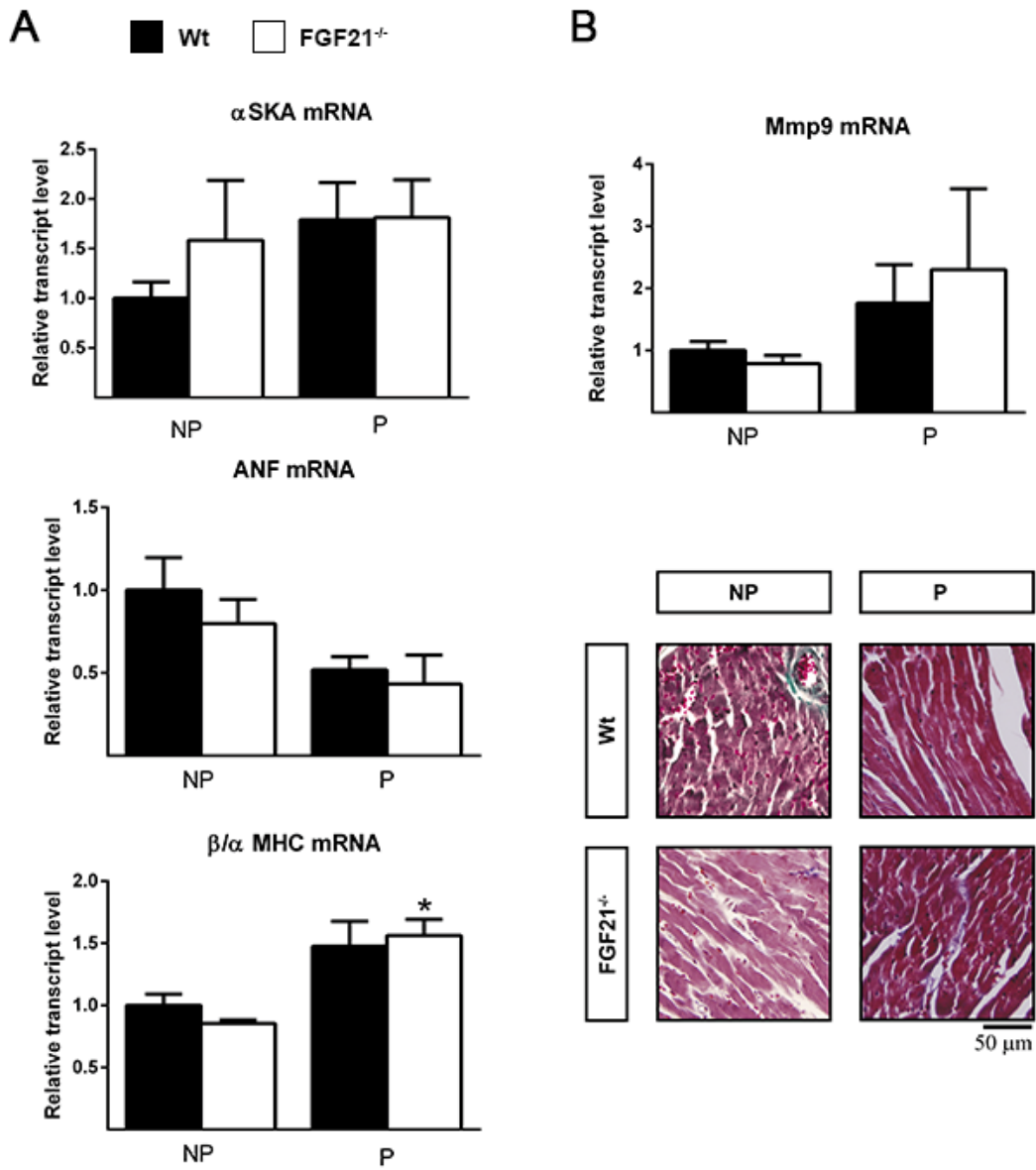


Table 1

Table 1.	Non-Pregnant		Pregnant	
	Wt	Fgf21 ^{-/-}	Wt	Fgf21 ^{-/-}
Body Weight (g)	26±1	25±1,8	45±1,9 *	46±1,6 *
Pup Weight (g)	—	—	1.12±0.02	1.07±0.04
Litter Size (fetus/litter)	—	—	7.125±0,45	8.3±1.97
Glucose (mg/dL)	126±11	130±1,2	130±5,4	122±8,8
TG (mg/dL)	179±26	147±8,3	215±23	225±30 *
NEFAs (pg/mL)	0,93±0,23	1,4±0,09	1,1±0,25	1,4±0,23
KB (pg/mL)	226±76	291±91	236±71	272±90
Insulin (pg/mL)	812,8±165,1	1063±217,8	1240±418,3	1450±351,4
IL-6 (pg/mL)	15±2,8	47±16	11±2	28±11
PAI1 (ng/mL)	0,68±0,18	1,26±0,14 ^{&}	8,90±1,59*	7,10±1,43*
Leptin (ng/mL)	4,13±0,72	2,51±0,97	11,33±2,50*	10,85±0,32*
Resistin (ng/mL)	3,115±0,42	2,67±0,37	2,81±0,30	2,31±0,445

* p<0.05 versus respective NP control. & p<0.05 versus respective Wt control.

C/EBP β is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy

Publicación: International Journal of Cardiology

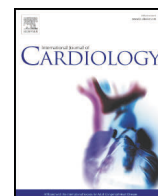
PMID: 26476039

Título: **C/EBP β se requiere para la hipertrofia cardiaca gestacional**

Objetivo: La gestación es un modelo adaptativo y reversible que conlleva el agrandamiento del corazón. Los mecanismos moleculares que determinan este tipo de hipertrofia cardiaca fisiológica no son muy conocidos. En este trabajo analizamos el papel del factor de transcripción C/EBP β en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por la gestación.

Resultados: Se usaron ratones C/EBP β ^{+/-} a día 18 de gestación como modelo haploinsuficiente de gestación en la fase terminal. Encontramos que la expresión de C/EBP β se encontraba aumentada específicamente en los corazones de las hembras Wt preñadas, sin embargo, la expresión de otras isoformas C/EBP (α y δ) no estaba afectada por la gestación. Los cambios que la gestación promueve en el metabolismo y en el perfil hormonal sistémico no fueron diferentes entre Wt y C/EBP β ^{+/-}. Los ratones C/EBP β ^{+/-} desarrollaron hipertrofia cardiaca gestacional pero no de la misma magnitud que los ratones Wt. Es más, los corazones de los ratones C/EBP β ^{+/-} presentaban alteraciones en los genes de oxidación de ácidos grasos y una reducción en los niveles de expresión de transportadores de glucosa, lo que podría comprometer el metabolismo cardiaco durante la gestación. Entre los marcadores de inflamación analizados, la interleucina 6 (IL-6) presentaba un comportamiento marcadamente diferente en los ratones C/EBP β ^{+/-} preñados: La gestación induce fuertemente la expresión cardiaca de IL-6 en ratones Wt, hecho que no se observa en ratones C/EBP β ^{+/-}. Además, los genes marcadores de los macrófagos M2 estaban disminuidos tanto en los corazones de ratones preñados C/EBP β ^{+/-} como en los corazones de ratones C/EBP β ^{-/-} tratados con LPS.

Conclusión: Mediante este trabajo demostramos que se necesitan niveles normales de C/EBP β para que se desarrolle la hipertrofia cardiaca durante la gestación. La inducción de la IL-6 en los corazones de ratones gestantes se ve afectada en los animales C/EBP β ^{+/-}. Además, C/EBP β controla la expresión de genes marcadores de los macrófagos M2 en el corazón. Es por esto que C/EBP β parece ser un factor de transcripción necesario para la respuesta cardiaca hipertrófica durante la gestación.



C/EBP β is required in pregnancy-induced cardiac hypertrophy



I. Redondo-Angulo^a, A. Mas-Stachurska^b, M. Sitges^b, M. Giralt^a, F. Villarroya^a, A. Planavila^{a,*}

^a Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), 08028 Barcelona, Spain

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2015

Received in revised form 1 September 2015

Accepted 3 October 2015

Available online 09 October 2015

Keywords:

Pregnancy

Cardiac hypertrophy

C/EBP β

Macrophages

ABSTRACT

Aim: Pregnancy is a physiological model of adaptive and reversible heart enlargement, but the molecular mechanisms determining this kind of physiologic cardiac hypertrophy are poorly known. Here, we analyzed the role of the transcription factor C/EBP β in the development of pregnancy-induced cardiac hypertrophy.

Results: C/EBP β ^{+/-} mice at day 18 of gestation were used as haploinsufficiency model of late pregnancy. We found that C/EBP β expression was specifically increased in hearts from Wt pregnant mice whereas expression of other C/EBP subtypes (α and δ) was not affected by gestation. Pregnancy-induced changes in systemic metabolic and hormonal profiles were not essentially different in Wt versus C/EBP β ^{+/-} mice. However, C/EBP β ^{+/-} mice developed pregnancy-induced heart hypertrophy to a lower extent relative to Wt mice. Furthermore, hearts from C/EBP β ^{+/-} mice have alterations in fatty acid oxidation genes and reductions in the expression levels of glucose transporters that may compromise metabolic cardiac function during pregnancy. Among marker genes of inflammation, interleukin-6 (IL-6) showed a marked differential behavior in C/EBP β ^{+/-} pregnant mice: pregnancy strongly induced cardiac IL-6 expression in wt, a phenomenon that did not occur in C/EBP β ^{+/-} mice. Moreover, marker genes for M2 macrophages were decreased in C/EBP β ^{+/-} pregnant mice and in C/EBP β ^{-/-} mice subjected to LPS stimulus.

Conclusions: Here we found that normal levels of C/EBP β are required for hypertrophy development during pregnancy. Events such as the increase in IL-6 in the heart of pregnant mice are prevented in C/EBP β ^{+/-} animals. Moreover, C/EBP β controls M2-macrophage gene expression in the heart. Thus, C/EBP β appears as a transcription factor required for cardiac hypertrophy response to gestation.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiac hypertrophy is an adaptative response of the heart to situations of increased pressure and/or volume load. There are two types of cardiac hypertrophy: pathological (e.g. due to hypertension) and physiological (e.g. exercise, pregnancy). The earliest stages of both types of cardiac hypertrophy are very similar at morphologic level; however, pathologic hypertrophy leads ultimately to heart failure development whereas physiological hypertrophy does not [1–3].

During pregnancy, the heart enlarges to compensate for the increased cardiac output. This increase in volume overload induces eccentric hypertrophy characterized by chamber enlargement and a proportional change in wall thickness [4]. This kind of cardiac hypertrophy is reversible and occurs without morbid effects on cardiac function [5].

Numerous reports have described the transcriptional pathways involved in pathological hypertrophy [6–10], but relatively little is known about the molecular mechanisms controlling pregnancy-induced physiological hypertrophy. Understanding the molecular mechanisms controlling specifically physiological hypertrophy may have important implications for the treatment of cardiac disease.

Recently, the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- β has been reported to be involved in exercise-induced cardiac hypertrophy [11] as well as in heart development [12]. C/EBP β is a member of the seven basic leucine zipper families of transcription factors playing a pivotal role in the regulation of energy metabolism, cell proliferation and differentiation. C/EBP β also plays a role in the inflammatory processes [13–15]. At least three isoforms are known for C/EBP β : 38-KDa Full (Lap), 35-KDa Lap* and 21-KDa Lip [16,17]. C/EBP β is induced during heart embryonic development and also after myocardial infarction and after ischemia/reperfusion injury, mediating the activation of inflammatory responses [12]. By contrast, in exercise-induced cardiac hypertrophy C/EBP β is reduced and represses cardiomyocyte growth in the adult heart [11]. The involvement of C/EBP β during pregnancy-induced cardiac hypertrophy is not known.

* 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).

During the late phase of pregnancy, insulin resistance eventually develops as well as a systemic and adipose tissue moderate inflammation [18,19]. C/EBP β has been involved in the control of pro-inflammatory pathways, especially in the transcriptional control of interleukin-6 (IL-6) [13] and more recently has been associated to the control of M2 macrophage-specific gene expression in the skeletal muscle promoting tissue injury repair [20]. M2 macrophages have an anti-inflammatory, pro-angiogenic and tissue remodeling phenotype coinciding with late-phases of tissue injury and are present in the heart [21], but its role during pregnancy-induced cardiac hypertrophy has not been previously explored.

The aim of the study is to elucidate the role of C/EBP β in pregnancy-induced cardiac hypertrophy and its involvement in the pro/anti-inflammatory pathways in the heart.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wild-type and C/EBP β ^{+/-} female mice [22] on a C57BL/6-129SvEv background were mated overnight with genotype-matched male mice. The male was removed from the cage the next morning. Female mice were closely observed to confirm pregnancy by weight increase and abdominal bulging. When pregnant, the night after being mated was considered d0. At day 18 (d18) pregnant mice (P) were sacrificed. Age-matched non-pregnant female mice (NP) served as control mice (n = 5–6 animals per group).

Aged-matched wild-type and C/EBP β ^{+/-} male mice were intraperitoneally (i.p.) injected with either PBS or 5 mg/kg of LPS, 24 h prior to sacrifice and tissue collection.

Mice were sacrificed by cervical dislocation (n = 5–6 animals per group).

All experiments were performed according to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona (DAAM8050).

2.2. Echocardiography in pregnant mice

Four month-old wild-type and C/EBP β ^{+/-} pregnant and non-pregnant mice were anesthetized with 1.5% isoflurane. Cardiac dimensions were assessed by echocardiography with a commercially available system (Vivid Q, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) instrumented with a 12-MHz linear probe. Ventricular dimensions were measured using M-mode scans across the left ventricle at day 18 of pregnancy. Three different cardiac cycles were measured for each assessment, and average values were obtained. Analyses of echocardiographic images were performed by two different observers in a blinded manner.

2.3. Analysis of plasma metabolites and hormone levels

Glucose and triglycerides levels were measured using the Accutrend Technology system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Leptin, insulin, IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were quantified in 20 μ l of plasma using a multiplex system (MADPK-71K, Linco Research/Millipore, Saint Charles, MO, USA) and a Luminex 100ISv2 equipment.

2.4. Heart histology

The heart was extracted and cut at mid-height transversely. One half was preserved in 4% formaldehyde for fixation and was later embedded in paraffin and sectioned. Sections were deparaffinized and subsequently stained with H&E to determine cardiomyocyte size. Using ImageJ software individual cardiomyocyte contours were selected and cellular surface measured. To determine presence of fibrosis Masson's Trichrome Staining (Panreac, Barcelona) was performed.

2.5. Immunohistochemistry

Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded heart sections were incubated with a primary antibody against F4/80 (Abcam, Cambridge, MA, USA). An Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rat IgG was used as the secondary antibody. Fluorescent micrographs were acquired with the aid of fluorescent microscopy (Olympus BX61).

2.6. Gene expression

Total RNA from left-ventricular tissue was isolated with TriPure (Roche, Indianapolis, IN, USA). RNA from the liver, brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) was extracted with the aid of NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, Germany). RT was performed, using random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 0.5 μ g RNA in a total reaction volume of 20 μ l. Taqman Gene Expression Assays were used, and each 20 μ l of reaction mixture contained 1 μ l cDNA, 10 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM probes and 900 nM primers from Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix or Assays-by-Design Gene

Expression Assay Mix (Applied Biosystems). The mRNA level of the gene of interest in each sample was normalized to that of the reference control using the comparative (2^{- Δ CT}) method following the manufacturer's instructions. In the heart Cyclophilin A, Ppia was used as the reference gene whereas 18S rRNA was the reference gene for the liver, BAT and WAT.

2.7. Protein extraction and Western-blot

Total protein was extracted homogenizing the tissue in a 10% Igepal buffer. The concentration of protein was measured with a Bradford assay. To perform the western blot analysis, 30 μ g of protein were loaded in a 12% acrylamide gel. After transfer, antibodies against C/EBP β , PGC1 α (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) were used to blot the protein. GAPDH was used as a loading control.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism v.5. To discard outliers, Grubb's Test was performed and when any was found, those values were excluded in further analyses. Data was analyzed by unpaired t-test (n = 5–6 mice per group). When variances between groups were significantly different, those groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. All graphical displays are shown as means \pm SEM.

3. Results

3.1. Pregnancy-induced cardiac hypertrophy is associated with induction of C/EBP β in the heart

In order to assess the role of C/EBP β in pregnancy induced cardiac hypertrophy, we analyzed the expression levels of C/EBP β in the heart, liver, white and brown adipose tissues (WAT and BAT) in non-pregnant and late pregnant mice (day 18) (Fig. 1A). We found that C/EBP β transcript levels were significantly induced (2.3-fold, p = 0.011) in the heart of pregnant mice. However, the mRNA levels of C/EBP β were not changed in liver and WAT and were even lower in the BAT of pregnant mice (-75%, p = 0.004). Given that the up-regulation of C/EBP β is specific of cardiac tissue, we next analyzed the relative expression levels of the other members of the C/EBP family present in the heart C/EBP α and C/EBP δ . We observed that the transcript levels of C/EBP α and C/EBP δ were unaltered in the hearts of pregnant mice compared with non-pregnant mice. Finally, we determined the protein levels of C/EBP β in these hearts (Fig. 1B). We observed that the protein levels of all three isoforms of C/EBP β (Lap, Lap* and Lip) were increased in pregnant mice. Quantification of all bands confirmed the increase (1.4-fold, p = 0.002) in C/EBP β protein levels in pregnant mice. In summary, C/EBP β is specifically induced in the heart during late pregnancy at both mRNA and protein levels in conditions in which the heart is known to develop physiological cardiac hypertrophy.

3.2. Partial loss of C/EBP β impairs the cardiac hypertrophy response during late pregnancy

The specific induction of C/EBP β during late pregnancy in the heart suggests that this transcription factor may be important for the development of pregnancy induced-cardiac hypertrophy. Given that complete ablation of C/EBP β (C/EBP β ^{-/-}) leads to infertility in female mice [23], we studied late pregnancy-induced cardiac hypertrophy in the mouse model of C/EBP β haploinsufficiency (C/EBP β ^{+/-}). Expression levels of C/EBP β in mouse heart were reduced by approximately one half in C/EBP β ^{+/-} mice (data not shown) in agreement with previous reports [11]. We analyzed the potential impact of the lack of C/EBP β on cardiac morphology at 18 days of gestation in Wt and C/EBP β ^{+/-} mice (Fig. 2 and Table 1). We found that the heart weight/tibia length (HW/TL) ratio, a measure of cardiac enlargement, was significantly increased (1.5-fold, p = 0.0004) in Wt pregnant mice compared with corresponding control non-pregnant mice. By contrast, the HW/TL ratio was mildly induced (1.3-fold, p = 0.016) in C/EBP β ^{+/-} pregnant mice versus controls, and in fact, HW/TL ratio was 25% reduced (p = 0.009) in C/EBP β ^{+/-} pregnant mice compared

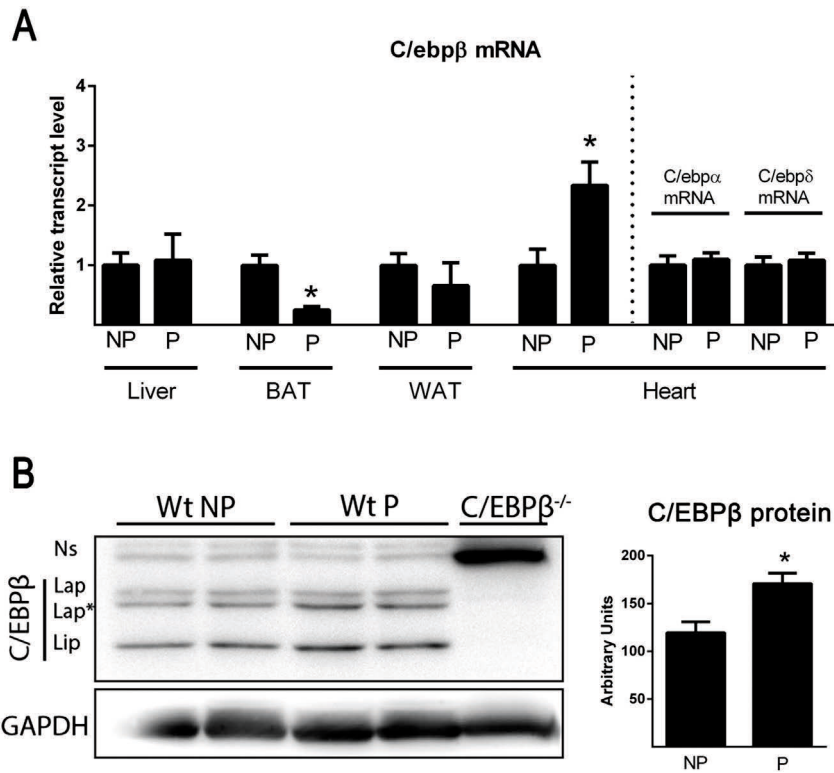


Fig. 1. Pregnancy induces C/EBP β expression in the heart. mRNA and protein expression levels of wild-type non-pregnant (NP) and pregnant (P) female mice at day 18 of gestation. (A) C/EBP β mRNA expression levels in the liver, brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue (WAT) and heart of non-pregnant and pregnant mice. (B) Western blot analysis showing the protein expression levels of the 3 isoforms of C/EBP β . Results are shown as means \pm SEMs ($n = 5$ –6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (* $p < 0.05$ compared to corresponding NP control).

with corresponding Wt pregnant mice (Fig. 2A, right). A histological examination of cardiac cross-sections confirmed heart enlargement in Wt mice, but not in C/EBP $\beta^{+/-}$ mice, after 18-day gestation (Fig. 2A, left). Echocardiographic measurements showed no significant differences between Wt and C/EBP $\beta^{+/-}$ non-pregnant mice (Table 1). Pregnancy significantly increased end-diastolic interventricular septum thickness and posterior wall thickness in both Wt ($p = 0.0137$ and $p = 0.0093$, respectively) and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice ($p < 0.0001$ and $p = 0.004$, respectively). However, both end-diastolic and end-systolic LV internal diameters were significantly increased in Wt pregnant mice ($p = 0.0009$ and $p = 0.0068$, respectively) but not in C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice. Furthermore, the end-diastolic and end-systolic volumes and the left ventricular mass were significantly higher during pregnancy in the Wt mice ($p = 0.0005$, $p = 0.0042$ and $p < 0.0001$, respectively). However, the end-diastolic volume and the left ventricular mass were significantly reduced in C/EBP $\beta^{+/-}$ mice ($p = 0.0036$ and $p = 0.0268$, respectively) compared to the Wt pregnant mice. Finally, the sphericity index was significantly reduced in Wt pregnant mice ($p = 0.0018$) but not in C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice ($p = 0.0039$) indicating some degree of eccentric hypertrophy/dilatation in Wt mice which is lost in the C/EBP $\beta^{+/-}$ mice. No differences were observed in the ejection fraction or fractional shortening in any of the groups.

Next, we analyzed the cross-sectional area of the cardiomyocytes in these hearts (Fig. 2B). We found that the cardiomyocyte area was significantly higher ($p = 0.046$) in Wt pregnant mice compared to non-pregnant Wt mice. By contrast, in C/EBP $\beta^{+/-}$ mice there was the opposite, the cardiomyocyte area was 10% reduced ($p = 0.029$) after 18-day pregnancy compared with corresponding controls and was significantly different from Wt pregnant mice ($p < 0.0001$).

In summary, these results indicate that 18-day pregnant mice develop cardiac hypertrophy characterized by cardiac enlargement/dilatation and increased cardiomyocyte area in Wt mice. However, C/EBP β

haploinsufficiency impairs the development of this physiological cardiac hypertrophy associated with pregnancy.

3.3. Effects of C/EBP β on pathological markers of cardiac hypertrophy and fibrosis

It has been shown that gestational changes associated to cardiac hypertrophy development do not induce pathologic markers of cardiac hypertrophy such as atrial natriuretic factor (Anf), α -actinin (α -Ska) or the β/α -Myosin heavy chain (Mhc) ratio [4]. Effectively, we found that the Anf, α -Ska, and β/α -Mhc mRNA expression levels were not significantly altered in the hearts of Wt and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice either in non-pregnant or pregnant mice (Fig. 3A). Collectively, these results further confirm the non-pathological role of the cardiac hypertrophy development in the pregnancy model either in Wt or in C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice.

Fibrosis develops in the heart in pathologic conditions and is often a hallmark of pathologic cardiac hypertrophy development. Pregnancy induced-physiologic cardiac hypertrophy occurs without fibrosis development [24]. We analyzed the presence of fibrosis in the hearts of Wt and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice. Using Masson's Trichrome staining, no signs of fibrosis were found in pregnant Wt mice, as expected. However, this histological staining clearly showed a substantial increase in fibrosis in C/EBP $\beta^{+/-}$ mice (Fig. 3B, top). In fact, quantification of the percentage of the left ventricle fibrotic area (Fig. 3B, bottom) showed a significant increase on fibrosis in C/EBP $\beta^{+/-}$ not pregnant (3.8-fold, $p = 0.035$) and pregnant (2.2-fold, $p = 0.012$) mice compared to Wt mice. Furthermore, the percentage of fibrosis was 50% reduced after pregnancy in C/EBP $\beta^{+/-}$ mice ($p = 0.025$).

Collectively, it is concluded that the partial lack of C/EBP β impairs the physiologic induction of cardiac hypertrophy and sensitizes mice to cardiac derangements such as fibrosis.

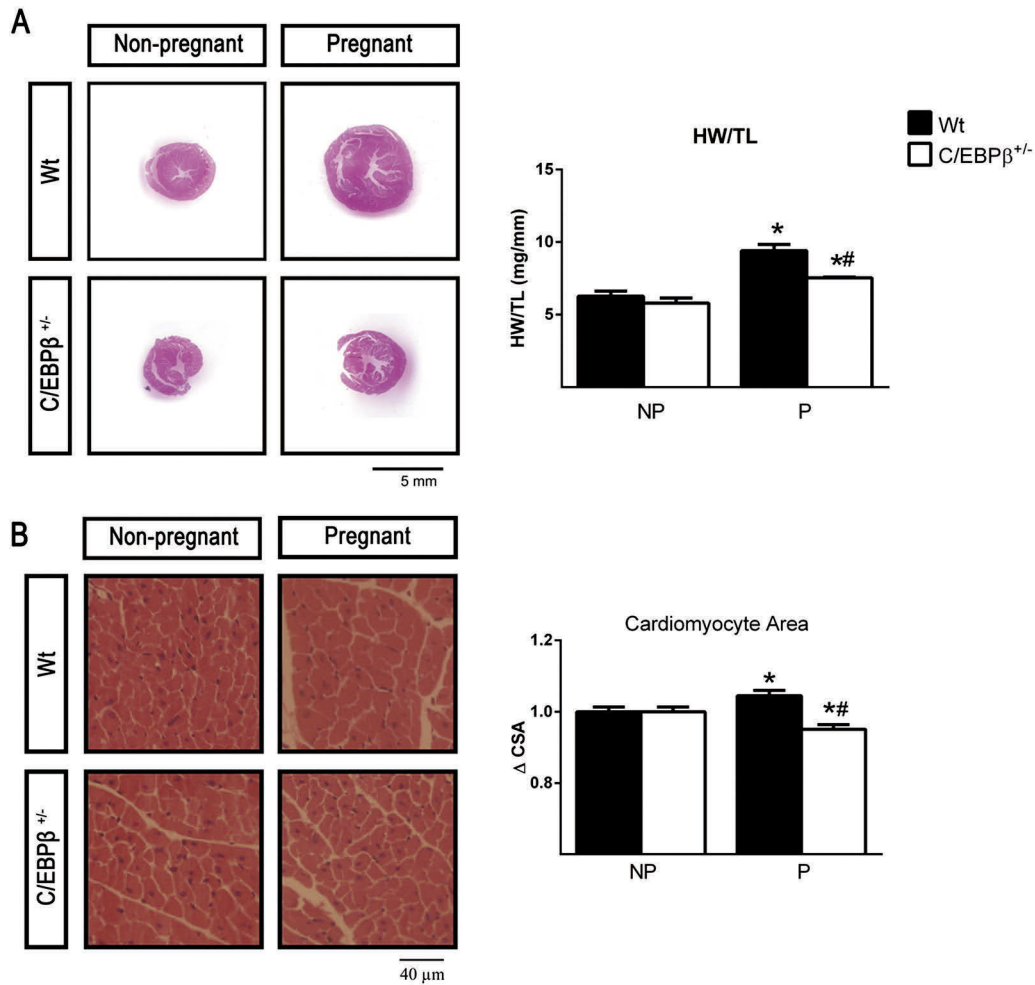


Fig. 2. Pregnancy-induced cardiac hypertrophy is prevented with the partial loss of C/EBP β . Wild-type (wt) and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Representative cross section at mid-heart of non-pregnant (NP) and pregnant (P) wild-type (Wt) and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice hearts stained with H&E. Heart weight (mg) to tibia length (mm) ratio of non-pregnant and pregnant wild-type (black bars) and C/EBP $\beta^{+/-}$ (white bars). (B) Higher magnification of H&E staining showing cellular size of left ventricular cardiac tissue (left). Cardiomyocyte cross-sectional area (Δ CSA) change defined as the difference between cardiomyocyte area of each animal versus cardiomyocyte area from corresponding non-pregnant mice (right). Results are shown as means \pm SEMs (n = 5–6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (* p < 0.05 compared to corresponding NP control; # p < 0.05 compared to respective Wt group).

Table 1

Echocardiography data from non-pregnant and pregnant wild-type and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice.

	Non-pregnant		Pregnant	
	Wt	C/EBP $\beta^{+/-}$	Wt	C/EBP $\beta^{+/-}$
LVIDd (mm)	3.57 \pm 0.123	3.59 \pm 0.052	4.10 \pm 0.026*	3.88 \pm 0.041
LVIDs (mm)	2.50 \pm 0.132	2.54 \pm 0.072	3.01 \pm 0.078*	2.81 \pm 0.048
IVSd (mm)	0.58 \pm 0.008	0.54 \pm 0.004	0.64 \pm 0.016*	0.68 \pm 0.016*
IVSs (mm)	0.86 \pm 0.018	0.78 \pm 0.02	0.93 \pm 0.009	0.91 \pm 0.037*
PWTd (mm)	0.56 \pm 0.02	0.52 \pm 0.006	0.66 \pm 0.02*	0.64 \pm 0.015*
PWTs (mm)	0.75 \pm 0.04	0.7 \pm 0.051	0.85 \pm 0.032	0.73 \pm 0.011
EDV (mm ³)	53.65 \pm 4.297	54.03 \pm 1.916	74.35 \pm 1.149*	65.14 \pm 1.629*#
ESV (mm ³)	22.65 \pm 2.85	23.37 \pm 1.597	35.48 \pm 2.2*	29.98 \pm 1.246
SI	2.25 \pm 0.047	2.24 \pm 0.019	2.06 \pm 0.008*	2.14 \pm 0.014#
EF (%)	64.25 \pm 1.974	62.25 \pm 3.119	60 \pm 3.582	60 \pm 1.08
FS (%)	30 \pm 1.225	29.25 \pm 2.016	27.75 \pm 2.213	27.75 \pm 0.629
LVm (mg)	61.56 \pm 5.125	56.77 \pm 1.85	92.39 \pm 2.137*	85.46 \pm 1.037*#

All measurements are expressed as Mean \pm SEM. Data was analyzed by one-way ANOVA.

*p < 0.05 vs. corresponding non-pregnant mice. #p < 0.05 vs. corresponding Wt mice.

LV, left ventricle; LVIDd, end-diastolic LV internal diameter; LVIDs, end-systolic LV internal diameter; IVSd, end-diastolic internal ventricular septum; IVSs, end-systolic internal ventricular septum; PWTd, end-diastolic posterior wall thickness; PWTs, end-systolic posterior wall thickness; EDV, end-diastolic volume; ESV, end-systolic volume; SI, sphericity index; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; LVm, Left ventricular mass.

3.4. Metabolic consequences of late pregnancy in C/EBP β haploinsufficiency

In view of the cardiac alterations in C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice, we analyzed the metabolic consequences of late pregnancy in Wt and C/EBP $\beta^{+/-}$ mice (Table 2). Body weight was significantly lower in C/EBP $\beta^{+/-}$ non-pregnant mice. However, we found that both Wt and C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice exhibited a similar increase in body weight relative to non-pregnant mice. There were no differences in the litter size or fetus average weight between Wt and C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice, indicating no different gestational performance. As expected, pregnancy induced a significant increase in blood triglycerides (TGs) and a significant decrease in glucose levels, but no differences were observed in pregnant mice according to genotype. However, the insulin levels were only significantly induced in C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice. No significant differences were found in the circulating IL-6, MCP-1 or leptin levels in any of the conditions studied. Finally, PAI-1 levels were significantly higher in Wt pregnant mice as previously described [19,25] and the increase in C/EBP $\beta^{+/-}$ pregnant mice were not significantly different from Wt mice.

Collectively, these results indicate that C/EBP β haploinsufficiency does not determine major alterations in body weight or metabolic profile in late gestation, indicating that possible cardiac differences are

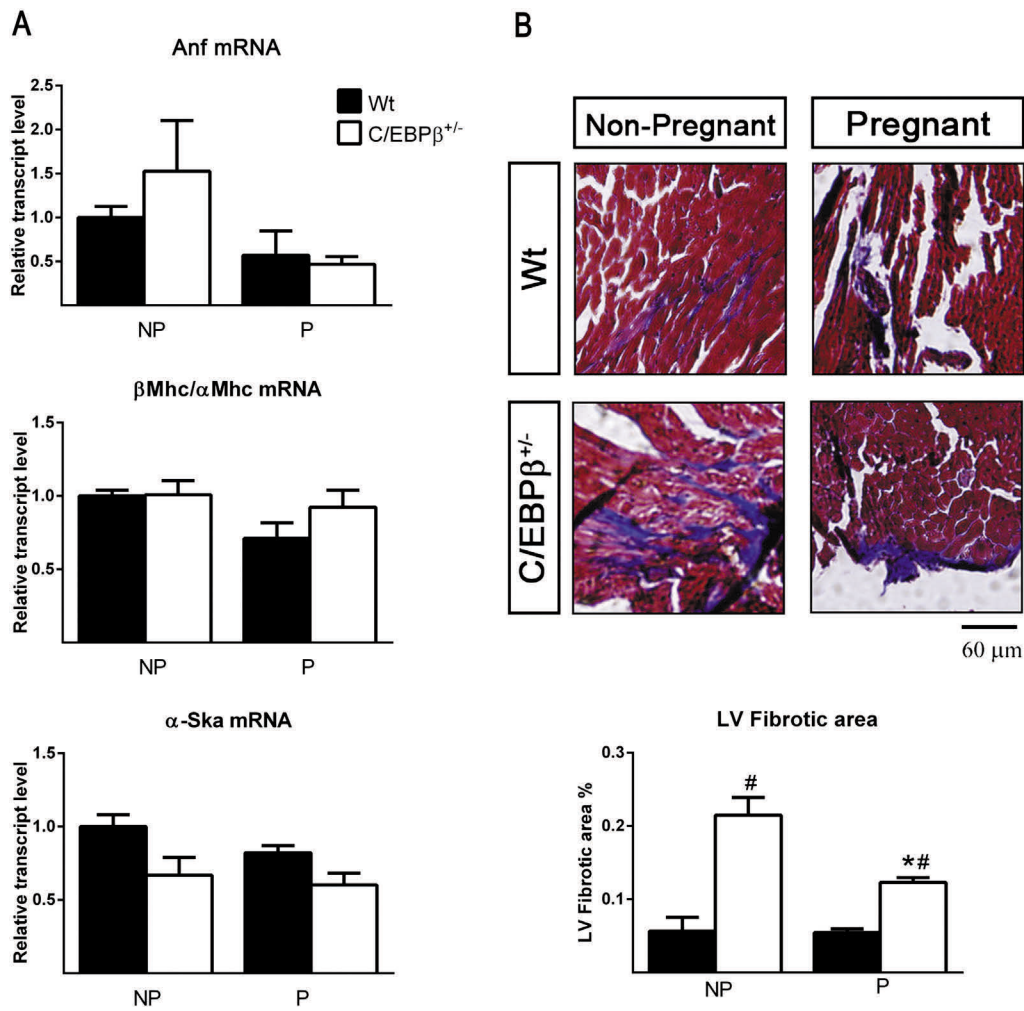


Fig. 3. Expression levels of pathologic cardiac hypertrophy markers and Masson's Trichrome Staining. Wt (black bars) and C/EBPβ^{+/-} (white bars) mice at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Relative mRNA expression levels of Anf, βMhc/αMhc and α-Ska, markers of pathological cardiac hypertrophy. (B) Representative Masson's Trichrome Staining for detection of fibrotic areas in the left ventricular (LV) cardiac tissue (Top). Quantification of left ventricular fibrotic areas shown as positively-stained areas divided by total area of heart-section measured (Bottom). Results are shown as means ± SEMs (n = 5–6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (* p < 0.05 compared to corresponding NP control; # p < 0.05 compared to respective Wt group).

more likely to be the consequence of the intrinsic cardiac C/EBPβ deficiency rather than being secondary to massive systemic alterations.

3.5. Effects of C/EBPβ^{+/-} haploinsufficiency on the expression of metabolic genes in heart

One of the features of pregnancy is an increase in fatty acid oxidation in the heart and a decrease in glucose utilization [26]. To address the

impact of C/EBPβ haploinsufficiency on the control of fatty acid metabolism genes in response to late gestation, we evaluated mRNA expression levels of genes involved in fatty acid oxidation, namely pyruvate dehydrogenase kinase-4 (Pdk4), carnitine palmitoyltransferase (Mcpt1b), and the fatty acid transporter Cd36 (Fig. 4A). We found that pregnancy significantly doubled Pdk4 expression levels in Wt mice (1.9-fold, p = 0.024). By contrast, pregnancy led to no significant changes in the cardiac mRNA expression levels of Mcpt1b and Cd36 in Wt mice. In non-

Table 2

Metabolic response to pregnancy in wild-type and C/EBPβ^{+/-} mice.

	Non-pregnant		Pregnant	
	Wt	C/EBPβ ^{+/-}	Wt	C/EBPβ ^{+/-}
BW (g)	28.65 ± 1.49	23.99 ± 1.02 [#]	42.19 ± 2.38*	39.02 ± 2.13*
Litter size (fetus number/litter)	–	–	8.83 ± 1.42	9.00 ± 0.77
Fetus av. weight (mg)	–	–	1071.00 ± 68.13	960.80 ± 145.30
Glucose (mg/dL)	254.80 ± 21.02	245.80 ± 30.80	104.00 ± 6.45*	106.80 ± 8.05*
Insulin (pg/mL)	681.40 ± 244.60	481.40 ± 58.09	654.50 ± 116.10	1158.00 ± 223.30*
TG (mg/dL)	134.00 ± 8.19	132.60 ± 10.21	322.00 ± 61.23*	294.40 ± 36.21*
IL-6 (pg/mL)	10.24 ± 1.59	16.3 ± 3.43	10.63 ± 1.36	12.33 ± 1.67
MCP-1 (pg/mL)	15.38 ± 2.01	15.2 ± 1.97	19.93 ± 5.45	19.40 ± 2.63
PAI-1 (ng/mL)	1.56 ± 0.08	1.72 ± 0.67	12.05 ± 1.87*	7.32 ± 1.49*
Leptin (ng/mL)	9.76 ± 2.09	6.40 ± 2.96	13.47 ± 3.00	8.43 ± 1.61

BW, body weight; TG, triglycerides. Results are expressed as Mean ± SEM. *p < 0.05 vs. corresponding non-pregnant mice. #p < 0.05 vs. corresponding Wt mice.

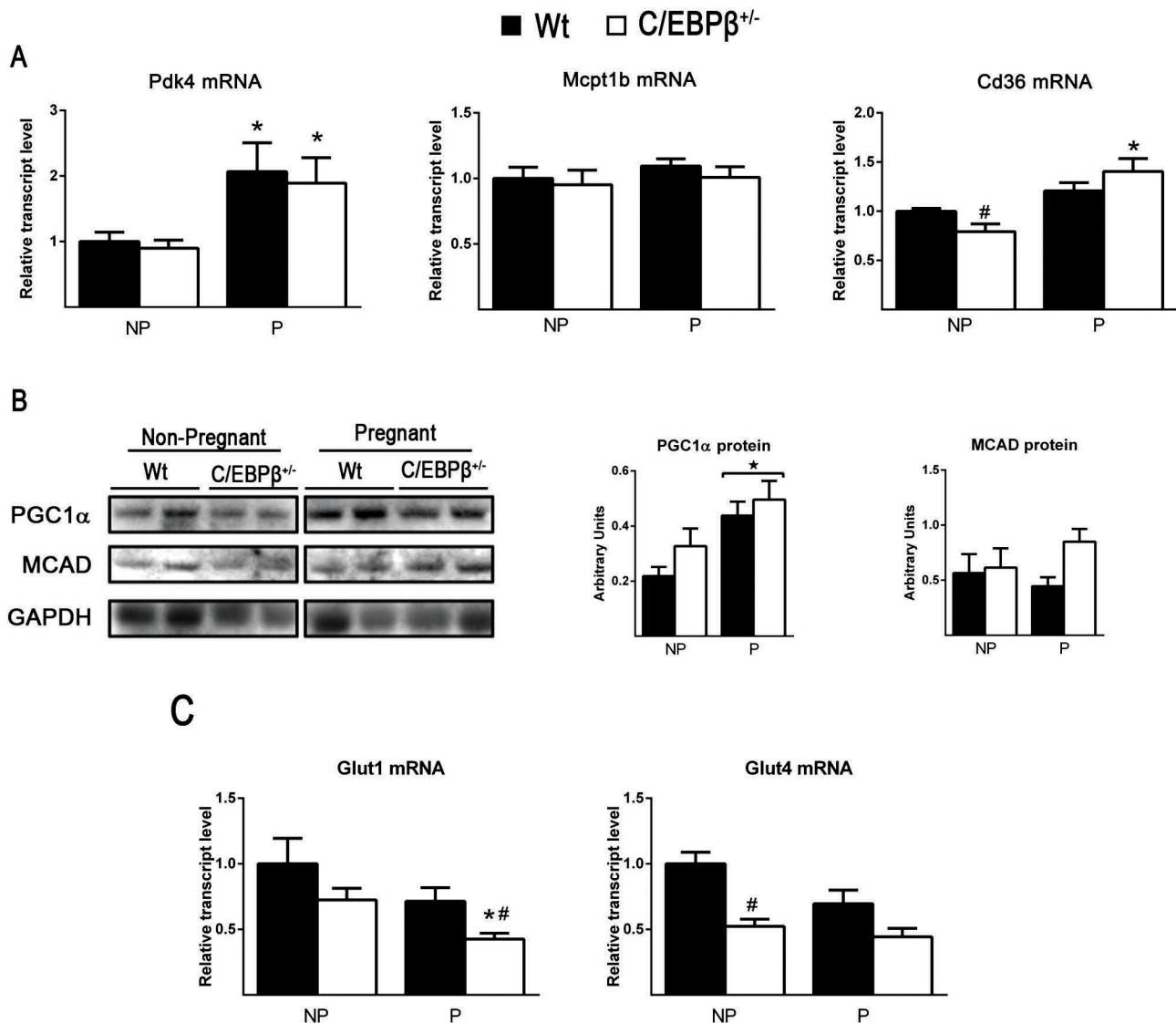


Fig. 4. Expression levels of markers involved in the metabolic remodeling of the heart during pregnancy. Wt (black bars) and C/EBPβ^{+/-} (white bars) mice at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Relative mRNA expression levels of the genes Pdk4 as marker of fatty acid oxidation, and Mcpt1b and Cd36 as markers of fatty acid transport. (B) Western blot analysis showing the protein levels of MCAD and PGC1α. Quantification of protein levels was corrected by GAPDH. (C) Relative mRNA expression levels of Glut1 and Glut4 as markers of glucose metabolism. Results are shown as means ± SEMs (n = 5–6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (* p < 0.05 compared to corresponding NP control; # p < 0.05 compared to respective Wt group).

pregnant mice the cardiac expression levels of Cd36 were significantly lower (11%, p = 0.037) in C/EBPβ^{+/-} mice. Notably, the fatty acid transporter Cd36 was significantly up-regulated in C/EBPβ^{+/-} pregnant mice relative to C/EBPβ^{+/-} controls (1.8-fold, p = 0.004). Finally, Pdk4 expression levels were significantly induced in hearts from C/EBPβ^{+/-} pregnant mice (1.7-fold, p = 0.045) but to a similar extent than in Wt pregnant mice. Furthermore, we analyzed the cardiac protein levels of the MCAD and PGC1α by western-blot (Fig. 4B). We observed that the protein levels of MCAD were not increased and the protein levels of PGC1α were significantly induced in Wt pregnant mice (2-fold, p = 0.022). In C/EBPβ^{+/-} mice the protein levels of MCAD did not change whereas the protein levels of PGC1α were significantly induced after pregnancy (1.6-fold, p = 0.008).

Next, we analyzed the expression levels of the glucose transporters, Glut1 and Glut4 (Fig. 4C). Pregnancy tended to decrease Glut1 and Glut4 mRNA expression levels in Wt mice although the changes do not reach statistical significance. However, both the insulin-dependent glucose transporter Glut4 and the constitutive glucose transporter Glut1 were down-regulated in C/EBPβ^{+/-} mice, being this decrease statistically significant for Glut1 in pregnant mice (−42%, p = 0.017) and for

Glut4 in not pregnant mice (−31%, p = 0.049). These events suggest a reduction in glucose uptake in the hearts of C/EBPβ^{+/-} mice.

Collectively these data indicate that despite the expression levels of fatty acid and glucose metabolism genes are slightly affected by pregnancy in Wt mice, hearts from C/EBPβ^{+/-} mice have reductions in the expression levels of glucose transporters that may compromise metabolic cardiac function during pregnancy.

3.6. C/EBPβ haploinsufficiency alters the expression of cardiac genes involved in the inflammatory pathways during late pregnancy

It has been reported that pregnancy induces a low grade level inflammation in the white adipose tissue of the maternal organism relevant for the development of pregnancy-associated insulin resistance [18]. In order to determine whether this situation is also occurring in the heart, first we studied cardiac pro-inflammatory pathways by analyzing expression of the pro-inflammatory marker genes Il-6, tumor necrosis factor α (Tnfα) and Mcp1 (Fig. 5A). Il-6 expression levels were strongly induced (2.9-fold, p = 0.011) in pregnant hearts from Wt mice, whereas this increase was completely blunted in C/EBPβ^{+/-} pregnant

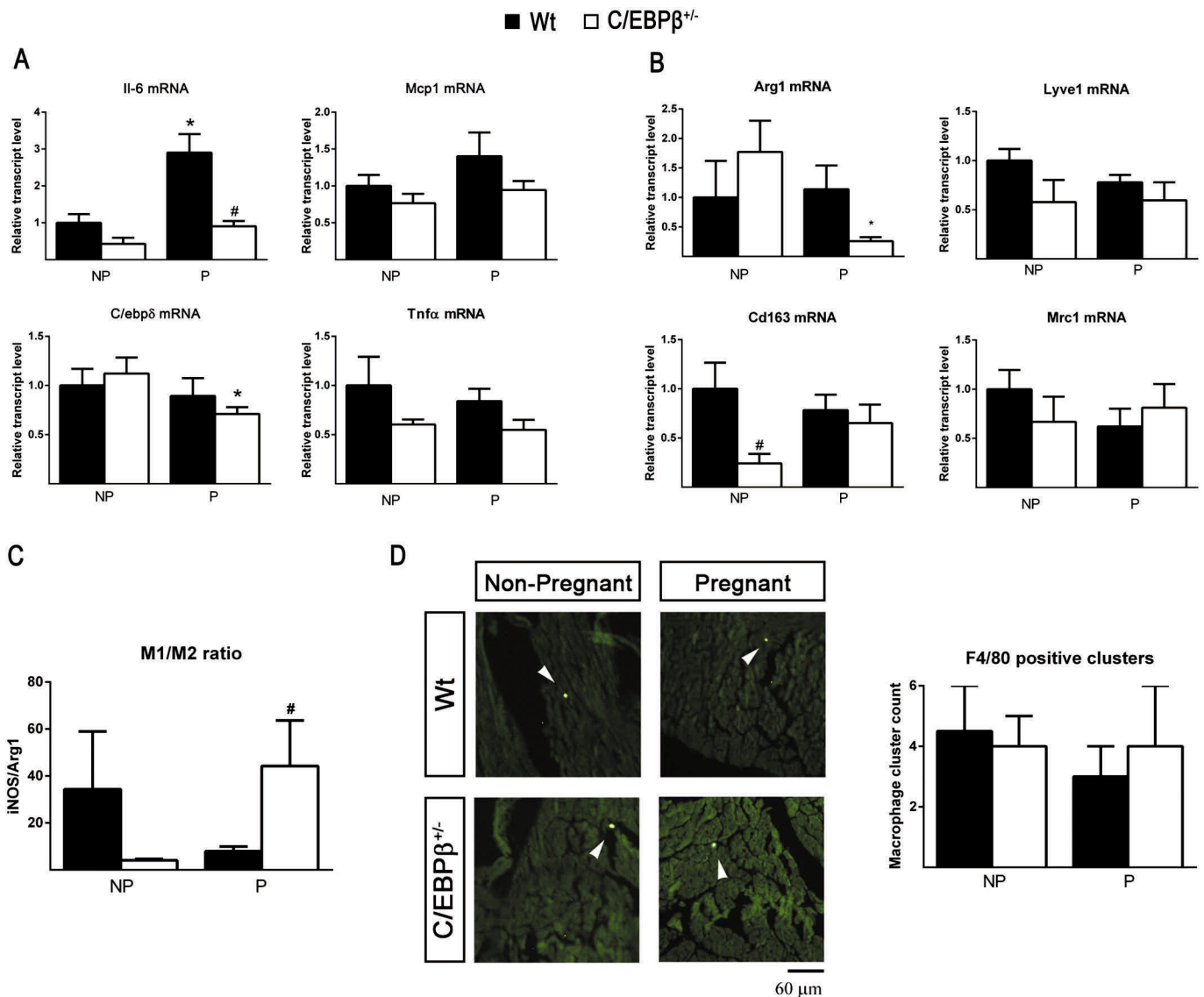


Fig. 5. Expression levels of markers involved in the inflammatory response and M2 macrophage activation process in the heart during pregnancy. Wt (black bars) and C/EBPβ^{+/-} (white bars) mice at day 18 of gestation were used as a model of late pregnancy. (A) Relative expression levels of pro-inflammatory genes Il-6, Mcp1, and Tnfα, and C/ebpδ. (B) mRNA expression levels of anti-inflammatory genes Arg1, Lyve1, Cd163 and Mrc1. (C) M1/M2 macrophage activation ratio defined as the ratio between the expression levels of the M1 macrophage marker iNos related to the M2 macrophage marker Arg1. (D) Heart immunofluorescence microscopy using a specific anti-F4/80 antibody. Right: Representative images showing positively stained macrophage clusters (arrow). Left: Quantification of positively stained macrophage cluster count expressed as counted positive clusters per heart. Results display means ± SEMs (n = 5–6 mice/group). Groups were compared by independent t-tests (* p < 0.05 compared to corresponding NP control; # p < 0.05 compared to respective Wt group).

mice ($p = 0.004$). Mcp1 expression levels followed a similar trend, but changes did not reach statistical significance. Tnfα expression levels were unaltered in any of the conditions. C/EBPδ expression levels, which have been reported to compensate for the loss of C/EBPβ in some experimental settings [27,28] were decreased in pregnant C/EBPβ^{+/-} hearts (-37% , $p = 0.048$). The implication of these findings is that pregnancy activates a physiological very low-grade inflammation in the heart in Wt mice, but not in C/EBPβ^{+/-} mice. Next we studied the expression levels of markers for M2 macrophages such as Arginase-1 (Arg1), Lyve1, Mrc1 and Cd163 (Fig. 5B). No differences were observed in hearts from Wt pregnant mice compared with non-pregnant mice. However, we found that expression levels of Arg1 were significantly down-regulated in C/EBPβ^{+/-} pregnant mice (-80% , $p = 0.024$) and transcript levels for Cd163 were down-regulated in non-pregnant C/EBPβ^{+/-} mice (-76% , $p = 0.046$). Next, we analyzed the M1/M2 macrophage activation ratio defined as the ratio between the expression levels of the M1 macrophage marker iNos related to the M2 macrophage marker Arg1 and we found that M1/M2 ratio was significantly

increased in the C/EBPβ^{+/-} pregnant mice (4.5-fold, $p = 0.016$) compared to Wt pregnant mice (Fig. 5C). Finally, we performed immunostaining of total macrophages (F4/80 positive cells) in the hearts (Fig. 5D). We found no significant differences in the number of F4/80 positive clusters in cardiac samples.

In summary, these data indicate that during pregnancy the heart induces an inflammatory response which is lost in C/EBPβ^{+/-} mice and is independent of an increase in macrophage infiltration. Moreover, partial lack of C/EBPβ during pregnancy further blocks the anti-inflammatory response of the M2 macrophages leading to a shift in the M1/M2 ratio.

3.7. C/EBPβ involvement in LPS-induced pro-inflammatory pathways in the heart

In order to further assess the involvement of C/EBPβ in the control of the inflammatory pathways in the heart, we induced a pro-inflammatory pathologic response (LPS injection) to the C/EBPβ-null

mice. As expected, LPS injection induced the expression of pro-inflammatory markers such as *Il-6*, *Mcp1* and *Tnfa* (4.1-fold, $p = 0.014$) in Wt mice (Fig. 6A). However, in *C/EBP β ^{-/-}* mice the transcript levels for these genes were further increased after LPS treatment (25-fold, $p = 0.010$; 29-fold, $p = 0.001$; 8-fold, $p = 0.0002$; respectively). In light of these unexpected results we analyzed the expression levels of *C/EBP δ* in order to determine whether this isoform can compensate for the total lack of *C/EBP β* in the control of pro-inflammatory pathways in the heart, as previously reported in other cell types [27,28]. Indeed, we found that LPS treatment significantly induced *C/EBP δ* expression levels (2.6-fold, $p = 0.005$) in *C/EBP β ^{-/-}* hearts. Next, we determined the transcript levels for the M2 macrophage markers (Fig. 6B). We found that *Arg1* (-60%, $p = 0.019$), *Mrc1* (-90%, $p = 0.004$) and *Cd163* (-60%, $p = 0.026$) were significantly down-regulated in *C/EBP β ^{-/-}* mice treated with LPS compared to LPS-treated Wt mice. Furthermore, *Lyve1* was significantly reduced

(-50%, $p = 0.027$) in *C/EBP β ^{-/-}* mice treated with LPS compared to corresponding CT mice. Analysis of the M1/M2 ratio (Fig. 6C) showed a significant increase in the macrophage ratio in hearts from *C/EBP β ^{-/-}* mice treated with LPS (20-fold, $p = 0.015$) compared to LPS-treated Wt mice. Finally, immunostaining of total macrophages (F4/80 positive cells) in these hearts did not show significant differences in the total number of F4/80 positive clusters (Fig. 6D).

All these data further suggest that *C/EBP β* has an important role especially in the control of the anti-inflammatory M2 macrophage population in the heart.

4. Discussion

Our study shows for the first time that pregnancy-induced cardiac hypertrophy is *C/EBP β* dependent. Thus, partial lack of *C/EBP β* impairs

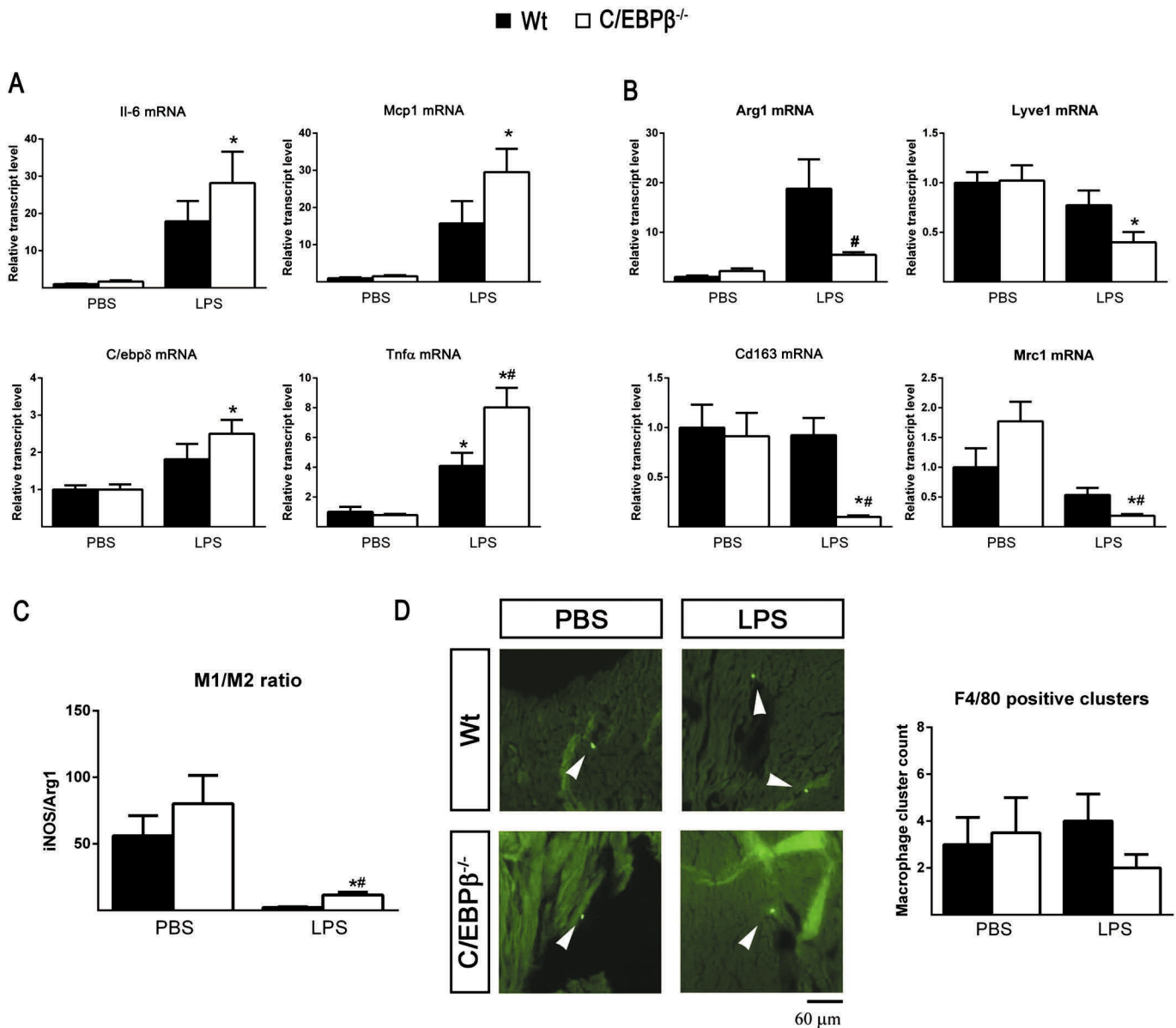


Fig. 6. Expression levels of markers involved in the inflammatory response and M2 macrophage activation process in the heart after LPS treatment. Wild type (black bars) and *C/EBP β ^{-/-}* (white bars) male mice were injected i.p. with either PBS or LPS (5 mg/kg) for 24 hr. (A) Relative expression levels of pro-inflammatory genes *Il-6*, *Mcp-1*, and *Tnfa*, and *C/ebp δ* . (B) mRNA expression levels of anti-inflammatory genes *Arg1*, *Lyve1*, *Cd163* and *Mrc1*. (C) M1/M2 macrophage activation ratio defined as the ratio between the expression levels of the M1 macrophage marker *iNOS* related to the M2 macrophage marker *Arg1*. (D) Heart immunofluorescence microscopy using a specific anti-F4/80 antibody. Right: Representative images showing positively stained macrophage clusters (arrow). Left: Quantification of positively stained macrophage cluster count expressed as counted positive clusters per heart. Results display means \pm SEMs ($n = 5-6$ mice/group). Groups were compared by independent t-tests (* $p < 0.05$ compared to corresponding PBS group; # $p < 0.05$ compared to respective Wt group).

the correct development of cardiac hypertrophy and leads to fibrosis during pregnancy. Moreover, we show that C/EBP β controls the M2 anti-inflammatory signals in the heart that may be involved in the cardiac hypertrophy development associated to pregnancy.

Pregnancy-related cardiac hypertrophy is a normal physiological compensatory response that enables the heart to enhance its pumping capacity in response to increased demand [4]. Therefore, the lack of a cardiac hypertrophic response when C/EBP β levels are abnormally low may not be viewed as a protective effect of C/EBP β haploinsufficiency, since the development of cardiac hypertrophy during pregnancy is a necessary homeostatic adaptive mechanism. Moreover, C/EBP β haploinsufficiency caused fibrosis in the heart, a pathologic sign that is usually associated to heart failure development [6]. The fact that pregnancy reduced fibrosis in C/EBP β ^{+/-} mice is consistent with previous papers describing the beneficial effects of pregnancy on fibrosis after ischemia/reperfusion in the heart [29,30].

The effects of low C/EBP β levels on heart appear to be highly specific, since the systemic metabolic and hormonal profile of pregnant C/EBP β ^{+/-} mice was essentially unaltered. Only insulin levels were significantly increased in C/EBP β ^{+/-} pregnant mice reflecting a slight degree of insulin resistance, a scenario consistent with the reduced expression of glucose transporters in heart. This data are in accordance with reports describing increased levels of insulin production by the pancreas in C/EBP β ^{-/-} mice [31].

During pregnancy a low-grade inflammatory response is induced in adipose tissue [18,19] in association with normal gestational development. Here, we show that this inflammatory response develops also in cardiac tissue, associated with cardiac hypertrophy, and involves C/EBP β -dependent control. In accordance with our data, C/EBP β has been previously shown to be induced during heart development and injury, promoting an inflammatory response in the heart necessary in these situations [12]. By contrast, in exercise-induced cardiac hypertrophy, C/EBP β expression is reduced [11]. This apparent contradiction may be explained by the lack of inflammatory responses in the heart during exercise-induced cardiac hypertrophy [32], in contrast with our findings in pregnancy-induced cardiac hypertrophy. The involvement of C/EBP β in regulating inflammatory processes has been described for the adipose tissue [33]. Moreover, recent studies have shown that C/EBP β knockdown protects cardiomyocytes from pathologic hypertrophy via inhibition of the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B, therefore involving C/EBP β in the control of the pro-inflammatory pathways in the heart [34,35]. Therefore, we propose that C/EBP β is required in situations such as pregnancy-induced cardiac hypertrophy, embryonic cardiac development or injury (e.g., myocardial infarction, I/R or pathologic hypertrophy) in which the inflammatory response is necessary for the correct heart function in contrast to non-inflammatory hypertrophy situations (e.g., exercise-induced cardiac hypertrophy).

This study showed that the pregnant mice model displayed a specific increase in the IL-6 expression levels, suggesting that cardiac inflammatory changes occur in late pregnancy, as previously reported for other tissues [19]. However, C/EBP β haploinsufficiency reduces this IL-6 induction. The absence of changes in the number of infiltrating macrophages indicates that the sources of pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF α and MCP1 are the cardiomyocytes, as previously reported [7,36,37], and not the macrophages. Moreover, the expression levels of Arginase1, one of the main markers for M2-macrophages and regulated at transcriptional level by C/EBP β [38], were significantly decreased in C/EBP β ^{+/-} pregnant mice, indicating that M2 macrophage population during pregnancy is reduced. In fact, the absence of cardiomyocyte cell growth in pregnant C/EBP β ^{+/-} mice might be explained by this impaired expression of M2-specific genes since macrophage M2 polarization has been proposed to play important roles in tissue repair promoting fiber formation and growth in skeletal muscle [39]. Furthermore, this muscle fiber regeneration has been associated with a transition to an anti-inflammatory macrophage phenotype [40]. Finally, the

fact that the number of infiltrating macrophages in the hearts were unchanged and the M1/M2 ratio was increased, suggest that there is a preferential shift of the macrophage phenotype from M2 to M1 in the hearts of C/EBP β ^{+/-} mice that may contribute to the lack of cardiac hypertrophy as a repairing process associated to pregnancy. Furthermore, one of the clues of the beneficial effects of C/EBP β during gestational hypertrophy, which might differ from pathological forms of cardiac hypertrophy, may be its action on the anti-inflammatory macrophages.

In summary, current results provide novel insight into the role of C/EBP β in the myocardium, and establish for the first time that C/EBP β is an essential component of the molecular machinery by which physiological cardiac hypertrophy is induced during pregnancy. These findings contribute to understanding the molecular mechanisms underlying the mechanistic differences between pathologic and physiologic cardiac hypertrophy, a subject with important clinical implications in the management of cardiac disease.

Conflict of interest

The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

Acknowledgments

We thank V. Poli and J. Saura for kindly providing the C/EBP β ^{+/-} mice and A. Peró and I. Navarro for technical support. This work was supported by Grants SAF2014-55702-JIN and SAF2014-55725 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Generalitat de Catalunya (2014SGR-141), European Community's Seventh Framework Program (FP7 BetaBat, HEALTH-F2-2011-277713) and Fundación BBVA. IR-A was supported by a pre-doctoral fellowship from Gobierno Vasco (Programa de Formación de investigadores del DEUI) and Institut de Biomedicina de la UB.

References

- H. Akazawa, I. Komuro, Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy, *Circ. Res.* 92 (2003) 1079–1088.
- M.C. Schaub, M.A. Hefti, B.A. Harder, H.M. Eppenberger, Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes, *J. Mol. Med. (Berl.)* 75 (1997) 901–920.
- A. Planavila, R.R. Calvo, M. Vazquez-Carrera, Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of fatty acid oxidation in cardiac hypertrophy, *Mini Rev. Med. Chem.* 6 (2006) 357–363.
- M. Eghbali, R. Deva, A. Alioua, et al., Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy, *Circ. Res.* 96 (2005) 1208–1216.
- C.M. Schannwell, T. Zimmermann, M. Schneppenheim, G. Plehn, R. Marx, B.E. Strauer, Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women, *Cardiology* 97 (2002) 73–78.
- N. Frey, E.N. Olson, Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 45–79.
- A. Planavila, R. Iglesias, M. Giral, F. Villarroya, Sirt1 acts in association with PPAR[alpha] to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation, *Cardiovasc. Res.* 90 (2011) 276–284.
- A. Planavila, E. Dominguez, M. Navarro, et al., Dilated cardiomyopathy and mitochondrial dysfunction in Sirt1-deficient mice: a role for Sirt1–Mef2 in adult heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53 (2012) 521–531.
- A. Planavila, I. Redondo, E. Hondares, et al., Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2019.
- A. Planavila, I. Redondo-Angulo, F. Ribas, et al., Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress, *Cardiovasc. Res.* 106 (2015) 19–31.
- P. Bostrom, M. Mann, J. Wu, et al., C/EBPbeta controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling, *Cell* 143 (2010) 1072–1083.
- G.N. Huang, J.E. Thatcher, J. McAnally, et al., C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury, *Science* 338 (2012) 1599–1603.
- F.G. Bannach, A. Gutierrez-Fernandez, R.J. Parmer, L.A. Miles, Interleukin-6-induced plasminogen gene expression in murine hepatocytes is mediated by transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta), *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 2205–2212.
- N. Di-Poi, B. Desvergne, L. Michalik, W. Wahli, Transcriptional repression of peroxi-some proliferator-activated receptor beta/delta in murine keratinocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38700–38710.

- [15] M. Straccia, N. Gresa-Arribas, G. Dentesano, et al., Pro-inflammatory gene expression and neurotoxic effects of activated microglia are attenuated by absence of CCAAT/enhancer binding protein beta, *J. Neuroinflammation* 8 (2011) 156.
- [16] V. Ossipow, P. Descombes, U. Schibler, CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 8219–8223.
- [17] D.P. Ramji, P. Foka, CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem. J.* 365 (2002) 561–575.
- [18] Sevillano J. de CJ, J. Marciniak, et al., Implication of low level inflammation in the insulin resistance of adipose tissue at late pregnancy, *Endocrinology* 152 (2011) 4094–4105.
- [19] L. Zhang, T. Sugiyama, N. Murabayashi, et al., The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice, *J. Mol. Endocrinol.* 47 (2011) 157–165.
- [20] D. Ruffell, F. Mourkioti, A. Gambardella, et al., A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 17475–17480.
- [21] A.R. Pinto, R. Paolicelli, E. Salimova, et al., An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile, *PLoS ONE* 7 (2012), e36814.
- [22] I. Screpanti, L. Romani, P. Musiani, et al., Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice, *EMBO J.* 14 (1995) 1932–1941.
- [23] E. Sterneck, L. Tessarollo, P.F. Johnson, An essential role for C/EBPbeta in female reproduction, *Genes Dev.* 11 (1997) 2153–2162.
- [24] B.C. Bernardo, K.L. Weeks, L. Pretorius, J.R. McMullen, Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies, *Pharmacol. Ther.* 128 (2010) 191–227.
- [25] F. Cerneca, G. Ricci, R. Simeone, M. Malisano, S. Alberico, S. Guaschino, Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 73 (1997) 31–36.
- [26] L.X. Liu, Z. Arany, Maternal cardiac metabolism in pregnancy, *Cardiovasc. Res.* 101 (2014) 545–553.
- [27] H.M. Hu, M. Baer, S.C. Williams, P.F. Johnson, R.C. Schwartz, Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1, *J. Immunol.* 160 (1998) 2334–2342.
- [28] T. Valente, M. Straccia, N. Gresa-Arribas, et al., CCAAT/enhancer binding protein delta regulates glial proinflammatory gene expression, *Neurobiol. Aging* 34 (2013) 2110–2124.
- [29] J. Xiao, J. Li, T. Xu, et al., Pregnancy-induced physiological hypertrophy protects against cardiac ischemia-reperfusion injury, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (2014) 229–235.
- [30] R. Genead, H. Fischer, A. Hussain, et al., Ischemia-reperfusion injury and pregnancy initiate time-dependent and robust signs of up-regulation of cardiac progenitor cells, *PLoS ONE* 7 (2012), e36804.
- [31] T. Matsuda, Y. Kido, S. Asahara, et al., Ablation of C/EBPbeta alleviates ER stress and pancreatic beta cell failure through the GRP78 chaperone in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 115–126.
- [32] A.J. Serra, M.H. Santos, D.S. Bocalini, et al., Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity, *J. Physiol.* 588 (2010) 2431–2442.
- [33] S.M. Rahman, R.C. Janssen, M. Choudhury, et al., CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) expression regulates dietary-induced inflammation in macrophages and adipose tissue in mice, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 34349–34360.
- [34] J. Zou, H. Li, X. Chen, et al., C/EBPbeta knockdown protects cardiomyocytes from hypertrophy via inhibition of p65-NFkappaB, *Mol. Cell. Endocrinol.* 390 (2014) 18–25.
- [35] J. Zou, X. Gan, H. Zhou, et al., Alpha-lipoic acid attenuates cardiac hypertrophy via inhibition of C/EBPbeta activation, *Mol. Cell. Endocrinol.* 399 (2015) 321–329.
- [36] A. Planavila, R. Rodriguez-Calvo, M. Jove, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.* 65 (2005) 832–841.
- [37] P.J. Smeets, B.E. Teunissen, A. Planavila, et al., Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPARalpha and PPARdelta, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29109–29118.
- [38] M.J. Gray, M. Poljakovic, D. Kepka-Lenhart, S.M. Morris Jr., Induction of arginase 1 transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta, *Gene* 353 (2005) 98–106.
- [39] L. Arnold, A. Henry, F. Poron, et al., Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 1057–1069.
- [40] R. Kapadia, K. Tureyen, K.K. Bowen, H. Kalluri, P.F. Johnson, R. Vemuganti, Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia, *J. Neurochem.* 98 (2006) 1718–1731.



Resumen de resultados y discusión global

El fibroblast growth factor 21 protege frente a la hipertrofia cardiaca en ratones.

Desde que FGF21 se identificó hace ya 15 años (Nishimura, Nakatake, Konishi, & Itoh, 2000), se ha descubierto que este factor actúa como un regulador metabólico que controla la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad a insulina y la cetogénesis (Badman et al., 2007; Gälman et al., 2008). El hígado es el órgano productor de FGF21 más importante, donde bajo el control de PPAR α se produce este factor y se secreta a la sangre (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). Además de la hepática, la expresión de FGF21 también ocurre en los tejidos adiposos blanco y marrón y en el músculo esquelético (Hondares et al., 2011; Izumiya et al., 2008; Muise et al., 2008; Ribas, Villarroya, Hondares, Giralt, & Villarroya, 2014). Las acciones endocrinas de FGF21 que se han descrito incluyen el aumento de la captación de glucosa en adipocitos blancos mediante la inducción de GLUT1 (Kharitononkov et al., 2005), la activación de la función termogénica del tejido adiposo marrón (Hondares et al., 2010) y la promoción del *browning* o la aparición de adipocitos marrones en los depósitos de grasa blanca (Fisher et al., 2012). Además de estos efectos endocrinos, también muestra señalización autocrina/paracrina ya que induce cetogénesis hepática (Badman et al., 2007). Para que estas acciones de FGF21 puedan ocurrir, las células diana han de expresar receptores de FGF, principalmente FGFR1 y FGFR4 (en los tejidos adiposos e hígado respectivamente), y β -Klotho, un cofactor necesario para que la señalización tenga lugar (Kharitononkov et al., 2008; Kurosu et al., 2007).

Por el contrario, en el momento en el que la presente tesis doctoral comenzó, el corazón no se consideraba una diana ni un tejido productor de FGF21. El motivo por el que hasta esa fecha el corazón no se estudiara dentro de este sistema de FGF21 era la baja expresión del mRNA de FGF21 y del mRNA del co-factor β -klotho, quien realmente otorga especificidad a los tejidos para ser sensibles a FGF21 (Fon Tacer et al., 2010; Ogawa et al., 2007). Como se muestra en la primera publicación que conforma esta tesis, el hecho de que la expresión cardiaca de FGF21 y β -Klotho sea más modesta que en otros tejidos no evita que esta hormona regule la función cardiaca en eventos fisiopatológicos.

Anterior a nuestro estudio, otro trabajo (S. Q. Liu & Wu, 2010; S. Q. Liu et al., 2011) mostraba como FGF21 se sobreexpresaba en el hígado tras provocar un infarto de miocardio en un modelo de ratón. La sobreexpresión de FGF21 hacía que la recuperación cardiaca fuese mejor, lo que dio a entender que el corazón podría responder a este factor. Durante el desarrollo de esta tesis, además de las publicaciones de las que la misma se compone, otro número de trabajos ha dejado patente el importante rol que FGF21 tiene sobre la remodelación cardiaca (Joki et al., 2015; S. Q. Liu et al., 2013; A. Planavila et al., 2015).

A pesar de la creencia generalizada de que el corazón era incapaz de responder a FGF21 nosotros pudimos demostrar que no era así. En comparación con el hígado o el tejido adiposo que son el mayor productor y la mayor diana de FGF21 respectivamente, la expresión de FGFR1 y β -Klotho cardiacos hacen que éste órgano sea sensible a FGF21. Usando el modelo de ratón carente de FGF21 o FGF21^{-/-} demostramos como la infusión de isoproterenol, un compuesto agonista β -adrenérgico que causa hipertrofia cardiaca, provoca un aumento de tamaño cardiaco mayor en estos animales que en los Wt. La hipertrofia más severa que desarrollaban los animales FGF21^{-/-} mostraba signos de mayor dilatación y de mayor disfunción contráctil. No solo eso, la hipertrofia

se veía acompañada de una mayor expresión de genes marcadores patológicos e inflamatorios, la expresión de genes metabólicos, por el contrario, era menor frente a este estímulo, quedando patente de manera funcional en la menor oxidación de ácidos grasos que está asociada a procesos hipertróficos patológicos (Allard, Schönekeess, Henning, English, & Lopaschuk, 1994; Christe & Rodgers, 1994; Dávila-Román et al., 2002)

Las alteraciones por la falta de FGF21 que se observaban en la edad adulta no solo ocurren como una consecuencia patológica del cúmulo de efectos adversos producidos por la desventaja que supone carecer de FGF21 durante la vida del animal. Los ratones neonatos KO para FGF21 ya presentan diferencias basales, como el tamaño hipertrofiado de los cardiomiocitos (CSA), que se acentúa cuando los animales son tratados con isoproterenol. Al igual que los adultos, los neonatos *Fgf21*^{-/-} muestran signos de una hipertrofia cardiaca mayor, un tamaño celular cardiaco más grande y una expresión más elevada de los marcadores patológicos y menor expresión de PGC1 α tras el tratamiento con ISO que los neonatos Wt. El tratamiento conjunto de ISO y FGF21 en los ratones neonatos revierte los efectos adversos que el tratamiento solo de ISO comporta. Entre los parámetros que se vieron reconstituídos por la acción de FGF21 en los ratones neonatos están la hipertrofia propiamente dicha, tanto a nivel de órgano como de cardiomiocitos. La expresión de genes y proteína de los marcadores patológicos e inflamatorios (ANF e IL-6 respectivamente) también se veía reducida, mientras que la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de AG se veía aumentada por el efecto de FGF21. Entre los marcadores de metabolismo se encuentra PGC1 α , que antes estaba reducida a causa del ISO, su expresión se recupera a valores normales con el FGF21.

Posteriormente demostramos el efecto directo de FGF21 sobre los cardiomiocitos y el mecanismo a través del cual FGF21 actúa. Usando un sistema in vitro de cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata (NMC) describimos como el tratamiento con FGF21 activaba la vía de señalización de ERK1/2, que es la vía principal responsable de los efectos intracelulares de FGF21 (Ogawa et al., 2007). Además de ERK1/2, FGF21 también induce la fosforilación del FGFR1 (el receptor de FGFs que el corazón expresa), y de CREB. El hecho de que CREB sea fosforilado por FGF21 es de vital importancia, ya que una diana directa de CREB es PGC1 α (Ventura-Clapier, Garnier, & Veksler, 2008). PGC1 α es un coactivador transcripcional que está involucrado en la regulación metabólica y en el control del estrés oxidativo en varios tejidos incluido el corazón (Aubert, Vega, & Kelly, 2013). La importancia radica en que PGC1 α es capaz de inhibir la vía proinflamatoria de NF κ B (Eisele, Salatino, Sobek, Hottiger, & Handschin, 2013) que se ha descrito involucrada en procesos proinflamatorios patológicos (Freund et al., 2005; Kawano et al., 2005; Li et al., 2004). Otro estímulo que activa la vía NF κ B y que PGC1 α inhibe son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Higuchi et al., 2002). Además, ya se había descrito que en un contexto hipertrófico (Lehman & Kelly, 2002b) y pro-inflamatorio (Alvarez-Guardia et al., 2010; Schilling et al., 2011) la expresión de PGC1 α se encuentra reducida. Los datos que nosotros obtuvimos van en consonancia con lo que se conocía y van más allá: Al igual que en los modelos in vivo, tanto en ratones adultos como neonatos, los estímulos prohipertróficos (ISO en ratones y fenilefrina (PE) en cultivo) reducen la expresión de PGC1 α . Junto con la reducción de la expresión de PGC1 α en el cultivo, pudimos describir como el tratamiento con PE hace que se sobrexpresen los marcadores de patología y se produzca una mayor producción de ROS y la activación de la vía NF κ B. Al tratar los cardiomiocitos conjuntamente con PE y FGF21 observamos que estos efectos

adversos se revertían ya que la producción de ROS disminuía muy significativamente, la vía NFκB no estaba activada y la expresión de marcadores patológicos se inhibía. Todos estos efectos positivos suceden gracias a que el tratamiento de FGF21 activa el FGFR1, que se ha descrito en otros tipos celulares como inductor de CREB (Stachowiak, Fang, Myers, Dunham, & Stachowiak, 2003), que a su vez media en la sobreexpresión de PGC1α como pudimos constatar tanto a nivel de expresión génica como proteica. La vía de acción FGFR1-CREB-PGC1α ya se había descrito anteriormente en el tejido adiposo (Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2011).

Tras demostrar que el corazón y los cardiomiocitos son dianas de FGF21 y que se benefician de sus efectos, quisimos esclarecer si las células cardiacas son también productoras de este factor. Hasta la fecha los tejidos diana de FGF21 son a su vez productores de la proteína y pudimos demostrar que el corazón no es una excepción. En ratones, ocurre un aumento de la expresión cardiaca de FGF21 entre la etapa fetal y la neonatal y los niveles de expresión del neonato se mantiene en la edad adulta de los animales. Mediante el sistema de NCM pudimos demostrar que es la fracción de cardiomiocitos del corazón la que expresa el FGF21 (la fracción de fibroblastos y el resto de células cardiacas a penas lo expresaban). La expresión de FGF21 se ve incrementada cuando el corazón se enfrenta a un insulto (ISO, ligamiento aórtico, infarto) o cuando los cardiomiocitos en cultivo se tratan con PE. Otros estados fisiopatológicos que se han descrito en la literatura como causantes de la sobreexpresión de FGF21 en el corazón son la obesidad en ratas (Patel et al., 2014), la diabetes tipo 1 (C. Zhang et al., 2015), el ayuno (Brahma et al., 2014), el estrés de retículo endoplasmático (ER) (Brahma et al., 2014; Gaich et al., 2013) y condiciones pro-oxidativas/proinflamatorias (A. Planavila et al., 2015). El corazón humano reacciona de manera similar a los modelos *in vitro* y modelos animales experimentales, ya que el corazón de pacientes con insuficiencia cardiaca sobreexpresa también FGF21 (A. Planavila et al., 2015).

La expresión cardiaca de FGF21 está controlada por Sirt1-PPARα, como en el caso hepático (Purushotham et al., 2009), donde FGF21 regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Los modelos de ratón *Sirt1*^{-/-} y *Ppara*^{-/-} presentan niveles de expresión cardiacos de FGF21 inferiores a los ratones *Wt*. Estos datos junto con los resultados obtenidos en NCMs de que la inhibición de PPARα impide la inducción de FGF21 que la sobreexpresión de *Sirt1* o el tratamiento con PE provocan, dejan claro que *Sirt1* actúa a través de PPARα para controlar la expresión de FGF21.

No solo se produce expresión génica de FGF21 sino que éste se secreta al medio de cultivo y su secreción, al igual que la expresión, aumenta al tratar las células cardiacas con PE o al infectarlas para que sobreexpresen *Sirt1*. Pese a que la secreción cardiaca de FGF21 es inferior a la de las células secretoras de FGF21 clásicas, pudimos demostrar que el FGF21 producido localmente es suficiente para llevar a cabo las acciones protectoras que hemos descrito. La respuesta cardiaca de los ratones *FGF21*^{-/-} y el bloqueo de los efectos positivos mediante el uso de anticuerpos contra FGF21 *in vitro* demuestran que además del FGF21 producido sistémicamente, el de producción local sería suficiente para activar un loop autocrino que ejerce funciones cardioprotectoras. El daño cardiaco provocaría la producción local de FGF21 vía SIRT1-PPARα que se secretaría para evitar este daño impidiendo la hipertrofia y la desregulación metabólica y activando vías antiinflamatorias y antioxidantes (A. Planavila et al., 2015). Este loop autocrino se cierra al activar el FGF21 secretado señales *upstream* de *Sirt1* que conduciría de nuevo a más

sobreexpresión de FGF21 (Di Lisa & Itoh, 2015). En un contexto patológico, el FGF21 circulante no se ve aumentado, solo la expresión cardiaca es mayor, por lo que el papel autocrino sería predominante. En situaciones fisiológicas, como el ayuno (Potthoff et al., 2009) o la hipertrofia cardiaca gestacional (Eghbali et al., 2005), tanto la expresión sistémica (Cui et al., 2014) como la local de FGF21 están aumentadas, en estos casos, ambas acciones; la autocrina/paracrina y la endocrina estarían en funcionamiento. Las acciones de FGF21 en la hipertrofia cardiaca gestacional se discuten más adelante.

Si la producción local de FGF21 puede contribuir a los niveles circulantes de FGF21 que se observan en diferentes situaciones está aún por esclarecer. Es cierto que los niveles de expresión y secreción del corazón, comparados con aquellos del hígado, son ciertamente inferiores. A pesar de ello, la expresión cardiaca de este factor se halla altamente inducida en estados patológicos por lo que no se puede descartar la aportación del corazón. Un estudio ha demostrado además que ratones transgénicos que sobreexpresan FGF21 exclusivamente en corazón muestran niveles circulantes mayores y que su composición corporal esta alterada (Gaich et al., 2013). Por este motivo, el corazón puede potencialmente contribuir a los niveles sistémicos de FGF21 lo que le permitiría ejercer sus efectos de un modo endocrino contribuyendo a la homeostasis corporal en condiciones fisiológicas y patológicas.

Los resultados que se recogen en esta primera publicación que conforma la presente tesis doctoral muestran como el FGF21 tiene efectos positivos y protectores en el corazón frente a la patología hipertrófica cardiaca y erigen a FGF21 como un nuevo factor a tener en cuenta, puesto que es capaz de actuar sobre y de ser secretado por el propio corazón.

El papel cardioprotector de FGF21 durante la gestación.

Tras observar que FGF21 ejercía una función protectora frente a la hipertrofia cardiaca, quisimos averiguar que función tendría este factor en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca fisiológica, usando como modelo la hipertrofia gestacional. Al analizar los niveles circulantes de FGF21 en hembras de ratón gestantes en la fase terminal de su embarazo, observamos que existía una inducción de esta hormona en comparación con ratones no-gestantes. En la bibliografía existía en ese momento un único estudio que relacionaba a FGF21 y la gestación (Wang, Zhu, Li, An, & Wang, 2013) y describía que las mujeres embarazadas con diabetes gestacional tenían niveles más altos de FGF21 circulantes que las embarazadas sin patología asociada.

Para determinar el origen del incremento de FGF21 circulante que observábamos en nuestros animales, pasamos a analizar la expresión de FGF21 en diferentes tejidos. La expresión hepática estaba altamente inducida al igual que la cardiaca. Por el contrario, la gestación no inducía la expresión en ninguno de los tejidos adiposos estudiados (blanco perigonadal y marrón). Al analizar la expresión de FGF21 en estos mismos tejidos, pero en ratones gestantes PPAR α ^{-/-} observamos como la inducción hepática y cardiaca de FGF21 se perdía completamente. Se puede deducir por lo tanto, que en gestación al igual que en otras situaciones y tal como se encuentra descrito por otros (Badman et al., 2007; Purushotham et al., 2009), y por nosotros mismos (Hondares et al., 2011), la expresión de FGF21 se regula a través de PPAR α .

Además de FGF21, la gestación también induce la expresión de sus receptores FGFR1 y β -Klotho, específicamente en corazón. Seguidamente comprobamos como FGF21 es capaz de activar su vía de señalización en el corazón de las hembras embarazadas. Los altos niveles de FGF21 circulantes se asocian con un alto nivel de fosforilación de ERK1/2 en el corazón, al contrario que en el resto de tejidos analizados. También pudimos observar como el hígado, el tejido adiposo blanco y el adiposo marrón presentaban ciertos rasgos de resistencia a FGF21 durante la preñez, ya que el tratamiento con FGF21 no era capaz de fosforilar esta vía de señalización de la misma forma que en ratones no gestantes, algo similar a lo que se puede observar en la resistencia a FGF21 observada en obesidad (Fisher et al., 2010).

En el corazón, FGF21 es capaz de activar su señalización en la etapa final de la gestación llevando a cabo una mayor oxidación de ácidos grasos, aspecto que más adelante se detalla y discute. Por el contrario, la incapacidad para activar la señalización en el tejido adiposo blanco y marrón podría comprenderse ya que los efectos que FGF21 tiene sobre estos mismos tejidos en un estado no-gestante están confrontados a las necesidades biológicas y fisiológicas de la preñez. FGF21 activa el programa termogénico del tejido adiposo marrón (Fisher et al., 2012; Hondares et al., 2010). Durante la gestación, por el contrario, se observa una disminución de los marcadores termogénicos (UCP1, DIO2) (Martin et al., 1989; F. Villarroya, Felipe, & Mampel, 1986) y de la función termogénica en sí, tanto la termogénesis inducida por la dieta (Abelenda & Puerta, 1987) como la inducida por frío (Imai-Matsumara, Matsumura, Morimoto, & Nakayama, 1990), lo que indica que este tejido no está activo termogénicamente (Andrews, Richard, Jennings, & Trayhurn, 1986; Frontera et al., 2005; Schneider & Wade, 1987; Wade, Jennings, & Trayhurn, 1986). La carencia de la función clásica del tejido adiposo marrón se prolonga durante la fase final del embarazo y la lactancia (Martin et al., 1989; F. Villarroya et al., 1986), dos situaciones en las que se potencia el ahorro energético. El tejido adiposo marrón interescapular sí se encuentra hipertrofiado durante la fase final de la gestación a pesar de todo, pero el tamaño mayor se debe a que este reservorio de grasa funciona como tejido adiposo blanco, guardando reservas lipídicas para su liberación durante las fases tardías de la gestación y lactancia (Frontera et al., 2005). Además de eso, el feto en constante crecimiento y elevada tasa metabólica genera el calor que podría ser necesario, supliendo las funciones del tejido adiposo marrón inactivo.

Por otra parte, el efecto de FGF21 en el tejido adiposo blanco es, entre otros, aumentar la sensibilidad a insulina favoreciendo así la captación de glucosa y la formación de reservas lipídicas (Kharitonov et al., 2005). Puede que este rol sea beneficioso en la parte anabólica de la gestación (Herrera, 1986), pero en la parte catabólica final no. La insensibilidad a FGF21 reduciría la captación de glucosa por parte del tejido adiposo blanco, dejándola disponible para el feto e impidiendo la lipogénesis en el tejido adiposo blanco. En esta etapa final de la gestación ocurre también una resistencia sistémica a la insulina con el mismo fin: permitir al feto una mayor disposición de glucosa al impedir su uso por parte de los tejidos maternos. En esta adaptación de la sensibilidad a insulina también contribuye el tejido adiposo blanco y su estado proinflamatorio (Kondo, Sugiyama, Kusaka, & Toyoda, 2004), que mediante la secreción de citocinas como TNF α favorece la resistencia a insulina (Kirwan et al., 2002). Otro de los efectos de FGF21 en el tejido adiposo es la de inhibir la lipólisis reduciendo así los niveles circulantes de ácidos grasos libres (Arner et al., 2008). Al estar el tejido adiposo blanco insensibilizado a FGF21 se evita este efecto, que es el que precisamente la gestación requiere: un constante suministro de ácidos grasos

provenientes de las reservas lipídicas para permitir la gluconeogénesis que sustentará a la madre durante el final de la gestación y permitirá una correcta lactancia (Butte NF & Butte, 2000; Ghio, Bertolotto, Resi, Volpe, & Di Cianni, 2011).

La insensibilidad del hígado y de los tejidos adiposos marrón y blanco puede comprenderse también al observar como la falta de FGF21 no genera un fenotipo más evidente en las hembras preñadas. Siendo FGF21 un factor tan importante en la regulación metabólica del organismo cabría esperar una afectación mayor durante la gestación, proceso en el que la remodelación metabólica es de vital importancia. Por el contrario, al ver que los ratones FGF21^{-/-} no muestran alteraciones en los parámetros circulantes referentes al metabolismo, la teoría de que la gestación es también un estado de resistencia generalizada a FGF21 (menos en el corazón) cobra sentido.

Además de fosforilar ERK1/2 en corazón, los altos niveles circulantes de FGF21 se asocian a la sobreexpresión de los genes de respuesta inmediata (*Egr1* y *c-Fos*) que se sitúan inmediatamente *downstream* de ERK1/2 y son los encargados de regular la respuesta sérica. De igual modo que ERK1/2 no estaba fosforilado, la expresión de estos genes tampoco estaba modificada por efecto de la gestación en el hígado, WAT o BAT. Analizamos además la expresión de estos genes indicadores de la señalización de FGF21 en ratones gestantes KO para FGF21. En estos animales pudimos constatar que la gestación no producía una mayor expresión de *Egr1* ni *c-Fos* en el corazón. Estos datos apuntan a que la gestación activa la vía ERK1/2-genes de respuesta inmediata de una manera dependiente a FGF21, ya que esta respuesta se pierde por completo en ratones FGF21^{-/-}.

Por otra parte, el perfil gestacional y metabólico de los ratones FGF21^{-/-} parece no estar comprometido, ya que no se observan diferencias entre los genotipos en lo que respecta a el número y peso de fetos por gestación ni en los parámetros circulantes más representativos (glucosa, triglicéridos, FFA, KB, IL-6, insulina, resistina, leptina y PAI-1).

Es por este motivo que parece que el corazón sería la diana del FGF21 producido durante la gestación tanto de manera sistémica como local.

Seguidamente analizamos más profundamente el corazón y su respuesta hipertrófica ligada a gestación y el papel de FGF21 en ella. Con este fin estudiamos el impacto que la falta de FGF21 tiene en el proceso hipertrófico gestacional que es un proceso fisiológico compensatorio que ocurre normalmente y que permite al corazón aumentar su función de bombeo frente a la elevada demanda cardiaca que ocurre durante el embarazo (Eghbali et al., 2005; Eghbali, Wang, Toro, & Stefani, 2006). Hemos descubierto que sin FGF21 los corazones de los ratones gestantes no desarrollan la hipertrofia que sí se da en los ratones Wt. Al analizar el área de los cardiomiocitos constatamos que existe un mayor tamaño celular basal en los ratones FGF21-KO no gestantes. Los cardiomiocitos de estos animales son más grandes en condiciones no-gestantes pero son incapaces de hipertrofiarse con el estímulo de la gestación. El hecho de que los animales carentes de FGF21 no puedan desarrollar hipertrofia cardiaca gestacional podría suponer la incapacidad de contrarrestar el estrés al que las paredes ventriculares tienen que hacer frente por la sobrecarga de volumen sanguíneo que ocurre en la gestación (Eghbali et al., 2005; Longo, 1983).

Al realizar ecocardiografías a estos animales observamos la misma tendencia. La masa del ventrículo izquierdo estaba ya aumentada en las hembras FGF21 KO no-gestantes. Con motivo de la gestación solo los animales Wt presentaban un mayor peso ventricular, ya que en los KO no se alteraba. Por otra parte, los índices para el diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole y diástole aumentaban solamente con la gestación en las hembras Wt. De igual manera, solo la gestación hacía que el volumen final sistólico y diastólico se viera incrementado en las hembras Wt. Estos datos además permitieron calcular el índice de esfericidad, que se redujo solamente en el grupo de las gestantes Wt, indicativo de hipertrofia excéntrica y dilatación. Todos estos datos cardiacos muestran que la falta de FGF21 impide las adaptaciones cardiacas propias de la gestación, ya que las modificaciones que pudimos observar en las hembras Wt gestantes no se daban en las FGF21^{-/-}. Como ya se conocía (Chung & Leinwand, 2014), la hipertrofia cardiaca gestacional no supuso la expresión de marcadores patológicos en nuestros ratones Wt. En los ratones gestantes KO tampoco se daba un patrón de expresión patológico muy marcado, pero la α -actinina tendía a estar sobreexpresada y el ratio β/α -MHC si era más alto. Otros marcadores de daño cardiaco son la presencia de fibrosis y la sobreexpresión de enzimas involucradas en la remodelación del matriz extracelular. En nuestro caso, ninguno de estos factores resultó alterado ni por efecto del genotipo ni por la gestación.

Un parámetro que descubrimos estar muy alterado fue el metabolismo cardiaco. El metabolismo cardiaco durante la gestación se caracteriza por estar aún más si cabe basado en ácidos grasos (L. X. Liu & Arany, 2014), reflejo de lo cual es la elevada expresión de genes codificantes para proteínas involucradas directa o indirectamente con la oxidación de ácidos grasos. Por el contrario, el cambio del metabolismo cardiaco a favor de la oxidación de glucosa se asocia a estados de disfunción cardiaca (Anna Planavila, Calvo, & Vázquez-Carrera, 2006). Primero analizamos la expresión génica de *Mcad*, *Pdk4*, *Cd36* y *Cpt1b*. Como era de esperar, la gestación indujo la expresión de estos marcadores de captación de ácidos grasos y de oxidación. En los ratones KO por el contrario, la expresión de *Cd36* y *Cpt1b* estaba inducida pero no al mismo nivel que en los Wt. La expresión de *Pdk4* por el contrario sí que era significativamente inferior. PDK4 se ha descrito como una de las 3 proteínas claves en la regulación de la actividad mitocondrial que conllevan a los cambios en el substrato metabólico (Heinrich Taegtmeyer, Razeghi, & Young, 2002). Para comprobar si los cambios en la expresión génica de los marcadores de oxidación de ácidos grasos se traducían en el consumo real medimos los niveles de oxidación mediante un sistema *ex vivo* (Hirschey et al., 2010). El resultado fue claro: en la fase terminal de la gestación existe un aumento muy marcado de la oxidación de ácidos grasos en los corazones de ratones gestantes comparado con los ratones no-gestantes. Los ratones KO para FGF21 también mostraban un aumento de oxidación pero significativamente inferior. Al analizar el comportamiento de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 observamos que la gestación tendía a descender (no significativamente) la expresión del transportador constitutivo GLUT1 en los corazones de ratones gestantes Wt y KO. El transportador dependiente de insulina GLUT4 mostraba un comportamiento diferente en función del genotipo; mientras que su expresión permanecía estable en las gestantes Wt, las gestantes KO sobreexpresaban significativamente GLUT4. Este dato sugiere una captación de glucosa aumentada por parte de los corazones de ratones gestantes KO.

En conjunto, los datos de la oxidación y de captación de glucosa apuntan a que durante la gestación la falta de FGF21 da lugar a que el corazón use más preferentemente glucosa que ácidos grasos, lo que iría asociado a su incapacidad para desarrollar la hipertrofia fisiológica gestacional pudiendo comprometer la función cardiaca durante este periodo (Lehman & Kelly, 2002a, 2002b).

Estos resultados muestran que durante la gestación ocurre una sobreexpresión de FGF21 hepática, en concordancia con los datos de otro grupo (Cui et al., 2014), y local en el corazón que se traduce en unos niveles circulantes mayores de FGF21. Esta sobreexpresión de FGF21 es la que dotaría al corazón de la mayor capacidad oxidativa que requiere para hacer frente al sobreesfuerzo cardiovascular que representa la gestación y que permite que los cardiomiocitos, y así el órgano, se hipertrofien. La falta de FGF21 dejaría en evidencia como el corazón, incapaz de aumentar su oxidación de ácidos grasos, ha de disponer de la glucosa para hacer frente a la demanda metabólica, muestra de maladaptación y afectación cardiaca (Dolinsky & Dyck, 2006).

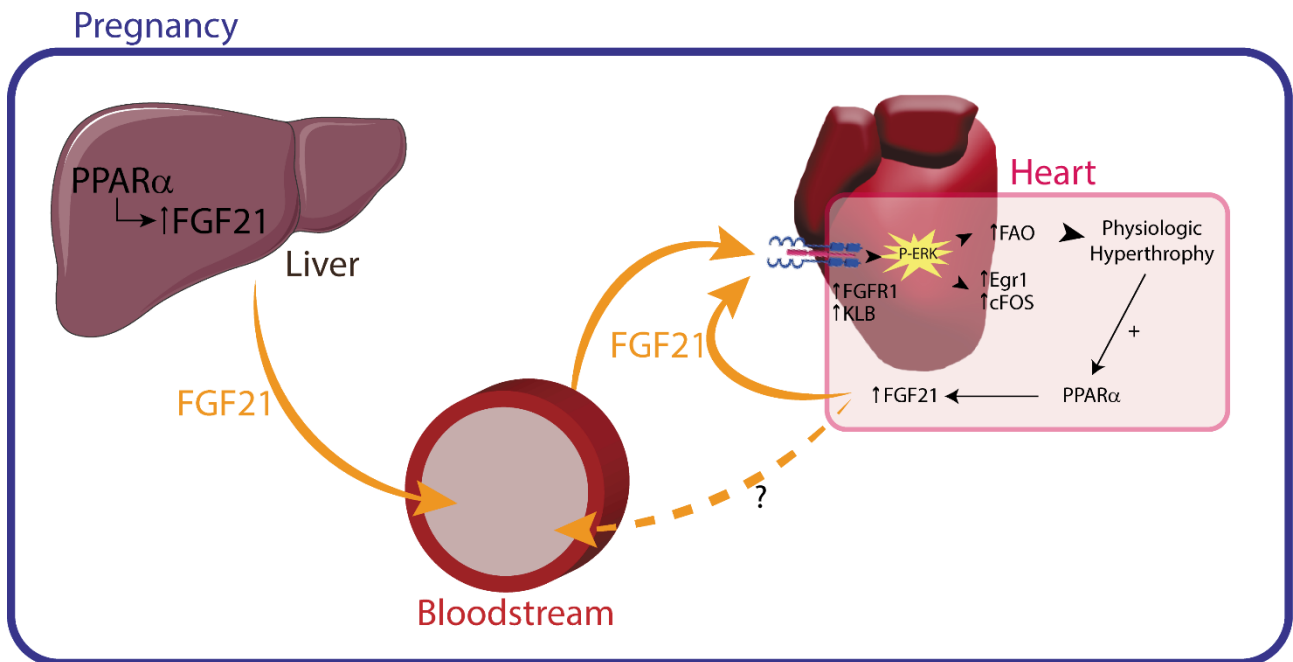


Figura 34. Representación esquemática de la comunicación intra- e interorgánica de FGF21 durante la gestación.

Parece contradictorio que FGF21 juegue un papel protector frente a la hipertrofia cardiaca por una parte y por otra, sea un factor indispensable para su desarrollo en la gestación. Esta aparente incongruencia no lo es tal si tenemos en cuenta la verdadera naturaleza de ambas situaciones hipertroóficas. La hipertrofia cardiaca patológica se caracteriza por una inversión en el sustrato metabólico en la que se fundamenta el corazón, mientras que la hipertrofia fisiológica se caracteriza por un mayor consumo de ácidos grasos. No está del todo claro si el cambio en el sustrato metabólico es una causa o una consecuencia de la patología cardiaca. A pesar de ello, varios estudios concluyen que la alteración del metabolismo cardiaco es un factor decisivo en el

desarrollo de alteraciones cardíacas (Binas, Danneberg, McWhir, Mullins, & Clark, 1999; Chiu et al., 2001; Ana Planavila, Iglesias, Giralte, & Villarroya, 2011; H Taegtmeyer & Overturn, 1988). Esta hipótesis se puede defender también viendo los ejemplos de hipertrofia fisiológica que se conocen; ya que todos ellos comparten una alta disponibilidad de ácidos grasos libres circulantes (AGL) que sustentarían la alta demanda metabólica del corazón durante el tiempo que la hipertrofia tiene lugar. Además, los ácidos grasos activarían la expresión cardíaca local de FGF21 mediante la unión al coactivador PPAR α .

Un ejemplo es la hipertrofia cardíaca debida a la práctica de ejercicio regular o también conocida como corazón de atleta, en el que el ejercicio físico aumenta la expresión de genes involucrados en la captación de ácidos grasos y en su oxidación (Foryst-Ludwig et al., 2011; Iemitsu, Maeda, Miyauchi, Matsuda, & Tanaka, 2005; Rimbaud et al., 2009). Curiosamente, la práctica de ejercicio también es capaz de aumentar los niveles circulantes de FGF21 en animales de experimentación y humanos (Cuevas-Ramos et al., 2012; Kim et al., 2013; Yang et al., 2011). Además del modelo de gestación, que claramente muestra niveles plasmáticos elevados de ácidos grasos libres circulantes, el modelo de hipertrofia fisiológica cardíaca posprandial descrito por el grupo de Leinwand en ofidios es otro claro ejemplo. En este modelo, las serpientes pitón alimentadas desarrollan una impresionante hipertrofia cardíaca (40% de incremento de masa cardíaca en 48-72 horas) que se acompaña de un aumento muy notorio de triglicéridos y AGL circulantes (Riquelme et al., 2011). El cuarto y último modelo es el crecimiento cardíaco postnatal. En este modelo, la hipertrofia cardíaca se da al tener que hipertrofiarse los cardiomiocitos en el tiempo que transcurre desde la edad fetal hasta alcanzar el tamaño adulto (Huang et al., 2012; Soonpaa, Kim, Pajak, Franklin, & Field, 1996; Winter & Gittenberger-de Groot, 2007). En ratones, este periodo de tiempo se corresponde con el tiempo de lactancia, 3 semanas, pasado el cual los ratones se consideran maduros (Hondares et al., 2010). Durante el periodo de lactancia, el único alimento que los neonatos perciben es la leche materna, que es rica en ácidos grasos (Oosting, Verkade, Kegler, van de Heijning, & van der Beek, 2015). Como pudimos probar en el primer artículo que conforma esta tesis, existe un aumento de expresión de FGF21 significativo entre los fetos y los neonatos de ratón. Este aumento de expresión que los corazones de los neonatos tienen podría también favorecer la utilización de los ácidos grasos recibidos por la lactancia para sustentar la hipertrofia. Los niveles de expresión de FGF21 se mantienen en edad adulta en comparación con los neonatos. Si consideramos que el tamaño de los cardiomiocitos en edad adulta es debido a una hipertrofia del tamaño neonatal, podemos pensar que la expresión de FGF21 cardíaca basal del corazón en estado normal es necesaria para mantener las demandas de la obligada hipertrofia. Tal vez por este motivo, los animales neonatos y adultos FGF21^{-/-} muestran basalmente, sin necesidad de insulto cardíaco alguno, una menor oxidación de ácidos grasos en el corazón y un estado cardíaco general peor que les obliga a tener que hipertrofiarse aún más si cabe sustentándose en glucosa para hacer frente a la demanda cardiovascular normal.

En obesidad también se aprecia un mayor nivel de lípidos circulantes, pero sin embargo, la hipertrofia cardíaca que se asocia a esta patología no es de ninguna manera fisiológica (Abel, Litwin, & Sweeney, 2008; Peterson, Waggoner, et al., 2004; Wong et al., 2004). La obesidad se ha descrito como un estado de resistencia a FGF21 (Fisher et al., 2010) en el que el hígado y el tejido adiposo blanco no responden a FGF21. En el estudio que describía esta resistencia causada por la obesidad no se hacía alusión al corazón, por ese entonces se desconocía la

importante implicación de esta hormona en este órgano, pero todo parece indicar que también es resistente a FGF21 del mismo modo que es resistente a insulina (Peterson, Herrero, et al., 2004). Un estudio llevado a cabo en el 2014 demostraba como en los corazones de ratas obesas había una menor expresión de β -Klotho (Patel et al., 2014), algo que también se observa en el tejido adiposo blanco de ratones y pacientes obesos y que se considera causante de la resistencia a FGF21 en este estado (Díaz-Delfín et al., 2012) y que nuestros propios datos también reproducen (J. Villarroya et al., 2014). Esta disminución en la expresión del co-receptor clave para la señalización de FGF21 hace que los corazones sean insensibles a la hormona ya que la fosforilación de ERK1/2 no se producía en la misma escala que en corazones de ratas no obesas. En este estudio pudieron describir además lo perjudicial que resulta para el miocardio la resistencia a FGF21. Los corazones de ratas no obesas pre-tratados con FGF21 antes de sufrir un protocolo de isquemia reperfusión se beneficiaban de sus efectos ya que presentaban un área de infarto menor, las ratas obesas por el contrario no (Patel et al., 2014). Resulta paradójico que en las ratas obesas el corazón exprese más mRNA y más proteína de FGF21 y que ésta llegue a secretarse en más cantidad, lo que posibilitaría al corazón hacerse valer de sus efectos protectores si no fuera por la resistencia que la obesidad le ha ocasionado.

Otra diferencia sustancial del papel que FGF21 juega en las diferentes hipertrofias es el *timing* de su inducción. En las hipertrofias patológicas inducidas en modelos animales, la sobreexpresión de FGF21 es posterior al insulto y puede entenderse como un intento de organismo y del propio corazón por hacer frente a la alteración del trabajo cardiovascular al que se encuentra sometido en esta nueva situación. En el trabajo que se discutía antes, Patel et al. mostraban también como las ratas sometidas al protocolo de I/R sin pre-tratamiento sobreexpresaban FGF21 y lo secretaban en cantidades mayores que los animales control, además la expresión del receptor FGFR1 también estaba acrecentada. A pesar de esto, la sobreexpresión no suponía un efecto beneficioso para los corazones de las ratas no-obesas frente a los de los animales obesos que son resistentes a FGF21 ya que el área infartada era similar.

La sobreexpresión de FGF21 en estas situaciones patológicas es una medida adaptativa más entre las varias que se dan, pero que finalmente no resultarán suficientemente eficientes para contrarrestar los efectos adversos de la patología o el daño. La sobreexpresión de ANF y BNP podría considerarse un fenómeno análogo a la sobreexpresión de FGF21. En un primer momento, el efecto que estos factores provocan es una reducción de la presión sanguínea que disminuye el estrés sobre las paredes cardiacas (Savoia, Volpe, Alonzo, Rossi, & Rubattu, 2010). Cuando el daño es crónico, la expresión de estos factores también lo es y su acción hipotensora no es resolutoria a la hora de disminuir la carga cardiaca aumentada (Harvey & Leinwand, 2011).

En resumen, los resultados obtenidos apuntan a que la sobreexpresión sistémica y local de FGF21 está destinada preferentemente al corazón ya que es el único tejido entre los analizados, sensible a su señalización. En el corazón, FGF21 sustenta y posibilita la demanda energética que este órgano requiere durante la gestación mediante la sobreexpresión de proteínas involucradas en el transporte y oxidación de ácidos grasos. La falta de FGF21 supone una desregulación del metabolismo cardiaco, ya que el corazón tiende a sobreexpresar el transportador de glucosa GLUT4 y la oxidación de ácidos grasos se ve altamente reducida. Además, durante la gestación

se da una sobreexpresión de enzimas antioxidantes que reducirían los niveles de ROS, preservando aún más el carácter fisiológico y adaptativo de este tipo de hipertrofia.

C/EBP β se requiere para la hipertrofia cardiaca gestacional

Como se ha mencionado anteriormente, EGR1 es diana de la acción de FGF21. En este punto cabe mencionar que EGR1 controla directamente la expresión del factor de transcripción C/EBP β . Recientemente se ha demostrado en la línea celular de fibroblastos 3T3 que el promotor de *C/ebp β* dispone de 3 sitios de unión para EGR1 y que la supresión de *Egr1* y sus homólogos supone también la represión de la expresión de *C/ebp β* (Salotti, Sakchaisri, Tourtellotte, & Johnson, 2015). Estos resultados dejan abierta la puerta a una posible conexión entre los efectos de FGF21 y C/EBP β sobre la hipertrofia gestacional. Sería posible que la elevada expresión de *Egr1* que observamos en los corazones de hembras gestantes a causa de los altos niveles de FGF21 estuviese implicada en la sobreexpresión de *C/ebp β* que a continuación se detalla.

Siguiendo con el modelo de hipertrofia cardiaca gestacional, quisimos conocer el papel que C/EBP β jugaba en su desarrollo. Este factor de transcripción se había asociado directamente al desarrollo de la hipertrofia cardiaca fisiológica causada por el ejercicio (Boström et al., 2010) y también está implicado en la formación del corazón y en la activación del epicardio en respuesta a daños cardiacos (Huang et al., 2012). Además, C/EBP β está involucrado en la respuesta inflamatoria y en la activación de macrófagos (Classen, Lloberas, & Celada, 2009), especialmente los del tipo M2 (Gordon & Martinez, 2010). En la gestación ocurre una cierta inflamación sistémica y del tejido adiposo blanco que se ha considerado en parte responsable de la resistencia a insulina característica de esta etapa. El corazón también está afectado por esta resistencia fisiológica a la insulina que se da en la última etapa de la gestación. Además, recientemente se ha descubierto una subpoblación de macrófagos residentes del tejido cardiaco (cTMs), muy similares al tipo M2, cuya función es mediar en la respuesta homeostática frente a daños y patologías cardiacas pero también modular la respuesta inmune (Pinto et al., 2012). Estos cTMs expresan constitutivamente C/EBP β (Pinto, Godwin, & Rosenthal, 2014), que como se ha dicho antes, media en la activación del epicardio, proceso que favorece la reparación del musculo cardiaco.

Los resultados referentes al papel de C/EBP β en la hipertrofia cardiaca gestacional se recogen en la tercera y última publicación que constituye la presente tesis. La primera observación al estudiar los ratones gestantes Wt fue la sobreexpresión de mRNA de *C/ebp β* . Esta sobreexpresión era exclusiva del corazón, ya que el resto de tejidos (hígado, WAT) no presentaba alteraciones y el BAT mostraba niveles inferiores. Además, la sobreexpresión era solamente de la isoforma β , ya que las isoformas α y δ de los C/EBPs también se analizaron y no mostraban alteraciones en su expresión por causa de la gestación. La sobreexpresión del mRNA de *C/ebp β* se traducía también en niveles más elevados de ésta proteína en el corazón. La sobreexpresión de C/EBP β por causa de la gestación se podía observar en sus 3 isoformas: LAP, LAP* y LIP.

Seguidamente, tras haber comprobado que la gestación induce C/EBP β quisimos averiguar la función que este factor de transcripción tiene sobre la hipertrofia gestacional, ya que en otros modelos se había mostrado que era un factor clave para su desarrollo. Al ser las hembras de

C/EBP β ^{-/-} estériles (Sterneck, Tessarollo, & Johnson, 1997), usamos el modelo de haploinsuficiencia de C/EBP β . Las hembras C/EBP β ^{+/-} tienen niveles cardiacos de expresión de C/ebp β un 50% más bajos, como se ha descrito con anterioridad (Boström et al., 2010). Al analizar lo que la haploinsuficiencia de C/EBP β supone a día 18 de gestación en ratones, pudimos observar que el desarrollo de la hipertrofia cardiaca gestacional estaba afectado. La hipertrofia, estimada como peso cardiaco corregido por longitud de la tibia (HW/TL) (Yin, Spurgeon, Rakusan, Weisfeldt, & Lakatta, 1982), aumentaba con motivo de la gestación en ambos genotipos, pero el desarrollo hipertrófico era mayor en animales Wt que en los haploinsuficientes. Las hembras C/EBP β ^{+/-} desarrollaban una hipertrofia un 25% inferior a las hembras Wt. La función cardiaca también fue evaluada. Las hembras no-gestantes de ambos genotipos no presentaban diferencias en los parámetros cardiacos analizados. La gestación causó un aumento del grosor del septo intraventricular en diástole en ambos genotipos, lo que se corresponde con la hipertrofia gestacional. Sin embargo, el diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole y sístole solo se veía aumentado en el caso de las gestantes Wt. Los volúmenes sistólicos y diastólicos y la masa del ventrículo izquierdo eran mayores en las gestantes Wt en comparación con las gestantes C/EBP β ^{+/-}. Finalmente, el índice de esfericidad estaba reducido significativamente en el corazón de las hembras gestantes Wt pero no en el de las C/EBP β ^{+/-}, lo cual indica cierto grado de hipertrofia excéntrica y dilatación en las hembras Wt que se pierde con motivo de la haploinsuficiencia en las C/EBP β ^{+/-}. Por último, examinamos el tamaño de los cardiomiocitos midiendo su área, como indicador de la hipertrofia de las células que conforman el corazón. La gestación hace que los cardiomiocitos aumenten su tamaño de manera significativa por causa de la gestación en los animales Wt. Como se ha mencionado anteriormente, en las hembras C/EBP β ^{+/-} por el contrario, la gestación tiene el efecto contrario ya que el tamaño celular se vio reducido en un 10%. Este resultado demuestra que la gestación tiene un efecto diferente sobre los cardiomiocitos de hembras Wt y C/EBP β ^{+/-}.

Como también se ha mencionado antes, la hipertrofia fisiológica gestacional no se relaciona con la sobreexpresión de marcadores patológicos cardiacos (Eghbali et al., 2005) a diferencia de estados patológicos. Correspondiéndose con este hecho, observamos que los corazones de los animales gestantes, independientemente de su genotipo, no sobreexpresaban marcadores de patología cardiaca, evidenciando el carácter fisiológico de este tipo de hipertrofia. Otra característica de las patologías cardiacas, entre ellas de la hipertrofia cardiaca, es la aparición de fibrosis. La gestación tampoco es un proceso que conlleve fibrosis cardiaca (Bernardo, Weeks, Pretorius, & McMullen, 2010). Los corazones de las hembras Wt así lo confirmaron, ya que la gestación no modificó la fibrosis cardiaca. Los corazones de las hembras parcialmente carentes de C/EBP β por el contrario, presentaban niveles de fibrosis del ventrículo izquierdo más elevados, tanto en estado no-gestante como cuando sí lo estaban. La gestación además produjo una disminución del 50% en los niveles de fibrosis de las hembras C/EBP β ^{+/-}.

Tras observar las alteraciones cardiacas fruto de la falta parcial de C/EBP β pasamos a analizar las consecuencias metabólicas. Las hembras C/EBP β ^{+/-} no gestantes presentaban un tamaño corporal menor, pero esta diferencia se perdía ya que aumentaban de peso de la misma manera que las Wt a causa de la gestación. El peso medio de las crías y el número de crías por camada era similar en ambos genotipos por lo que la carga gestacional era igual en ambos grupos. Con motivo de la gestación se observaba un aumento de los triglicéridos circulantes en ambos grupos

también, pero solo en el de las $C/EBP\beta^{+/-}$ se observaron niveles circulantes más altos de insulina. Los otros analitos circulantes analizados (IL-6, MCP-1, leptina) no se veían alterados ni por causa del genotipo ni del estado gestacional. La PAI-1 si mostraba niveles circulantes mayores durante la gestación de ambos grupos de manera acorde a la literatura (Cerneca et al., 1997; L. Zhang et al., 2011). Estos resultados muestran como la haploinsuficiencia de $C/EBP\beta$ no comporta profundas alteraciones al perfil metabólico de la gestación, por lo que es muy probable que las diferencias cardiacas descritas se deban a la falta intrínseca de $C/EBP\beta$ en el corazón y no son secundarias a alteraciones sistémicas mayores.

El aumento del catabolismo cardiaco de ácidos grasos y la disminución del consumo de glucosa son característicos de la gestación (L. X. Liu & Arany, 2014). Para analizar el impacto de la haploinsuficiencia de $C/EBP\beta$ en nuestro modelo de gestación analizamos la expresión de genes involucrados en la captación y oxidación de AG (piruvato dehidrogenasa cinasa, *Pdk4*; carnitina palmitoil transferasa, *Mcpt1b*; transportador de ácidos grasos, *Cd36*). La expresión de *Pdk4* estaba inducida por la gestación en ambos genotipos. La gestación, por el contrario, no pareció afectar a la expresión de *Mcpt1b* en hembras Wt o $C/EBP\beta^{+/-}$ ni a la expresión de *Cd36* de hembras Wt. Los animales $C/EBP\beta^{+/-}$ mostraban una expresión del transportador *Cd36* inferior a los Wt en estado no-gestante, a pesar de ello, la gestación hacía que la expresión de este gen aumentara con la gestación hasta alcanzar niveles superiores a los de las gestantes Wt. Además de estos marcadores, se analizó el nivel de proteínas cardiacas de PGC1 α y MCAD. Mientras que los niveles de MCAD no se alteraron a consecuencia de la gestación o genotipo, los de PGC1 α sí. La gestación aumenta la cantidad de PGC1 α en el corazón de ambos grupos.

Al observar la expresión de los marcadores involucrados en la captación de glucosa *Glut1* y *Glut4*, observamos que la gestación tendía a disminuir los niveles de expresión en los animales Wt de un modo que no alcanzaba a ser significativo estadísticamente. En los animales $C/EBP\beta^{+/-}$ ambos transportadores estaban menos expresados. El transportador dependiente de insulina *Glut4* estaba infraexpresado en los animales no-gestantes y el transportador constitutivo *Glut1* lo estaba en los gestantes. Esta situación apunta a que se da una disminución de la captación de glucosa cardiaca en los animales $C/EBP\beta^{+/-}$.

Como decíamos antes, $C/EBP\beta$ está también implicado en vías inflamatorias y la gestación se ha relacionado con un estado de inflamación moderado que causa la resistencia a insulina visible en la etapa final del embarazo (de Castro et al., 2011). Para averiguar si esta misma situación ocurre en el corazón de las gestantes analizamos vías proinflamatorias midiendo la expresión de los genes *Il-6*, *Tumor necrosis factor α* (*Tnfa*) y *Mcp1*, todos ellos marcadores proinflamatorios. La expresión de *Il-6* estaba altamente sobreinducida (2.9 veces) con motivo de la gestación, y esta inducción se perdía por completo con la falta parcial de $C/EBP\beta$. La expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos *Mcp1* mostraba un patrón de expresión similar pero sin alcanzar la significancia estadística. La expresión de *Tnfa* se vio inalterada por cualquiera de los dos factores. También se analizó la expresión de *C/ebp δ* ya que se ha descrito como su expresión puede inducirse ante la falta de *C/ebp β* en diferentes escenarios (Hu, Baer, Williams, Johnson, & Schwartz, 1998; Valente et al., 2013). En nuestro caso esta compensación no sucedía, ya que además, la expresión de *C/ebp δ* disminuía por efecto de la gestación en las hembras $C/EBP\beta^{+/-}$.

Lo que estas modificaciones implican es que durante gestación se activa un grado moderado de inflamación en el corazón de las hembras Wt que las C/EBP β ^{+/-} no presentan.

En lo que respecta a la expresión de marcadores de los macrófagos M2, observamos que la gestación no conlleva cambios en la expresión de la Arginasa 1 (*Arg1*), *Lyve1*, *Cd163* o *Mrc1* en los corazones de los animales Wt. Por el contrario las hembras C/EBP β ^{+/-} mostraron tener una reducción de la expresión cardiaca de *Arg1* a consecuencia de la gestación y unos niveles de expresión de *Cd163* inferiores a los Wt en estado no-gestante. Seguidamente analizamos el ratio de activación de macrófagos M1/M2 que se define como el ratio entre el nivel de expresión del marcador de macrófagos M1 *iNos* y la expresión de *Arg1*, indicador de macrófagos M2. Este ratio resultó estar aumentado en los ratones gestantes C/EBP β ^{+/-} en comparación con los Wt. Para confirmar la presencia de macrófagos realizamos una tinción inmunohistoquímica del corazón para identificar células positivas para el marcador F4/80 que indica macrófagos totales. No observamos diferencias en el número de *clusters* positivos que detectamos en las muestras de corazón.

Se puede concluir que durante la gestación, el corazón desarrolla un estado proinflamatorio que se pierde en los animales C/EBP β ^{+/-} de manera independiente a la infiltración de macrófagos. Además, la falta parcial de C/EBP β hace que la respuesta antiinflamatoria que los macrófagos M2 llevan a cabo se vea impedida como el cambio en el ratio M1/M2 muestra.

Además de analizar el impacto que la falta parcial de C/EBP β supone en el estado inflamatorio de los corazones de hembras gestantes, quisimos analizar lo que la falta total de este factor de transcripción implica en la respuesta cardiaca frente un agente pro-inflamatorio como es el LPS. Usando esta vez machos C/EBP β ^{-/-}, indujimos una respuesta patológica proinflamatoria mediante la inyección de LPS. Como era previsible la acción del LPS indujo una respuesta proinflamatoria en los ratones Wt como se observa en la transcripción incrementada de los marcadores *Il-6*, *Mcp1* y *Tnfa*. Sorprendentemente, los ratones KO para C/EBP β también mostraban la expresión de estos marcadores aumentada, incluso más que los animales Wt para el caso de *Tnfa*. Analizamos la expresión de *C/ebp δ* para determinar si la respuesta inflamatoria se debía a un efecto compensatorio llevado a cabo por esta isoforma. Efectivamente, *C/ebp δ* se sobreexpresaba 2.6 veces más en el grupo C/EBP β ^{-/-} tratado con LPS. Seguidamente analizamos la expresión de marcadores para macrófagos M2. Encontramos que *Arg1*, *Mrc1* y *Cd163* estaban menos expresados en los animales KO tratados con LPS en comparación con los Wt tratados. Al analizar el ratio M1/M2 observamos que este índice estaba incrementado significativamente en el grupo de animales KO tratados frente a los Wt tratados. Por último, el análisis inmunohistoquímico para detectar infiltración de macrófagos en el tejido cardiaco no mostró diferencias en el número de *clusters* positivos para F4/80. El conjunto de estos datos revela que C/EBP β es un importante mediador en la respuesta proinflamatoria cardiaca, sobretodo en el control de la población de macrófagos antiinflamatorios M2.

En resumen, los resultados que se recogen en esta tercera publicación muestran por primera vez como la hipertrofia cardiaca gestacional es dependiente del factor de transcripción C/EBP β . Por este motivo, la falta parcial del factor supone el impedimento del desarrollo correcto de la propia hipertrofia y la aparición de mayor grado de fibrosis en el miocardio de las gestantes. Además, hemos visto como C/EBP β está involucrado en el control de la señalización antiinflamatoria de

los macrófagos M2 y que ésta podría estar relacionada con el desarrollo de la hipertrofia gestacional.

La hipertrofia gestacional, como ya se ha mencionado anteriormente, es un suceso fisiológico y adaptativo que permite aumentar la capacidad de bombeo durante el embarazo (Eghbali et al., 2005), por ello, la falta de hipertrofia que conlleva la haploinsuficiencia de C/EBP β no puede considerarse beneficiosa. Muestra de ello son los niveles elevados de fibrosis que hemos observado asociados a los corazones de las hembras C/EBP $\beta^{+/-}$. La fibrosis es un signo de patología cardíaca (Frey & Olson, 2003) que obstaculiza la contracción y por ello el buen funcionamiento del miocardio. El hecho de que la propia gestación reduzca los niveles de fibrosis es acorde a lo descrito por otros autores, que hacen referencia al papel protector y beneficioso de la gestación sobre la fibrosis tras los daños generados por isquemia/reperfusión (Genead et al., 2012; Xiao et al., 2014)

Los efectos de la falta parcial de C/EBP β parecen ser específicos, ya que los perfiles hormonal y metabólico general parecen inalterados. Solo los niveles de insulina de las gestantes haploinsuficientes estaban elevados. El aumento de esta hormona refleja un estado más insulinoresistente, acorde con la elevada producción de insulina que ocurre en el páncreas de animales C/EBP $\beta^{-/-}$ (Matsuda et al., 2010) y también con la reducción de los transportadores de glucosa que observamos en los corazones de las gestantes C/EBP $\beta^{+/-}$. La resistencia a insulina que se da en la etapa final de la gestación está ligada al estado moderado de inflamación que se induce en el tejido adiposo (de Castro et al., 2011; L. Zhang et al., 2011). Como hemos podido observar esta respuesta inflamatoria se extiende hasta el corazón a causa de la hipertrofia gestacional y es dependiente de C/EBP β .

De manera acorde a nuestros datos, la sobreexpresión de C/EBP β se ha vinculado al desarrollo del corazón y a daño cardíaco, situaciones en las que se promueve una respuesta proinflamatoria en el corazón necesaria para estos procesos (Huang et al., 2012). Por el contrario, en la hipertrofia cardíaca que el deporte causa, la expresión de C/EBP β está reducida. Esta aparente contradicción puede explicarse al no ser la hipertrofia ocasionada por el deporte un proceso que dé lugar a una respuesta proinflamatoria (Serra et al., 2010), al contrario que nuestro modelo de gestación, como nuestros resultados avalan, que sí lo es. C/EBP β se ha vinculado a la regulación de procesos inflamatorios en el tejido adiposo blanco (Rahman et al., 2012).

Estudios recientes han demostrado que la reducción de los niveles de expresión de C/EBP β mediante el uso de ratones *knockdown* protege los cardiomiocitos frente a la hipertrofia patológica ya que ocurre la inhibición del factor NF κ B, lo que sitúa a C/EBP β en el control de vías proinflamatorias del corazón (Zou et al., 2014, 2015). La IL-6 es una citocina que se expresa bajo el control directo de C/EBP β (Akira et al., 1990), por ello, de manera acorde a estos estudios recientes está el papel de IL-6 en el desarrollo de la hipertrofia del ventrículo izquierdo. En otro estudio se mostraba como la delección completa de IL-6 en un modelo de ratón evitaba la aparición de hipertrofia cardíaca y la remodelación del matriz extracelular que si ocurría en ratones Wt por causa de un tratamiento con norepinefrina (Meier et al., 2009).

Por estos motivos, proponemos que C/EBP β se requiere en la hipertrofia cardíaca gestacional igual que en el desarrollo cardíaco embrionario o en los procesos posteriores a daño cardíaco

(infarto de miocardio, I/R o hipertrofia patológica), situaciones en las que un cierto grado de respuesta inflamatoria es necesaria para el correcto funcionamiento cardiaco o como paso intermedio de una serie de eventos que eventualmente conllevarán un beneficio para el corazón. En un reciente estudio se demuestra como este escenario inflamatorio en el corazón es beneficioso frente a los daños ocasionados por infarto de miocardio (Q. Liu et al., 2015). En este trabajo trasplantaron mioblastos del musculo esquelético de rata en corazones infartados, lo que hacía que se inhibiera la expresión de ciertos miRNAs. Los *targets* de estos miRNAs bloqueados resultaron ser entre otros los mRNAs codificantes para *Egr1* y *C/ebpβ*. El efecto del trasplante fue una mayor expresión de EGR1 y C/EBPβ frente a los corazones infartados pero no trasplantados. Este tratamiento supuso una recuperación de la fracción de eyección y de la fracción de acortamiento cardiacos, un menor grado de fibrosis y menor número de células apoptóticas que en el grupo infartado sin trasplantar.

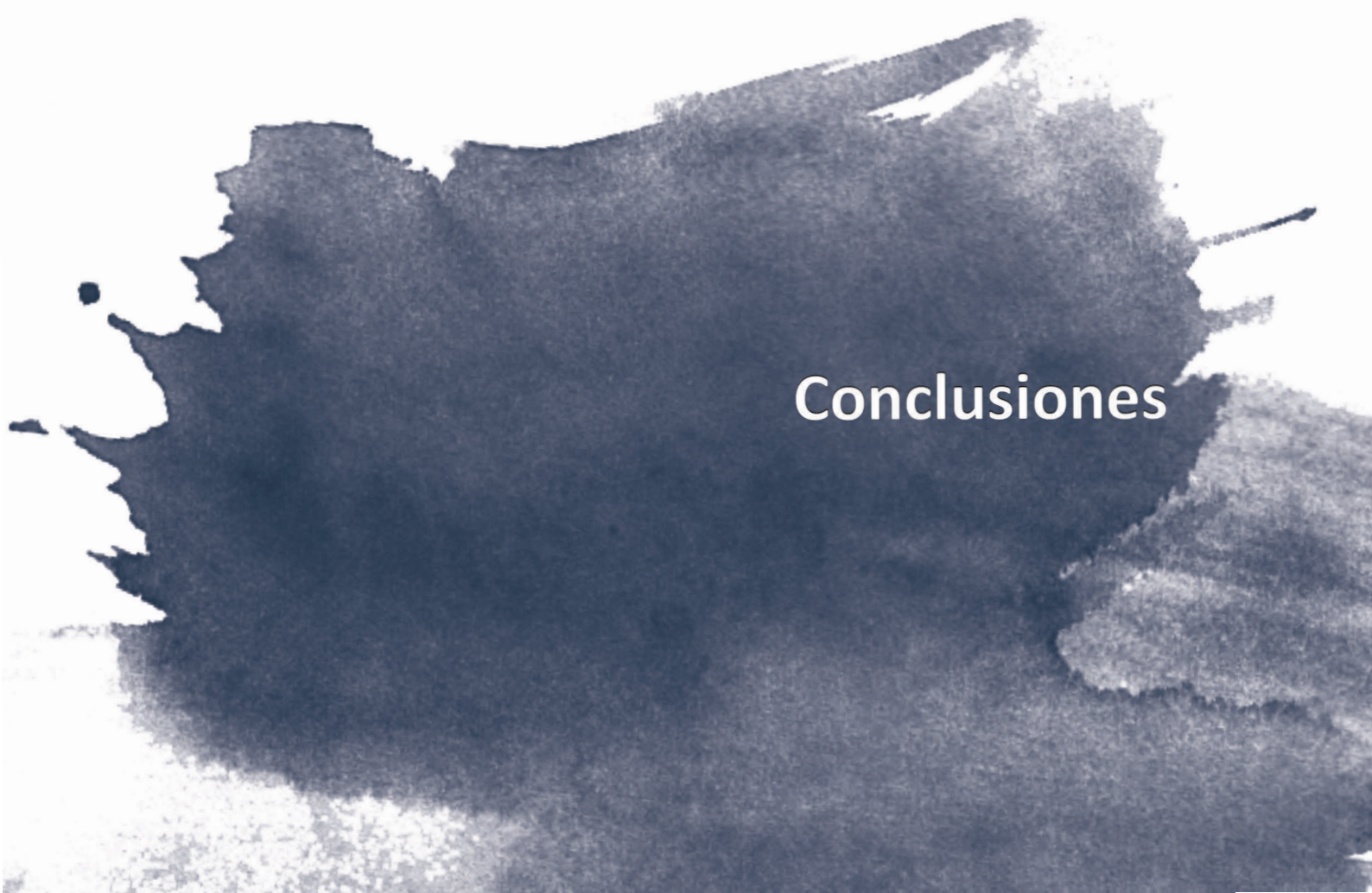
En el caso de la hipertrofia cardiaca gestacional la inducción de C/EBPβ conlleva la sobreexpresión de IL-6 que es la que podría guiar el proceso hipertrófico por lo explicado anteriormente. Se tiende a asociar los procesos inflamatorios con procesos patológicos y con consecuencias negativas, puede que en algunas ocasiones así sea, pero no siempre. La sobreexpresión de IL-6 por ejemplo, ocurre durante el proceso de expansión de las células α -pancreáticas en ratas neonatales y se ha probado que esta sobreexpresión es imprescindible para su correcta funcionalidad y producción de glucagón (Fernández-Millán, de Toro-Martín, Lizárraga-Mollinedo, Escrivá, & Álvarez, 2013). El caso de la hipertrofia gestacional sería otro ejemplo, ya que evitar la hipertrofia sería impedir el mecanismo compensatorio que el corazón tiene para disminuir el estrés de la pared ventricular. En otro extremo se sitúa la hipertrofia generada por el deporte, ya que al contrario de los ejemplos que requieren la respuesta inflamatoria para resolverse satisfactoriamente, este modelo, no depende de ella.

Como hemos explicado, la gestación conlleva la sobreexpresión de IL-6 en el ventrículo cardiaco, que es muestra de este estado inflamatorio. Al no observar una mayor infiltración de macrófagos se deduce que el origen de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF α y MCP1 son los cardiomiocitos, como se ha descrito anteriormente (Anna Planavila et al., 2005; Smeets et al., 2008). Además, los niveles de expresión de la Arginasa1, uno de los principales marcadores de macrófagos M2 y cuya transcripción regula C/EBPβ (Gray, Poljakovic, Kepka-Lenhart, & Morris, 2005), estaban reducidos en los corazones de hembras gestantes C/EBPβ^{+/-} lo que denota una reducción en la población relativa de macrófagos del tipo M2 durante la gestación. La inhibición del crecimiento de los cardiomiocitos a causa de la gestación en las hembras C/EBPβ^{+/-} puede también relacionarse con la falta de expresión de estos genes específicos de macrófagos M2. La polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 se ha propuesto como un evento importante en la reparación tisular ya que promueven la formación de fibras y el crecimiento en el musculo esquelético (Arnold et al., 2007). La regeneración de fibras musculares además hace que el fenotipo vire de M1 a M2. Por último, al determinar que no ocurre un aumento generalizado de la infiltración de macrófagos en el miocardio y observarse que el ratio M1/M2 aumenta, se deduce que existiría un cambio de fenotipo M2 a M1 en los corazones de gestantes C/EBPβ^{+/-}. Este posible aumento de macrófagos M1 contribuiría a la falta de hipertrofia, un proceso adaptativo beneficioso en la gestación. No solo eso, uno de los indicios del papel

beneficioso que C/EBP β juega en la hipertrofia gestacional y que la diferencia de otras hipertrofias patológicas sería su acción sobre los macrófagos antiinflamatorios.

Los resultados obtenidos ayudan a ampliar el conocimiento sobre el papel que C/EBP β tiene en el miocardio y establecen por primera vez que este factor de transcripción es un componente esencial en el engranaje molecular que da lugar a la hipertrofia cardiaca gestacional. Sin duda, estos hallazgos suman en el esfuerzo por discernir los mecanismos moleculares que diferencian las hipertrofias fisiológicas y las patológicas, ya que comprender estas complicadas vías tendría importantes aplicaciones clínicas en el tratamiento de patologías cardiacas.

Nuestros resultados describen a FGF21 y a C/EBP β como dos factores requeridos para que la hipertrofia cardiaca gestacional se desarrolle de manera fisiológica normal. La vinculación entre estos dos factores está aún por esclarecer pero publicaciones recientes (Q. Liu et al., 2015; Salotti et al., 2015) apuntan a que podría existir un nexo entre ellas. Si estos factores actúan de manera conjunta en el contexto de la hipertrófica cardiaca gestacional y si pudieran ser dianas de terapias contra patologías cardiacas son incógnitas que requieren de más investigación.



Conclusiones

1. El corazón es una diana de FGF21. Los cardiomiocitos expresan el receptor FGFR1 y el co-receptor β -Klotho y por lo tanto FGF21 activa su vía de señalización en estas células.
2. FGF21 es producido y secretado por el corazón.
3. Mediante efectos autocrinos y/o endocrinos el FGF21 protege al corazón frente hipertrofia y otros estímulos perjudiciales.
4. La gestación induce la sobreexpresión hepática y cardiaca de FGF21 vía PPAR α , aumentando los niveles circulantes
5. La gestación aumenta específicamente la expresión cardiaca de los receptores de FGF21 FGFR1 y β -Klotho.
6. En gestación, la vía de señalización de FGF21 se encuentra activa especialmente en corazón mientras que el hígado, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón muestran signos de resistencia a FGF21.
7. FGF21 sustenta la demanda metabólica cardiaca durante la gestación mediante la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos.
8. FGF21 es necesario para la respuesta hipertrófica fisiológica normal que ocurre en la gestación.
9. La gestación induce una elevada expresión de C/EBP β en el corazón, que conlleva una alta expresión de IL-6.
10. C/EBP β es necesario para la respuesta hipertrófica fisiológica normal que ocurre en la gestación.
11. La respuesta inflamatoria cardiaca asociada a gestación requiere de C/EBP β , que es necesario para la función antiinflamatoria de los macrófagos M2.
12. C/EBP β media en la respuesta inflamatoria cardiaca frente a LPS



Bibliografía

- Aasa, K. L., Zavan, B., Luna, R. L., Wong, P. G., Ventura, N. M., Tse, M. Y., ... Croy, B. A. (2015). Placental growth factor influences maternal cardiovascular adaptation to pregnancy in mice. *Biology of Reproduction*, *92*(2), 44. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124677>
- Abel, E. D., Litwin, S. E., & Sweeney, G. (2008). Cardiac remodeling in obesity. *Physiological Reviews*, *88*(2), 389–419. <http://doi.org/10.1152/physrev.00017.2007>
- Abelenda, M., & Puerta, M. L. (1987). Inhibition of diet-induced thermogenesis during pregnancy in the rat. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, *409*(3), 314–7.
- Accornero, F., van Berlo, J. H., Benard, M. J., Lorenz, J. N., Carmeliet, P., & Molkentin, J. D. (2011). Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. *Circulation Research*, *109*(3), 272–80. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240820>
- Adams, A. C., Astapova, I., Fisher, F. M., Badman, M. K., Kurgansky, K. E., Flier, J. S., ... Maratos-Flier, E. (2010). Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPARalpha-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(19), 14078–82. <http://doi.org/10.1074/jbc.C110.107375>
- Adams, A. C., Cheng, C. C., Coskun, T., & Kharitonov, A. (2012). FGF21 requires β klotho to act in vivo. *PLoS One*, *7*(11), e49977. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0049977>
- Adams, A. C., Yang, C., Coskun, T., Cheng, C. C., Gimeno, R. E., Luo, Y., & Kharitonov, A. (2012). The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Molecular Metabolism*, *2*(1), 31–7. <http://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.08.007>
- Agre, P., Johnson, P., & McKnight, S. (1989). Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP. *Science*, *246*(4932), 922–926. <http://doi.org/10.1126/science.2530632>
- Ahokas, R. A., Sibai, B. M., & Anderson, G. D. (1989). Lack of evidence of a vasodepressor role for relaxin in spontaneously hypertensive and normotensive pregnant rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *161*(3), 618–22.
- Akashi, Y. J., Springer, J., Lainscak, M., & Anker, S. D. (2007). Atrial natriuretic peptide and related peptides. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, *45*(10), 1259–67. <http://doi.org/10.1515/CCLM.2007.274>
- Akazawa, H. (2003). Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, *92*(10), 1079–1088. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000072977.86706.23>
- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., ... Kishimoto, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *The EMBO Journal*, *9*(6), 1897–906.
- Aljabri, M. B., Songstad, N. T., Lund, T., Serrano, M. C., Andreasen, T. V., Al-Saad, S., ... Ytrehus, K. (2011). Pregnancy protects against antiangiogenic and fibrogenic effects of angiotensin II in rat hearts. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *201*(4), 445–56. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02234.x>
- Allard, M. F., Schönekeess, B. O., Henning, S. L., English, D. R., & Lopaschuk, G. D. (1994). Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *The American Journal of Physiology*, *267*(2 Pt 2), H742–50.
- Alvarez-Guardia, D., Palomer, X., Coll, T., Davidson, M. M., Chan, T. O., Feldman, A. M., ... Vázquez-Carrera, M. (2010). The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovascular Research*, *87*(3), 449–58. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvq080>
- An, S.-Y., Lee, M. S., Yi, S.-A., Ha, E. S., Han, S. J., Kim, H. J., ... Lee, K.-W. (2012). Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery

plaques. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 96(2), 196–203. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.01.004>

- Andrews, J. F., Richard, D., Jennings, G., & Trayhurn, P. (1986). Brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in mice. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 30(2), 87–93.
- Angelin, B., Larsson, T. E., & Rudling, M. (2012). Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators--a critical appraisal. *Cell Metabolism*, 16(6), 693–705. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.001>
- Anton, L., Merrill, D. C., Neves, L. A. A., Diz, D. I., Corthorn, J., Valdes, G., ... Brosnihan, K. B. (2009). The uterine placental bed Renin-Angiotensin system in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrinology*, 150(9), 4316–25. <http://doi.org/10.1210/en.2009-0076>
- Antos, C. L., McKinsey, T. A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J. M., ... Olson, E. N. (2002). Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 907–12. <http://doi.org/10.1073/pnas.231619298>
- Arad, M., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (2007). AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circulation Research*, 100(4), 474–88. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000258446.23525.37>
- Arany, Z., He, H., Lin, J., Hoyer, K., Handschin, C., Toka, O., ... Spiegelman, B. M. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metabolism*, 1(4), 259–71. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.03.002>
- Arany, Z., Novikov, M., Chin, S., Ma, Y., Rosenzweig, A., & Spiegelman, B. M. (2006). Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- coactivator 1 . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 10086–10091. <http://doi.org/10.1073/pnas.0603615103>
- Arber, S., Hunter, J. J., Ross, J., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., ... Caroni, P. (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*, 88(3), 393–403.
- Ariazi, E. A., Brailoiu, E., Yerrum, S., Shupp, H. A., Slifker, M. J., Cunliffe, H. E., ... Jordan, V. C. (2010). The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Research*, 70(3), 1184–94. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3068>
- Arner, P., Pettersson, A., Mitchell, P. J., Dunbar, J. D., Kharitonov, A., & Rydén, M. (2008). FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Letters*, 582(12), 1725–30. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.038>
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., ... Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5), 1057–69. <http://doi.org/10.1084/jem.20070075>
- Aubert, G., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2013). Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(4), 840–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.015>
- Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metabolism*, 5(6), 426–437. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>
- Badorff, C., Ruetten, H., Mueller, S., Stahmer, M., Gehring, D., Jung, F., ... Dimmeler, S. (2002). Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(3), 373–81. <http://doi.org/10.1172/JCI13779>

- Balamurugan, K., & Sterneck, E. (2013). The many faces of C/EBP δ and their relevance for inflammation and cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 9(9), 917–33. <http://doi.org/10.7150/ijbs.7224>
- Banke, N. H., Wende, A. R., Leone, T. C., O'Donnell, J. M., Abel, E. D., Kelly, D. P., & Lewandowski, E. D. (2010). Preferential oxidation of triacylglyceride-derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPAR α . *Circulation Research*, 107(2), 233–41. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.221713>
- Barclay, M. L. (2009). Physiology of Pregnancy. <http://doi.org/10.3843/GLOWM.10103>
- Barki-Harrington, L., Perrino, C., & Rockman, H. A. (2004). Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 63(3), 391–402. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.011>
- Barrette, V. F., Adams, M. A., & Croy, B. A. (2012). Endometrial decidualization does not trigger the blood pressure decline of normal early pregnancy in mice. *Biology of Reproduction*, 86(3), 66. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096958>
- Barry, S. P., Davidson, S. M., & Townsend, P. A. (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(10), 2023–39. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.02.020>
- Bassien-Capsa, V., Fouron, J.-C., Comte, B., & Chorvatova, A. (2006). Structural, functional and metabolic remodeling of rat left ventricular myocytes in normal and in sodium-supplemented pregnancy. *Cardiovascular Research*, 69(2), 423–31. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.017>
- Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(3), 235–53. <http://doi.org/10.1038/nrd2792>
- Bellomo, D., Headrick, J. P., Silins, G. U., Paterson, C. A., Thomas, P. S., Gartside, M., ... Kay, G. F. (2000). Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circulation Research*, 86(2), E29–35.
- Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(1), H8–H16. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01303.2004>
- Berglund, E. D., Li, C. Y., Bina, H. A., Lynes, S. E., Michael, M. D., Shanafelt, A. B., ... Wasserman, D. H. (2009). Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology*, 150(9), 4084–93. <http://doi.org/10.1210/en.2009-0221>
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., ... Frisén, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5923), 98–102. <http://doi.org/10.1126/science.1164680>
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., ... Frisén, J. (2015). Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*, 1566–1575. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*, 128(1), 191–227. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>
- Berrier, A., Siu, G., & Calame, K. (1998). Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promonocytic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(5), 2267–75.
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205.

<http://doi.org/10.1038/415198a>

- Bersell, K., Arab, S., Haring, B., & Kühn, B. (2009). Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*, *138*(2), 257–70. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.060>
- Binas, B., Danneberg, H., McWhir, J., Mullins, L., & Clark, A. J. (1999). Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*(8), 805–12.
- Blackburn, S. (2014). *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology*. Elsevier Health Sciences.
- Bleumink, G. S., Knetsch, A. M., Sturkenboom, M. C. J. M., Straus, S. M. J. M., Hofman, A., Deckers, J. W., ... Stricker, B. H. C. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *European Heart Journal*, *25*(18), 1614–9. <http://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.06.038>
- Bond, C. F. (1958). Blood volume changes in the lactating rat. *Endocrinology*, *63*(3), 285–9. <http://doi.org/10.1210/endo-63-3-285>
- Bonica, J. (1967). *Principles and practice of obstetric analgesia & anesthesia*. Philadelphia: F.A. Davis Co.
- Bookout, A. L., de Groot, M. H. M., Owen, B. M., Lee, S., Gautron, L., Lawrence, H. L., ... Kliewer, S. A. (2013). FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature Medicine*, *19*(9), 1147–52. <http://doi.org/10.1038/nm.3249>
- Boström, P., Mann, N., Wu, J., Quintero, P. A., Plovie, E. R., Panáková, D., ... Spiegelman, B. M. (2010). C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell*, *143*(7), 1072–83. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.036>
- Bowers, S. L. K., Banerjee, I., & Baudino, T. A. (2010). The extracellular matrix: at the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *48*(3), 474–82. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.024>
- Brahma, M. K., Adam, R. C., Pollak, N. M., Jaeger, D., Zierler, K. A., Pöcher, N., ... Haemmerle, G. (2014). Fibroblast growth factor 21 is induced upon cardiac stress and alters cardiac lipid homeostasis. *Journal of Lipid Research*, *55*(11), 2229–41. <http://doi.org/10.1194/jlr.M044784>
- Brancaccio, M., Fratta, L., Notte, A., Hirsch, E., Poulet, R., Guazzone, S., ... Lembo, G. (2003). Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nature Medicine*, *9*(1), 68–75. <http://doi.org/10.1038/nm805>
- Braz, J. C., Bueno, O. F., Liang, Q., Wilkins, B. J., Dai, Y.-S., Parsons, S., ... Molkenin, J. D. (2003). Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, *111*(10), 1475–86. <http://doi.org/10.1172/JCI17295>
- Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., ... Stinson, E. B. (1982). Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *The New England Journal of Medicine*, *307*(4), 205–11. <http://doi.org/10.1056/NEJM198207223070401>
- Brodde, O. E., & Michel, M. C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews*, *51*(4), 651–90.
- Brower, G. L., Gardner, J. D., Forman, M. F., Murray, D. B., Voloshenyuk, T., Levick, S. P., & Janicki, J. S. (2006). The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, *30*(4), 604–10. <http://doi.org/10.1016/j.ejcts.2006.07.006>

- Brown, J. E. (2011). *Nutrition Through the Lifecycle*. Wadsworth Cengage Learning.
- Bry, M., Kivelä, R., Holopainen, T., Anisimov, A., Tammela, T., Soronen, J., ... Alitalo, K. (2010). Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation. *Circulation*, *122*(17), 1725–33. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.957332>
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., Klevitsky, R., ... Molkentin, J. D. (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO Journal*, *19*(23), 6341–50. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6341>
- Burgess-Beusse, B. L., Timchenko, N. A., & Darlington, G. J. (1999). CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) is an important mediator of mouse C/EBPbeta protein isoform production. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *29*(2), 597–601. <http://doi.org/10.1002/hep.510290245>
- Burke, S. D., Barrette, V. F., Bianco, J., Thorne, J. G., Yamada, A. T., Pang, S. C., ... Croy, B. A. (2010). Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. *Hypertension*, *55*(3), 729. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144253.SPIRAL>
- Butte, N. F., Hopkinson, J. M., Mehta, N., Moon, J. K., & Smith, E. O. (1999). Adjustments in energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(2), 299–307.
- Butte NF, & Butte, N. F. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy : normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, *71*, 1256–1261.
- Buttrick, P. M., Schaible, T. F., Malhotra, A., Mattioli, S., & Scheuer, J. (1987). Effects of pregnancy on cardiac function and myosin enzymology in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *252*(4), H846–850.
- Cain, C. (2013). mAb about FGF21. *Science-Business eXchange*, *6*(1). <http://doi.org/10.1038/scibx.2013.1>
- Calkhoven, C. F., Bouwman, P. R. J., Snippe, L., & AB, G. (1994). Translation start site multiplicity of the CCAAT/enhancer binding protein α mRNA is dictated by a small 5' open reading frame. *Nucleic Acids Research*, *22*(25), 5540–5547. <http://doi.org/10.1093/nar/22.25.5540>
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5573), 1655–7. <http://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Cao, X., Zhou, C., Chong, J., Fu, L., Zhang, L., Sun, D., ... Sun, H. (2015). Estrogen resisted stress-induced cardiomyopathy through increasing the activity of β_2 AR-G α s signal pathway in female rats. *International Journal of Cardiology*, *187*, 377–86. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.02.113>
- Carneiro-Júnior, M. A., Quintão-Júnior, J. F., Drummond, L. R., Lavorato, V. N., Drummond, F. R., da Cunha, D. N. Q., ... Natali, A. J. (2013). The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *57*, 119–28. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.013>
- Cereijo, R., Giral, M., & Villarroya, F. (2015). Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Annals of Medicine*, *47*(2), 169–77. <http://doi.org/10.3109/07853890.2014.952328>
- Cerneca, F., Ricci, G., Simeone, R., Malisano, M., Alberico, S., & Guaschino, S. (1997). Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *73*(1), 31–36. [http://doi.org/10.1016/S0301-2115\(97\)02734-6](http://doi.org/10.1016/S0301-2115(97)02734-6)

- Chandra, G., Cogswell, J. P., Miller, L. R., Godlevski, M. M., Stinnett, S. W., Noel, S. L., ... Gray, J. G. (1995). Cyclic AMP signaling pathways are important in IL-1 beta transcriptional regulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *155*(10), 4535–43.
- Chang, C.-J., Shen, B.-J., & Lee, S.-C. (1995). Autoregulated Induction of the Acute-Phase Response Transcription Factor Gene, *agp/ebp*. *DNA and Cell Biology*, *14*(6), 529–537. <http://doi.org/10.1089/dna.1995.14.529>
- Chapman, A. B., Abraham, W. T., Zamudio, S., Coffin, C., Merouani, A., Young, D., ... Schrier, R. W. (1998). Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney International*, *54*(6), 2056–63. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00217.x>
- Chartoumpakis, D. V., Habeos, I. G., Ziros, P. G., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., & Papavassiliou, A. G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *17*(7-8), 736–40. <http://doi.org/10.2119/molmed.2011.00075>
- Chavez, A. O., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M. A., Folli, F., Defronzo, R. A., & 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*(8), 1542–6. <http://doi.org/10.2337/dc09-0684>
- Chen, C., Cheung, B. M. Y., Tso, A. W. K., Wang, Y., Law, L. S. C., Ong, K. L., ... 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*(9), 2113–5. <http://doi.org/10.2337/dc11-0294>
- Chen, W., Hoo, R. L., Konishi, M., Itoh, N., Lee, P.-C., Ye, H., ... Xu, A. (2011). Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(40), 34559–66. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.285965>
- Chen, W.-W., Li, L., Yang, G.-Y., Li, K., Qi, X.-Y., Zhu, W., ... Boden, G. (2008). Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes : Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, *116*(1), 65–8. <http://doi.org/10.1055/s-2007-985148>
- Chiu, H. C., Kovacs, A., Ford, D. A., Hsu, F. F., Garcia, R., Herrero, P., ... Schaffer, J. E. (2001). A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, *107*(7), 813–22. <http://doi.org/10.1172/JCI10947>
- Christe, M. E., & Rodgers, R. L. (1994). Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *26*(10), 1371–5. <http://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1155>
- Christodoulides, C., Dyson, P., Sprecher, D., Tsintzas, K., & Karpe, F. (2009). Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Is Induced by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists But Not Ketosis in Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94*(9), 3594–3601. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-0111>
- Chung, E., Heimiller, J., & Leinwand, L. a. (2012). Distinct Cardiac Transcriptional Profiles Defining Pregnancy and Exercise. *PLoS ONE*, *7*(7), e42297. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0042297>
- Chung, E., & Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular Research*, *101*(4), 561–70. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvu013>
- Chung, E., Yeung, F., & Leinwand, L. A. (2012). Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *112*(9), 1564–75. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00027.2012>
- Chung, E., Yeung, F., & Leinwand, L. A. (2013). Calcineurin activity is required for cardiac remodelling in pregnancy.

- Cardiovascular Research*, 100(3), 402–10. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvt208>
- Clapp, J. F. (1985). Maternal heart rate in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 152(6), 659–660. [http://doi.org/10.1016/S0002-9378\(85\)80040-5](http://doi.org/10.1016/S0002-9378(85)80040-5)
- Clapp, J. F., & Capeless, E. (1997). Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *The American Journal of Cardiology*, 80(11), 1469–73.
- Classen, A., Lloberas, J., & Celada, A. (2009). Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 531, 29–43. http://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_3
- Constant, V. A., Gagnon, A., Landry, A., & Sorisky, A. (2006). Macrophage-conditioned medium inhibits the differentiation of 3T3-L1 and human abdominal preadipocytes. *Diabetologia*, 49(6), 1402–11. <http://doi.org/10.1007/s00125-006-0253-0>
- Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N., & Calame, K. (1995). Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4371–7.
- Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., ... Kharitononkov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*, 149(12), 6018–27. <http://doi.org/10.1210/en.2008-0816>
- Coven, D. L., Hu, X., Cong, L., Bergeron, R., Shulman, G. I., Hardie, D. G., & Young, L. H. (2003). Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 285(3), E629–36. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00171.2003>
- Cowett, R. M. (1991). *Principles of Perinatal-Neonatal Metabolism*.
- Cowie, M. R., Wood, D. A., Coats, A. J., Thompson, S. G., Suresh, V., Poole-Wilson, P. A., & Sutton, G. C. (2000). Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: a population based study. *Heart (British Cardiac Society)*, 83(5), 505–10.
- Cox, L., Umans, L., Cornelis, F., Huylebroeck, D., & Zwijsen, A. (2008). A broken heart: a stretch too far: an overview of mouse models with mutations in stretch-sensor components. *International Journal of Cardiology*, 131(1), 33–44. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.06.049>
- Craig, J. C., Schumacher, M. A., Mansoor, S. E., Farrens, D. L., Brennan, R. G., & Goodman, R. H. (2001). Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11719–28. <http://doi.org/10.1074/jbc.M010263200>
- Cuevas-Ramos, D., Aguilar-Salinas, C. A., & Gómez-Pérez, F. J. (2012). Metabolic actions of fibroblast growth factor 21. *Current Opinion in Pediatrics*, 24(4), 523–9. <http://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283557d22>
- Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Gómez-Pérez, F. J., Meza-Arana, C. E., Cruz-Bautista, I., Arellano-Campos, O., ... Aguilar-Salinas, C. A. (2010). Daily physical activity, fasting glucose, uric acid, and body mass index are independent factors associated with serum fibroblast growth factor 21 levels. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 163(3), 469–77. <http://doi.org/10.1530/EJE-10-0454>
- Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdés, P., Meza-Arana, C. E., Brito-Córdova, G., Gómez-Pérez, F. J., Mehta, R., ... Aguilar-Salinas, C. A. (2012). Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. *PLoS One*, 7(5), e38022. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0038022>
- Cui, Y., Giesy, S. L., Hassan, M., Davis, K., Zhao, S., & Boisclair, Y. R. (2014). Hepatic FGF21 production is increased in late pregnancy in the mouse. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative*

Physiology, 307(3), R290–8. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00554.2013>

- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655), 88–91. <http://doi.org/10.1038/36362>
- Dávila-Román, V. G., Vedala, G., Herrero, P., de las Fuentes, L., Rogers, J. G., Kelly, D. P., & Gropler, R. J. (2002). Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(2), 271–7.
- De Bono, J. P. (2005). Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(4), R926–R934. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00694.2005>
- de Castro, J., Sevillano, J., Marciniak, J., Rodriguez, R., González-Martín, C., Viana, M., ... Ramos, M. P. (2011). Implication of low level inflammation in the insulin resistance of adipose tissue at late pregnancy. *Endocrinology*, 152(11), 4094–105. <http://doi.org/10.1210/en.2011-0068>
- DeBosch, B., Sambandam, N., Weinheimer, C., Courtois, M., & Muslin, A. J. (2006). Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32841–51. <http://doi.org/10.1074/jbc.M513087200>
- DeBosch, B., Treskov, I., Lupu, T. S., Weinheimer, C., Kovacs, A., Courtois, M., & Muslin, A. J. (2006). Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*, 113(17), 2097–104. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595231>
- Delarue, J., & Magnan, C. (2007). Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10(2), 142–8. <http://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328042ba90>
- Demarchi, F., Bertoli, C., Sandy, P., & Schneider, C. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39583–90. <http://doi.org/10.1074/jbc.M305676200>
- Deng, C., Sun, Z., Tong, G., Yi, W., Ma, L., Zhao, B., ... Yi, D. (2013). α -Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *PLoS One*, 8(3), e58371. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0058371>
- Dennis, M. K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W. K., Alcon, S. N., Nayak, T. K., ... Prossnitz, E. R. (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 421–427. <http://doi.org/10.1038/nchembio.168>
- Depre, C., Wang, Q., Yan, L., Hedhli, N., Peter, P., Chen, L., ... Madura, K. (2006). Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation*, 114(17), 1821–8. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637827>
- Deschamps, A. M., & Murphy, E. (2009). Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 297(5), H1806–H1813. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00283.2009>
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E., & Schibler, U. (1990). LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes and Development*, 4(9), 1541–1551. <http://doi.org/10.1101/gad.4.9.1541>
- Descombes, P., & Schibler, U. (1991). A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the sam mRNA. *Cell*, 67(3), 569–579. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90531-3](http://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90531-3)
- Di Lisa, F., & Itoh, N. (2015). Cardiac Fgf21 synthesis and release: an autocrine loop for boosting up antioxidant

- defenses in failing hearts. *Cardiovascular Research*, 106(1), 1–3. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvv050>
- Díaz-Delfín, J., Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, M., Caelles, C., & 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(9), 4238–45. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1193>
- Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B. M. M., Bookout, A. L. L., Coate, K. C. C., Mangelsdorf, D. J. J., & Kliewer, S. A. A. (2012). β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism. *Cell Metabolism*, 16(3), 387–393. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.002>
- Dolinsky, V. W., & Dyck, J. R. B. (2006). Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(6), H2557–69. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00329.2006>
- Dorn, G. W. (2007). The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 49(5), 962–70. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.079426>
- Duncan, J. G., & Finck, B. N. (2008). The PPAR α -PGC-1 α Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. *PPAR Research*, 2008, 253817. <http://doi.org/10.1155/2008/253817>
- Dushay, J., Chui, P. C., Gopalakrishnan, G. S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F. M., ... Maratos-Flier, E. (2010). Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 139(2), 456–63. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.054>
- Dutchak, P. A., Katafuchi, T., Bookout, A. L., Choi, J. H., Yu, R. T., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*, 148(3), 556–67. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.062>
- Edwards, B. S., Zimmerman, R. S., Schwab, T. R., Heublein, D. M., & Burnett, J. C. (1988). Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circulation Research*, 62(2), 191–5.
- Edwards, J. G. (2002). Swim training increases ventricular atrial natriuretic factor (ANF) gene expression as an early adaptation to chronic exercise. *Life Sciences*, 70(23), 2753–68.
- Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T. Y., Ruan, H., Wang, Y., ... Stefani, E. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circulation Research*, 96(11), 1208–16. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000170652.71414.16>
- Eghbali, M., Wang, Y., Toro, L., & Stefani, E. (2006). Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16(8), 285–91. <http://doi.org/10.1016/j.tcm.2006.07.001>
- Eisele, P. S., Salatino, S., Sobek, J., Hottiger, M. O., & Handschin, C. (2013). The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2246–60. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.375253>
- Elkayam, U., & Gleicher, N. (1998). *Cardiac Problems in Pregnancy: Diagnosis and Management of Maternal and Fetal Heart Disease*. John Wiley & Sons.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., & Van Obberghen, E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 15985–91.
- Embi, N., Rylatt, D. B., & Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 107(2), 519–27.

- Emerson, K., Saxena, B. N., & Poindexter, E. L. (1972). Caloric cost of normal pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 40(6), 786–94.
- Fajas, L. (2013). Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Frontiers in Oncology*, 3(January), 4. <http://doi.org/10.3389/fonc.2013.00004>
- Fazeli, P. K., Misra, M., Goldstein, M., Miller, K. K., & Klibanski, A. (2010). Fibroblast growth factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(1), 369–74. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-1730>
- Fernández-Millán, E., de Toro-Martín, J., Lizárraga-Mollinedo, E., Escrivá, F., & Álvarez, C. (2013). Role of endogenous IL-6 in the neonatal expansion and functionality of Wistar rat pancreatic alpha cells. *Diabetologia*, 56(5), 1098–107. <http://doi.org/10.1007/s00125-013-2862-8>
- Fiedler, B., Lohmann, S. M., Smolenski, A., Linnemuller, S., Pieske, B., Schroder, F., ... Wollert, K. C. (2002). Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11363–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.162100799>
- Fisher, F. M., Chui, P. C., Antonellis, P. J., Bina, H. a, Kharitononkov, A., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*, 59(11), 2781–9. <http://doi.org/10.2337/db10-0193>
- Fisher, F. M., Estall, J. L., Adams, A. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Flier, J. S., ... Maratos-Flier, E. (2011). Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology*, 152(8), 2996–3004. <http://doi.org/10.1210/en.2011-0281>
- Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., ... Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Development*, 26(3), 271–81. <http://doi.org/10.1101/gad.177857.111>
- Foltz, I. N., Hu, S., King, C., Wu, X., Yang, C., Wang, W., ... Li, Y. (2012). Treating diabetes and obesity with an FGF21-mimetic antibody activating the β Klotho/FGFR1c receptor complex. *Science Translational Medicine*, 4(162), 162ra153. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004690>
- Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., ... Kliewer, S. A. (2010). Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(10), 2050–64. <http://doi.org/10.1210/me.2010-0142>
- Foryst-Ludwig, A., Kreissl, M. C., Sprang, C., Thalke, B., Böhm, C., Benz, V., ... Kintscher, U. (2011). Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 301(1), H115–22. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01222.2010>
- Freund, C., Schmidt-Ullrich, R., Baurand, A., Dunger, S., Schneider, W., Loser, P., ... Bergmann, M. W. (2005). Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation*, 111(18), 2319–25. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000164237.58200.5A>
- Frey, N., & Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual Review of Physiology*, 65, 45–79. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243>
- Friedman, a. D., Landschulz, W. H., & McKnight, S. L. (1989). CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes & Development*, 3(9), 1314–1322. <http://doi.org/10.1101/gad.3.9.1314>

- Frontera, M., Pujol, E., Rodríguez-Cuenca, S., Català-Niell, A., Roca, P., García-Palmer, F. J., & Gianotti, M. (2005). Rat brown adipose tissue thermogenic features are altered during mid-pregnancy. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 15(5), 203–10. <http://doi.org/10.1159/000086407>
- Fruhman, G. J. (1968). Blood Formation in the Pregnant Mouse. *Blood*, 31(2), 242–248.
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., ... Tobe, K. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58(11), 2574–82. <http://doi.org/10.2337/db08-1475>
- Gabbe, S. (2012). *Obstetrics: normal and problem pregnancies*. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Gaich, G., Chien, J. Y., Fu, H., Glass, L. C., Deeg, M. A., Holland, W. L., ... Moller, D. E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, 18(3), 333–40. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.005>
- Gallego-Escuredo, J. M., Gómez-Ambrosi, J., Catalan, V., Domingo, P., Giral, M., Frühbeck, G., & Villarroya, F. (2015). Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *International Journal of Obesity (2005)*, 39(1), 121–9. <http://doi.org/10.1038/ijo.2014.76>
- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitonov, A., Bina, H. A., Eriksson, M., Hafström, I., ... Rudling, M. (2008). The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPAR α activation in man. *Cell Metabolism*, 8(2), 169–74. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.014>
- Gant, N. F., Daley, G. L., Chand, S., Whalley, P. J., & MacDonald, P. C. (1973). A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(11), 2682–9. <http://doi.org/10.1172/JCI107462>
- Garnier, A., Fortin, D., Deloménie, C., Momken, I., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of Physiology*, 551(Pt 2), 491–501. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045104>
- Garrington, T. P., & Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), 211–8.
- Genead, R., Fischer, H., Hussain, A., Jaksch, M., Andersson, A. B., Ljung, K., ... Grinnemo, K.-H. (2012). Ischemia-reperfusion injury and pregnancy initiate time-dependent and robust signs of up-regulation of cardiac progenitor cells. *PLoS One*, 7(5), e36804. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036804>
- Gertz, E. W., Wisneski, J. A., Stanley, W. C., & Neese, R. A. (1988). Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(6), 2017–25. <http://doi.org/10.1172/JCI113822>
- Ghibu, S., Richard, C., Vergely, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Rochette, L. (2009). Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(5), 391–8.
- Ghio, A., Bertolotto, A., Resi, V., Volpe, L., & Di Cianni, G. (2011). Triglyceride metabolism in pregnancy. *Advances in Clinical Chemistry*, 55, 133–53.
- Gilson, G. J., Mosher, M. D., & Conrad, K. P. (1992). Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *The American Journal of Physiology*, 263(6 Pt 2), H1911–8.

- Giralt, A., & Villarroya, F. (2012). SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *The Biochemical Journal*, *444*(1), 1–10. <http://doi.org/10.1042/BJ20120030>
- Giralt, M., Gavaldà-Navarro, A., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.018>
- Goetz, R., Beenken, A., Ibrahim, O. A., Kalinina, J., Olsen, S. K., Eliseenkova, A. V, ... Mohammadi, M. (2007). Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(9), 3417–28. <http://doi.org/10.1128/MCB.02249-06>
- Goetz, R., & Mohammadi, M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(3), 166–80. <http://doi.org/10.1038/nrm3528>
- Gold, A. J., & Yaffe, S. R. (1978). Effects of prolonged starvation on cardiac energy metabolism in the rat. *The Journal of Nutrition*, *108*(3), 410–6.
- Goldstein, J., Sites, C. K., & Toth, M. J. (2004). Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathway. *Fertility and Sterility*, *82*(2), 430–6. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.03.018>
- Gonzalez, A. M. D., Osorio, J. C., Manlhiot, C., Gruber, D., Homma, S., & Mital, S. (2007). Hypertrophy signaling during peripartum cardiac remodeling. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, *293*(5), H3008–H3013. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00401.2007>
- Gonzalez, E., & McGraw, T. E. (2006). Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(10), 4484–93. <http://doi.org/10.1091/mbc.E06-07-0585>
- Gorar, S., Culha, C., Uc, Z. A., Dellal, F. D., Serter, R., Aral, S., & Aral, Y. (2010). Serum fibroblast growth factor 21 levels in polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, *26*(11), 819–26. <http://doi.org/10.3109/09513590.2010.487587>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews. Immunology*, *3*(1), 23–35. <http://doi.org/10.1038/nri978>
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, *32*(5), 593–604. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Gorgoni, B., Maritano, D., Marthyn, P., Righi, M., & Poli, V. (2002). C/EBP beta gene inactivation causes both impaired and enhanced gene expression and inverse regulation of IL-12 p40 and p35 mRNAs in macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *168*(8), 4055–62.
- Gospodarowicz, D. (1974). Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, *249*(453), 123–7.
- Graham, H. K., Horn, M., & Trafford, A. W. (2008). Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *194*(1), 3–21. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01881.x>
- Gray, M. J., Poljakovic, M., Kepka-Lenhart, D., & Morris, S. M. (2005). Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta. *Gene*, *353*(1), 98–106. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2005.04.004>
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., & Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, *78*(3), 783–809.
- Grossman, W., Jones, D., & McLaurin, L. P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left

- ventricle. *The Journal of Clinical Investigation*, 56(1), 56–64. <http://doi.org/10.1172/JCI108079>
- Hacker, H., & Karin, M. (2006). Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Science's STKE*, 2006(357), re13–re13. <http://doi.org/10.1126/stke.3572006re13>
- Hadden, D. R., & McLaughlin, C. (2009). Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 14(2), 66–71. <http://doi.org/10.1016/j.siny.2008.09.004>
- Hale, C., Chen, M. M., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Hager, T., Wang, M., ... Xu, J. (2012). Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology*, 153(1), 69–80. <http://doi.org/10.1210/en.2010-1262>
- Hanada, M., Feng, J., & Hemmings, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1697(1-2), 3–16. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>
- Hanlon, M., & Sealy, L. (1999). Ras regulates the association of serum response factor and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14224–8.
- Haq, S., Choukroun, G., Kang, Z. B., Ranu, H., Matsui, T., Rosenzweig, A., ... Force, T. (2000). Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of Cell Biology*, 151(1), 117–30.
- Haq, S., Kilter, H., Michael, A., Tao, J., O'Leary, E., Sun, X. M., ... Force, T. (2003). Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth. *Nature Medicine*, 9(7), 944–51. <http://doi.org/10.1038/nm891>
- Hardt, S. E., & Sadoshima, J. (2002). Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circulation Research*, 90(10), 1055–63.
- Hardt, S. E., & Sadoshima, J. (2004). Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 63(3), 500–9. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.015>
- Harrison, J. R., Huang, Y.-F., Wilson, K. A., Kelly, P. L., Adams, D. J., Gronowicz, G. A., & Clark, S. H. (2005). Col1a1 promoter-targeted expression of p20 CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta), a truncated C/EBPbeta isoform, causes osteopenia in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8117–24. <http://doi.org/10.1074/jbc.M410076200>
- Harvey, P. A., & Leinwand, L. A. (2011). The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of Cell Biology*, 194(3), 355–65. <http://doi.org/10.1083/jcb.201101100>
- Hataishi, R., Rodrigues, A. C., Morgan, J. G., Ichinose, F., Derumeaux, G., Bloch, K. D., ... Scherrer-Crosbie, M. (2006). Nitric oxide synthase 2 and pressure-overload-induced left ventricular remodeling in mice. *Experimental Physiology*, 91(3), 633–9. <http://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.033068>
- Hatta, K., Carter, A. L., Chen, Z., Leno-Durán, E., Ruiz-Ruiz, C., Olivares, E. G., ... Croy, B. A. (2011). Expression of the vasoactive proteins AT1, AT2, and ANP by pregnancy-induced mouse uterine natural killer cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 18(4), 383–90. <http://doi.org/10.1177/19337191110385136>
- Hattori, K., Nakamura, K., Hisatomi, Y., Matsumoto, S., Suzuki, M., Harvey, R. P., ... Endo, F. (2007). Arrhythmia induced by spatiotemporal overexpression of calreticulin in the heart. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(3), 285–93. <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.02.003>
- Hattori, T., Ohoka, N., Hayashi, H., & Onozaki, K. (2003). C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Letters*, 541(1-3), 33–39. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00283-7](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00283-7)
- Hauguel-de Mouzon, S., & Guerre-Millo, M. (2006). The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta*, 27(8), 794–8. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.08.009>

- Havel, P. J. (2004). Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*, *53 Suppl 1*, S143–51.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, *18*(18), 2195–224. <http://doi.org/10.1101/gad.1228704>
- He, Z. (2004). Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, *287*(3), E424–E430. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00568.2003>
- Hedhli, N., Lizano, P., Hong, C., Fritzky, L. F., Dhar, S. K., Liu, H., ... Depre, C. (2008). Proteasome inhibition decreases cardiac remodeling after initiation of pressure overload. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *295*(4), H1385–93. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00532.2008>
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(8), 589–600. <http://doi.org/10.1038/nrm1983>
- Heineke, J., Ruetten, H., Willenbockel, C., Gross, S. C., Naguib, M., Schaefer, A., ... Wollert, K. C. (2005). Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(5), 1655–60. <http://doi.org/10.1073/pnas.0405488102>
- Heini, A., Schutz, Y., & Jequier, E. (1992). Twenty-four-hour energy expenditure in pregnant and nonpregnant Gambian women, measured in a whole-body indirect calorimeter. *Am J Clin Nutr*, *55*(6), 1078–1085.
- Herman, D. S., Lam, L., Taylor, M. R. G., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., ... Seidman, C. E. (2012). Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, *366*(7), 619–628. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>
- Herrera, E. (1986). *Bioquímica Perinatal*. Madrid: Fundación Ramón Areces.
- Herrera, E. (2002). Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine*, *19*(1), 43–55. <http://doi.org/10.1385/ENDO:19:1:43>
- Herrera, E., Knopp, R. H., & Freinkel, N. (1969). Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *The Journal of Clinical Investigation*, *48*(12), 2260–72. <http://doi.org/10.1172/JCI106192>
- Herrero, P., Soto, P. F., Dence, C. S., Kisrieva-Ware, Z., Delano, D. A., Peterson, L. R., & Gropler, R. J. Impact of hormone replacement on myocardial fatty acid metabolism: potential role of estrogen. *Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, *12*(5), 574–81. <http://doi.org/10.1016/j.nuclcard.2005.05.009>
- Higuchi, Y., Otsu, K., Nishida, K., Hirotani, S., Nakayama, H., Yamaguchi, O., ... Hori, M. (2002). Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *34*(2), 233–40. <http://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1505>
- Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., ... Drexler, H. (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell*, *128*(3), 589–600. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.036>
- Hill, J. A., Rothermel, B., Yoo, K.-D., Cabuay, B., Demetroulis, E., Weiss, R. M., ... Williams, R. S. (2002). Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(12), 10251–5. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110722200>

- Hirofani, S., Otsu, K., Nishida, K., Higuchi, Y., Morita, T., Nakayama, H., ... Hori, M. (2002). Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation*, *105*(4), 509–15.
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., ... Verdin, E. (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, *464*(7285), 121–5. <http://doi.org/10.1038/nature08778>
- Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., & Woodgett, J. R. (2000). Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*, *406*(6791), 86–90. <http://doi.org/10.1038/35017574>
- Hondares, E., Iglesias, R., Giral, A., Gonzalez, F. J., Giral, M., Mampel, T., & Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(15), 12983–90. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.215889>
- Hondares, E., Rosell, M., Gonzalez, F. J., Giral, M., Iglesias, R., & Villarroya, F. (2010). Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metabolism*, *11*(3), 206–12. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.001>
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F., & Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5249), 665–8.
- Hotamisligil, G. S., & Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, *43*(11), 1271–8.
- Hu, H. M., Baer, M., Williams, S. C., Johnson, P. F., & Schwartz, R. C. (1998). Redundancy of C/EBP α , β , and δ in Supporting the Lipopolysaccharide-Induced Transcription of IL-6 and Monocyte Chemoattractant Protein-1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*(5), 2334–2342.
- Hu, H. M., Tian, Q., Baer, M., Spooner, C. J., Williams, S. C., Johnson, P. F., & Schwartz, R. C. (2000). The C/EBP bZIP domain can mediate lipopolysaccharide induction of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(21), 16373–81. <http://doi.org/10.1074/jbc.M910269199>
- Huang, G. N., Thatcher, J. E., McAnally, J., Kong, Y., Qi, X., Tan, W., ... Olson, E. N. (2012). C/EBP Transcription Factors Mediate Epicardial Activation During Heart Development and Injury. *Science*, *338*(6114), 1599–1603. <http://doi.org/10.1126/science.1229765>
- Huang, J., Ishino, T., Chen, G., Rolzin, P., Osothprarop, T. F., Retting, K., ... Levin, N. (2013). Development of a novel long-acting antidiabetic FGF21 mimetic by targeted conjugation to a scaffold antibody. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *346*(2), 270–80. <http://doi.org/10.1124/jpet.113.204420>
- Huss, J. M., & Kelly, D. P. (2004). Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circulation Research*, *95*(6), 568–78. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3>
- Hytten, F. E., & Leitch, I. (1971). *The physiology of human pregnancy*.
- Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T., Kasuya, Y., & Miyauchi, T. (2006). Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *101*(1), 151–63. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00392.2005>

- Iemitsu, M., Maeda, S., Miyauchi, T., Matsuda, M., & Tanaka, H. (2005). Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, *185*(4), 259–270. <http://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2005.01494.x>
- Iizuka, K., Takeda, J., & Horikawa, Y. (2009). Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Letters*, *583*(17), 2882–6. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.053>
- Imai-Matsumara, K., Matsumura, K., Morimoto, A., & Nakayama, T. (1990). Suppression of cold-induced thermogenesis in full-term pregnant rats. *The Journal of Physiology*, *425*, 271–81.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., ... Kliewer, S. a. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metabolism*, *5*(6), 415–425. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.003>
- Inagaki, T., Lin, V. Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2008). Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metabolism*, *8*(1), 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.05.006>
- Iorga, A., Dewey, S., Partow-Navid, R., Gomes, A. V, & Eghbali, M. (2012). Pregnancy is associated with decreased cardiac proteasome activity and oxidative stress in mice. *PloS One*, *7*(11), e48601. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048601>
- Itoh, N. (2010). Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell and Tissue Research*, *342*(1), 1–11. <http://doi.org/10.1007/s00441-010-1024-2>
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics : TIG*, *20*(11), 563–9. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.007>
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Developmental Dynamics*, *237*(1), 18–27. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21388>
- Itoh, N., & Ornitz, D. M. (2011). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *Journal of Biochemistry*, *149*(2), 121–30. <http://doi.org/10.1093/jb/mvq121>
- Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitononkov, A., & Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Letters*, *582*(27), 3805–10. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.021>
- Jaba, I. M., Zhuang, Z. W., Li, N., Jiang, Y., Martin, K. A., Sinusas, A. J., ... Tirziu, D. (2013). NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(4), 1718–31. <http://doi.org/10.1172/JCI65112>
- Jacobs, M. D., & Harrison, S. C. (1998). Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell*, *95*(6), 749–58.
- Jalili, T., Takeishi, Y., & Walsh, R. A. (1999). Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC. *Cardiovascular Research*, *44*(1), 5–9.
- Johnson, D. E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., & 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. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(9), 4627–34.
- Johnston, R. K., Balasubramanian, S., Kasiganesan, H., Baicu, C. F., Zile, M. R., & Kuppaswamy, D. (2009). Beta3 integrin-mediated ubiquitination activates survival signaling during myocardial hypertrophy. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(8), 2759–71. <http://doi.org/10.1096/fj.08-127480>
- Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Ito, M., Matsuo, K., ... Ouchi, N. (2015). FGF21 attenuates pathological

- myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(1), 124–30. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.081>
- Kaiser, R. A., Liang, Q., Bueno, O., Huang, Y., Lackey, T., Klevitsky, R., ... Molkenin, J. D. (2005). Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32602–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M500684200>
- Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogórek, B., ... Anversa, P. (2010). Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circulation Research*, 107(2), 305–15. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223024>
- Kalhan, S. C. (2000). Protein metabolism in pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 71(5), 1249S–1255.
- Kalhan, S. C., Rossi, K. Q., Gruca, L. L., Super, D. M., & Savin, S. M. (1998). Relation between transamination of branched-chain amino acids and urea synthesis: evidence from human pregnancy. *The American Journal of Physiology*, 275(3 Pt 1), E423–31.
- Karin, M. (1999a). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18(49), 6867–74. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1203219>
- Karin, M. (1999b). The Beginning of the End: I B Kinase (IKK) and NF- B Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27339–27342. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27339>
- Karpanen, T., Bry, M., Ollila, H. M., Seppänen-Laakso, T., Liimatta, E., Leskinen, H., ... Alitalo, K. (2008). Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circulation Research*, 103(9), 1018–26. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178459>
- Kawano, S., Kubota, T., Monden, Y., Kawamura, N., Tsutsui, H., Takeshita, A., & Sunagawa, K. (2005). Blockade of NF-kappaB ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Cardiovascular Research*, 67(4), 689–98. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.030>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–56. <http://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kharitonkov, A., Beals, J. M., Micanovic, R., Striffler, B. A., Rathnachalam, R., Wroblewski, V. J., ... Moller, D. E. (2013). Rational Design of a Fibroblast Growth Factor 21-Based Clinical Candidate, LY2405319. *PLoS ONE*, 8(3), e58575. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0058575>
- Kharitonkov, A., Dunbar, J. D., Bina, H. A., Bright, S., Moyers, J. S., Zhang, C., ... Shanafelt, A. B. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), 1–7. <http://doi.org/10.1002/jcp.21357>
- Kharitonkov, A., & Larsen, P. (2011). FGF21 reloaded: challenges of a rapidly growing field. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 22(3), 81–6. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.003>
- Kharitonkov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., ... Shanafelt, A. B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1627–35. <http://doi.org/10.1172/JCI23606>
- Kharitonkov, A., Wroblewski, V. J., Koester, A., Chen, Y.-F., Clutinger, C. K., Tigno, X. T., ... Etgen, G. J. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 148(2), 774–81. <http://doi.org/10.1210/en.2006-1168>
- Kho, C., Lee, A., Jeong, D., Oh, J. G., Chaanine, A. H., Kizana, E., ... Hajjar, R. J. (2011). SUMO1-dependent modulation

of SERCA2a in heart failure. *Nature*, 477(7366), 601–5. <http://doi.org/10.1038/nature10407>

- Kikuchi, K., Gupta, V., Wang, J., Holdway, J. E., Wills, A. A., Fang, Y., & Poss, K. D. (2011). tcf21+ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development*, 138(14), 2895–2902. <http://doi.org/10.1242/dev.067041>
- Kikuchi, K., Holdway, J. E., Werdich, A. A., Anderson, R. M., Fang, Y., Egnaczyk, G. F., ... Poss, K. D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4+ cardiomyocytes. *Nature*, 464(7288), 601–605. <http://doi.org/10.1038/nature08804>
- Kim, K. H., Kim, S. H., Min, Y.-K., Yang, H.-M., Lee, J.-B., & Lee, M.-S. (2013). Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans. *PloS One*, 8(5), e63517. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063517>
- Kimura, T., Christoffels, V. M., Chowdhury, S., Iwase, K., Matsuzaki, H., Mori, M., ... Takiguchi, M. (1998). Hypoglycemia-associated Hyperammonemia Caused by Impaired Expression of Ornithine Cycle Enzyme Genes in C/EBP Knockout Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27505–27510. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27505>
- King, J. C. (2000). Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr*, 71(5), 1218S–1225S.
- Kinnunen, P., Vuolteenaho, O., & Ruskoaho, H. (1993). Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology*, 132(5), 1961–1970. <http://doi.org/10.1210/endo.132.5.8477647>
- Kirwan, J. P., Hauguel-De Mouzon, S., Lepercq, J., Challier, J.-C., Huston-Presley, L., Friedman, J. E., ... Catalano, P. M. (2002). TNF- α Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy. *Diabetes*, 51(7), 2207–2213. <http://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2207>
- Kliwer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2010). Fibroblast growth factor 21: from pharmacology to physiology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(1), 254S–257S. <http://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28449B>
- Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M.-L., ... Chien, K. R. (2002). The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*, 111(7), 943–55.
- Kohler, J. J., Metallo, S. J., Schneider, T. L., & Schepartz, a. (1999). DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 11735–11739. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11735>
- Kohler, J. J., & Schepartz, a. (2001). Kinetic studies of Fos/Jun DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization. *Biochemistry*, 40(1), 130–142. <http://doi.org/10.1021/bi001881p>
- Kolwicz, S. C., Olson, D. P., Marney, L. C., Garcia-Menendez, L., Synovec, R. E., & Tian, R. (2012). Cardiac-specific deletion of acetyl CoA carboxylase 2 prevents metabolic remodeling during pressure-overload hypertrophy. *Circulation Research*, 111(6), 728–38. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268128>
- Kolwicz, S. C., Purohit, S., & Tian, R. (2013). Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circulation Research*, 113(5), 603–616. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302095>
- Kolwicz, S. C., & Tian, R. (2011). Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 90(2), 194–201. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvr071>
- Kondo, E., Sugiyama, T., Kusaka, H., & Toyoda, N. (2004). Adiponectin mRNA levels in parametrial adipose tissue and serum adiponectin levels are reduced in mice during late pregnancy. *Hormone and Metabolic Research* =

- Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme*, 36(7), 465–9. <http://doi.org/10.1055/s-2004-825726>
- Konhilas, J. P., Maass, A. H., Luckey, S. W., Stauffer, B. L., Olson, E. N., & Leinwand, L. A. (2004). Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(6), H2768–76. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00292.2004>
- Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S., & Leutz, A. (1994). Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes & Development*, 8(22), 2781–91.
- Kristiansen, O. P., & Mandrup-Poulsen, T. (2005). Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*, 54 Suppl 2, S114–24.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Kubota, T., Kumagai, H., Itoh, S., Satoh, H., ... Kadowaki, T. (2006). Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8748–55. <http://doi.org/10.1074/jbc.M505649200>
- Kulandavelu, S., Qu, D., & Adamson, S. L. (2006). Cardiovascular function in mice during normal pregnancy and in the absence of endothelial NO synthase. *Hypertension*, 47(6), 1175–82. <http://doi.org/10.1161/01.HYP.0000218440.71846.db>
- Kuro-o, M. (2008). Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19(7), 239–245. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2008.06.002>
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., ... Kuro-o, M. (2007). Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26687–95. <http://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>
- Kuwahara, K., Saito, Y., Takano, M., Arai, Y., Yasuno, S., Nakagawa, Y., ... Nakao, K. (2003). NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *The EMBO Journal*, 22(23), 6310–21. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg601>
- Lain, K. Y., & Catalano, P. M. (2007). Metabolic changes in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 50(4), 938–48. <http://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31815a5494>
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J., & McKnight, S. L. (1988). Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes & Development*, 2(7), 786–800. <http://doi.org/10.1101/gad.2.7.786>
- Lawrence, T., & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 750–761. <http://doi.org/10.1038/nri3088>
- Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M., & Ratan, R. R. (2003). Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4843–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0735876100>
- Lee, P., Linderman, J., Smith, S., Brychta, R. J., Perron, R., Idelson, C., ... Celi, F. S. (2013). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) and bone: is there a relationship in humans? *Osteoporosis International*, 24(12), 3053–3057. <http://doi.org/10.1007/s00198-013-2464-9>
- Lee, S. A., Jeong, E., Kim, E. H., Shin, M.-S., Hwang, J. Y., Koh, E. H., ... Kim, M.-S. (2012). Various Oscillation Patterns of Serum Fibroblast Growth Factor 21 Concentrations in Healthy Volunteers. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(1), 29. <http://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.1.29>
- Lee, Y. H., Sauer, B., Johnson, P. F., & Gonzalez, F. J. (1997). Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver.

Molecular and Cellular Biology, 17(10), 6014–22.

- Legraverend, C., Antonson, P., Flodby, P., & Xanthopoulos, K. G. (1993). High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 21(8), 1735–42.
- Lehman, J. J., Barger, P. M., Kovacs, A., Saffitz, J. E., Medeiros, D. M., & Kelly, D. P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(7), 847–56. <http://doi.org/10.1172/JCI10268>
- Lehman, J. J., & Kelly, D. P. (2002a). Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Failure Reviews*, 7(2), 175–85.
- Lehman, J. J., & Kelly, D. P. (2002b). Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 29(4), 339–45.
- Leibel, B. (1965). *On the nature and treatment of diabets*. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation.
- Lemmens, K., Doggen, K., & De Keulenaer, G. W. (2011). Activation of the neuregulin/ErbB system during physiological ventricular remodeling in pregnancy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 300(3), H931–42. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00385.2010>
- Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G., & Poss, K. D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 127(3), 607–19. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.052>
- Lescaudron, L., Peltékian, E., Fontaine-Pérus, J., Paulin, D., Zampieri, M., Garcia, L., & Parrish, E. (1999). Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 9(2), 72–80.
- Leturque, A., Ferre, P., Burnol, A.-F., Kande, J., Maulard, P., & Girard, J. (1986). Glucose Utilization Rates and Insulin Sensitivity In Vivo in Tissues of Virgin and Pregnant Rats. *Diabetes*, 35(2), 172–177. <http://doi.org/10.2337/diab.35.2.172>
- Li, C., Lv, L., Li, H., & Yu, D. (2012). Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. *Cardiovascular Diabetology*, 11, 73. <http://doi.org/10.1186/1475-2840-11-73>
- Li, H., Fang, Q., Gao, F., Fan, J., Zhou, J., Wang, X., ... Jia, W. (2010). Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *Journal of Hepatology*, 53(5), 934–40. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.018>
- Li, J., Umar, S., Iorga, A., Youn, J.-Y., Wang, Y., Regitz-Zagrosek, V., ... Eghbali, M. (2012). Cardiac vulnerability to ischemia/reperfusion injury drastically increases in late pregnancy. *Basic Research in Cardiology*, 107(4), 271. <http://doi.org/10.1007/s00395-012-0271-7>
- Li, Y., Ha, T., Gao, X., Kelley, J., Williams, D. L., Browder, I. W., ... Li, C. (2004). NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), H1712–20. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00124.2004>
- Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A. S., & Reid, M. B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 285(4), C806–12. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00129.2003>
- Liang, Q., Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Kuan, C.-Y., Xia, Y., & Molkentin, J. D. (2003). c-Jun N-terminal kinases (JNK)

- antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *The EMBO Journal*, 22(19), 5079–89. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg474>
- Liao, P., Georgakopoulos, D., Kovacs, A., Zheng, M., Lerner, D., Pu, H., ... Wang, Y. (2001). The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12283–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.211086598>
- Limana, F., Bertolami, C., Mangoni, A., Di Carlo, A., Avitabile, D., Mocini, D., ... Capogrossi, M. C. (2010). Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(4), 609–18. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.11.008>
- Lin, F. T., MacDougald, O. A., Diehl, A. M., & Lane, M. D. (1993). A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20), 9606–10.
- Lin, Z., Wu, Z., Yin, X., Liu, Y., Yan, X., Lin, S., ... Li, X. (2010). Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PLoS One*, 5(12), e15534. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015534>
- Lindhard, J. (1915). Über das Minutenvolum des Herzens bei Ruhe und bei Muskelarbeit. *Pflüger's Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*, 161(5-7), 233–383. <http://doi.org/10.1007/BF01681245>
- Linke, W. A. (2008). Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular Research*, 77(4), 637–48. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.029>
- Liu, L. X., & Arany, Z. (2014). Maternal cardiac metabolism in pregnancy. *Cardiovascular Research*, 101(4), 545–53. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvu009>
- Liu, Q., Du, G. Q., Zhu, Z. T., Zhang, C., Sun, X. W., Liu, J. J., ... Du, W. J. (2015). Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts. *Journal of Translational Medicine*, 13, 270. <http://doi.org/10.1186/s12967-015-0603-0>
- Liu, R., Ramani, B., Soto, D., De Arcangelis, V., & Xiang, Y. (2009). Agonist dose-dependent phosphorylation by protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase regulates beta2 adrenoceptor coupling to G(i) proteins in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(47), 32279–87. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.021428>
- Liu, S. Q., Roberts, D., Kharitonov, A., Zhang, B., Hanson, S. M., Li, Y. C., ... Wu, Y. H. (2013). Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Scientific Reports*, 3(SEPTEMBER), 2767. <http://doi.org/10.1038/srep02767>
- Liu, S. Q., Tefft, B. J., Zhang, D., Roberts, D., Schuster, D. J., & Wu, A. (2011). Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia. *Molecular & Cellular Biomechanics : MCB*, 8(4), 319–38.
- Liu, S. Q., Tefft, B., Kharitonov, A., Ren, Y., Zhang, L.-Q., & Wu, Y. H. (2011). Abstract P278: Fibroblast Growth Factor 21 Mediated Protection of Ischemic Myocardium. *Circulation Research*, 109(12 Supplement).
- Liu, S. Q., & Wu, Y. H. (2010). Liver cell-mediated alleviation of acute ischemic myocardial injury. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2, 711–24.
- Llorca, C. M., Potschin, M., & Zentgraf, U. (2014). bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in Plant Science*, 5, 169. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00169>
- Longo, L. D. (1983). Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic

control. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 245(5), R720–729.

- Lu, Y.-C., Kim, I., Lye, E., Shen, F., Suzuki, N., Suzuki, S., ... Ohashi, P. S. (2009). Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11), 7212–21. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0802971>
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175–84. <http://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Lundåsen, T., Hunt, M. C., Nilsson, L.-M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S. E. H., & Rudling, M. (2007). PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 437–440. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.068>
- MacDonald, C., Wojtaszewski, J. F. P., Pedersen, B. K., Kiens, B., & Richter, E. A. (2003). Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 95(6), 2273–7. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00242.2003>
- Mahony, S., Auron, P. E., & Benos, P. V. (2007). DNA Familial Binding Profiles Made Easy: Comparison of Various Motif Alignment and Clustering Strategies. *PLoS Computational Biology*, 3(3), e61. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030061>
- Mai, K., Andres, J., Biedasek, K., Weicht, J., Bobbert, T., Sabath, M., ... Spranger, J. (2009). Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing fibroblast growth factor-21. *Diabetes*, 58(7), 1532–8. <http://doi.org/10.2337/db08-1775>
- Maillet, M., van Berlo, J. H., & Molkentin, J. D. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), 38–48. <http://doi.org/10.1038/nrm3495>
- Malik, F. I., Hartman, J. J., Elias, K. A., Morgan, B. P., Rodriguez, H., Brejc, K., ... Morgans, D. J. (2011). Cardiac Myosin Activation: A Potential Therapeutic Approach for Systolic Heart Failure. *Science*, 331(6023), 1439–1443. <http://doi.org/10.1126/science.1200113>
- Mampel, T., Villarroya, F., & Herrera, E. (1985). Hepatectomy-nephrectomy effects in the pregnant rat and fetus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131(3), 1219–25.
- Mann, D. L. (2002). Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *Journal of Cardiac Failure*, 8(6 Suppl), S379–86. <http://doi.org/10.1054/jcaf.2002.129253>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, 229(2), 176–85. <http://doi.org/10.1002/path.4133>
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23(11), 549–55.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., & Hamill, O. P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology*, 7(2), 179–85. <http://doi.org/10.1038/ncb1218>
- Martin, I., Giralt, M., Viñas, O., Iglesias, R., Mampel, T., & Villarroya, F. (1989). Adaptative decrease in expression of the mRNA for uncoupling protein and subunit II of cytochrome c oxidase in rat brown adipose tissue during pregnancy and lactation. *The Biochemical Journal*, 263(3), 965–8.
- Martin, U., Davies, C., Hayavi, S., Hartland, A., & Dunne, F. (1999). Is normal pregnancy atherogenic? *Clinical Science (London, England : 1979)*, 96(4), 421–5.

- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Roseblit, N., & Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, *101*(4), 365–76.
- Mason, I. (2007). Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(8), 583–96. <http://doi.org/10.1038/nrn2189>
- Matsuda, T., Kido, Y., Asahara, S., Kaisho, T., Tanaka, T., Hashimoto, N., ... Kasuga, M. (2010). Ablation of C/EBPbeta alleviates ER stress and pancreatic beta cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(1), 115–26. <http://doi.org/10.1172/JCI39721>
- McCormack, J. T., & Greenwald, G. S. (1974). Progesterone and oestradiol-17 concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *Journal of Endocrinology*, *62*(1), 101–107. <http://doi.org/10.1677/joe.0.0620101>
- McKnight, S. L., Lane, M. D., & Gluecksohn-Waelsch, S. (1989). Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism? *Genes & Development*, *3*(12B), 2021–4.
- McMullen, J. R., & Jennings, G. L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *34*(4), 255–62. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04585.x>
- McMurray, J. J. V., & Pfeffer, M. A. Heart failure. *Lancet (London, England)*, *365*(9474), 1877–89. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66621-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66621-4)
- Meier, H., Bullinger, J., Marx, G., Deten, A., Horn, L.-C., Ressler, B., ... Briest, W. (2009). Crucial role of interleukin-6 in the development of norepinephrine-induced left ventricular remodeling in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *23*(4-6), 327–34. <http://doi.org/10.1159/000218180>
- Menéndez-Hurtado, A., Santos, A., & Pérez-Castillo, A. (2000). Characterization of the promoter region of the rat CCAAT/enhancer-binding protein alpha gene and regulation by thyroid hormone in rat immortalized brown adipocytes. *Endocrinology*, *141*(11), 4164–70. <http://doi.org/10.1210/endo.141.11.7756>
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., ... Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science (New York, N.Y.)*, *278*(5339), 860–6.
- Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K. H., ... Michalak, M. (1999). Calreticulin is essential for cardiac development. *The Journal of Cell Biology*, *144*(5), 857–68.
- Metallo, S. J., & Schepartz, A. (1994). Distribution of labor among bZIP segments in the control of DNA affinity and specificity. *Chemistry & Biology*, *1*(3), 143–51.
- Metallo, S. J., & Schepartz, A. (1997). Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nature Structural Biology*, *4*(2), 115–7.
- Micanovic, R., Raches, D. W., Dunbar, J. D., Driver, D. A., Bina, H. A., Dickinson, C. D., & Kharitonov, A. (2009). Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21. *Journal of Cellular Physiology*, *219*(2), 227–234. <http://doi.org/10.1002/jcp.21675>
- Ming, A. Y. K., Yoo, E., Vorontsov, E. N., Altamentova, S. M., Kilkenny, D. M., & Rocheleau, J. V. (2012). Dynamics and Distribution of Klotho β (KLB) and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) in living cells reveal the fibroblast growth factor-21 (FGF21)-induced receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 19997–20006. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.325670>

- Moertl, D., Berger, R., Struck, J., Gleiss, A., Hammer, A., Morgenthaler, N. G., ... Pacher, R. (2009). Comparison of midregional pro-atrial and B-type natriuretic peptides in chronic heart failure: influencing factors, detection of left ventricular systolic dysfunction, and prediction of death. *Journal of the American College of Cardiology*, *53*(19), 1783–90. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.01.057>
- Mohammadi, M., Olsen, S. K., & Ibrahim, O. A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *16*(2), 107–37. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.008>
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*, *63*(3), 467–75. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.021>
- Molkentin, J. D., & Dorn, G. W. (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual Review of Physiology*, *63*, 391–426. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.391>
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., ... Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, *93*(2), 215–28.
- Moller, D. E. (2012). Metabolic disease drug discovery- “hitting the target” is easier said than done. *Cell Metabolism*, *15*(1), 19–24. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.012>
- Morisco, C., Seta, K., Hardt, S. E., Lee, Y., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2001). Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(30), 28586–97. <http://doi.org/10.1074/jbc.M103166200>
- Morisco, C., Zebrowski, D., Condorelli, G., Tschlis, P., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2000). The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(19), 14466–75.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T., & Rennert, P. (2003). NF-kappaB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. *EMBO Reports*, *4*(1), 31–6. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.embor704>
- Moyers, J. S., Shiyanova, T. L., Mehrbod, F., Dunbar, J. D., Noblitt, T. W., Otto, K. A., ... Kharitonov, A. (2007). Molecular determinants of FGF-21 activity—synergy and cross-talk with PPAR γ signaling. *Journal of Cellular Physiology*, *210*(1), 1–6. <http://doi.org/10.1002/jcp.20847>
- Mu, J., Pinkstaff, J., Li, Z., Skidmore, L., Li, N., Myler, H., ... Axelrod, D. W. (2012). FGF21 analogs of sustained action enabled by orthogonal biosynthesis demonstrate enhanced antidiabetic pharmacology in rodents. *Diabetes*, *61*(2), 505–12. <http://doi.org/10.2337/db11-0838>
- Muise, E. S., Azzolina, B., Kuo, D. W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., ... Wong, K. K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Molecular Pharmacology*, *74*(2), 403–12. <http://doi.org/10.1124/mol.108.044826>
- Murr, S. M., Stabenfeldt, G. H., Bradford, G. E., & Geschwind, I. I. (1974). Plasma progesterone during pregnancy in the mouse. *Endocrinology*, *94*(4), 1209–11. <http://doi.org/10.1210/endo-94-4-1209>
- Murray, D. R., Prabhu, S. D., & Chandrasekar, B. (2000). Chronic β -Adrenergic Stimulation Induces Myocardial Proinflammatory Cytokine Expression. *Circulation*, *101*(20), 2338–2341. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.101.20.2338>
- Murray, P. J. (2005). The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(24), 8686–91. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500419102>
- Musarò, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N., & Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte

- hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*, 400(6744), 581–5. <http://doi.org/10.1038/23060>
- Naeye, R. L., & Chez, R. A. (1981). Effects of maternal acetonuria and low pregnancy weight gain on children's psychomotor development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139(2), 189–93.
- Nag, A. C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, 28(109), 41–61.
- Naga Prasad, S. V., Perrino, C., & Rockman, H. A. (2003). Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac function and heart failure. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(5), 206–12.
- Nakamura, K., Fushimi, K., Kouchi, H., Mihara, K., Miyazaki, M., Ohe, T., & Namba, M. (1998). Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation*, 98(8), 794–9.
- Nakamura, K., Robertson, M., Liu, G., Dickie, P., Guo, J. Q., Duff, H. J., ... Michalak, M. (2001). Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(10), 1245–53. <http://doi.org/10.1172/JCI12412>
- Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Tomas, E., Pajvani, U. B., Saha, A. K., Trumbauer, M. E., ... Scherer, P. E. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2654–60. <http://doi.org/10.1074/jbc.M505311200>
- Neri Seneri, G. G., Boddi, M., Modesti, P. A., Cecioni, I., Coppo, M., Padeletti, L., ... Galanti, G. (2001). Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circulation Research*, 89(11), 977–82.
- Nerlov, C. (2008). C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 180–185. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.02.002>
- Nerlov, C. (2010). Transcriptional and translational control of C/EBPs: The case for “deep” genetics to understand physiological function. *BioEssays*, 32(8), 680–686. <http://doi.org/10.1002/bies.201000004>
- Nerlov, C., & Ziff, E. B. (1995). CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *The EMBO Journal*, 14(17), 4318–28.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart—an engine out of fuel. *The New England Journal of Medicine*, 356(11), 1140–51. <http://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Nicol, R. L., Frey, N., & Olson, E. N. (2000). From the sarcomere to the nucleus: role of genetics and signaling in structural heart disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, 179–223. <http://doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.179>
- Niehof, M., Kubicka, S., Zender, L., Manns, M. P., & Trautwein, C. (2001). Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) transcription. *Journal of Molecular Biology*, 309(4), 855–68. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4708>
- Niehof, M., Manns, M. P., & Trautwein, C. (1997). CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 3600–13.
- Nieuwenhuizen, A. G., Schuiling, G. A., Bonen, A., Paans, A. M., Vaalburg, W., & Koiter, T. R. (1998). Glucose consumption by various tissues in pregnant rats: effects of a 6-day euglycaemic hyperinsulinaemic clamp. *Acta*

Physiologica Scandinavica, 164(3), 325–34. <http://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00430.x>

- Nishida, K., Yamaguchi, O., Hirotsu, S., Hikoso, S., Higuchi, Y., Watanabe, T., ... Otsu, K. (2004). p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), 10611–20. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10611-10620.2004>
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492(1), 203–6.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., ... Carruba, M. O. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 314–7. <http://doi.org/10.1126/science.1117728>
- Niu, X., Renshaw-Gegg, L., Miller, L., & Guiltinan, M. J. (1999). Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Molecular Biology*, 41(1), 1–13.
- Novak, K., & Kaufman, S. (1991). Effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on pressor responsiveness to angiotensin II. *The American Journal of Physiology*, 261(5 Pt 2), R1164–70.
- Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Goetz, R., ... Kuro-o, M. (2007). BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7432–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0701600104>
- Olson, E. N. (2004). A decade of discoveries in cardiac biology. *Nature Medicine*, 10(5), 467–74. <http://doi.org/10.1038/nm0504-467>
- Olson, E. N., & Williams, R. S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell*, 101(7), 689–92.
- Oosting, A., Verkade, H. J., Kegler, D., van de Heijning, B. J. M., & van der Beek, E. M. (2015). Rapid and selective manipulation of milk fatty acid composition in mice through the maternal diet during lactation. *Journal of Nutritional Science*, 4, e19. <http://doi.org/10.1017/jns.2015.13>
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 2(3), REVIEWS3005.
- Ortega, R. M., Gaspar, M. J., & Cantero, M. (1996). Influence of maternal serum lipids and maternal diet during the third trimester of pregnancy on umbilical cord blood lipids in two populations of Spanish newborns. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Für Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 66(3), 250–7.
- Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., & Imagawa, M. (1996). DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3891–6.
- Ossipow, V., Descombes, P., & Schibler, U. (1993). CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8219–23.
- Ostadal, B., Ostadalova, I., & Dhalla, N. S. (1999). Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiological Reviews*, 79(3), 635–59.
- Otsuka, K., Terasaki, F., Shimomura, H., Tsukada, B., Horii, T., Isomura, T., ... Kitaura, Y. (2010). Enhanced expression of the ubiquitin-proteasome system in the myocardium from patients with dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: an immunohistochemical study with special reference to oxidative stress. *Heart and Vessels*, 25(6), 474–84. <http://doi.org/10.1007/s00380-010-0006-3>
- Oudit, G. Y., Sun, H., Kerfant, B.-G., Crackower, M. A., Penninger, J. M., & Backx, P. H. (2004). The role of

- phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(2), 449–71. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.015>
- Oulion, S., Bertrand, S., & Escriva, H. (2012). Evolution of the FGF Gene Family. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2012/298147>
- Owen, B. M., Bookout, A. L., Ding, X., Lin, V. Y., Atkin, S. D., Gautron, L., ... Mangelsdorf, D. J. (2013). FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nature Medicine*, 19(9), 1153–6. <http://doi.org/10.1038/nm.3250>
- Pairault, J., & Green, H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5138–42.
- Palomer, X., Capdevila-Busquets, E., Botteri, G., Davidson, M. M., Rodríguez, C., Martínez-González, J., ... Vázquez-Carrera, M. (2015). miR-146a targets Fos expression in human cardiac cells. *Disease Models & Mechanisms*, 8(9), 1081–91. <http://doi.org/10.1242/dmm.020768>
- Palomer, X., Capdevila-Busquets, E., Botteri, G., Salvadó, L., Barroso, E., Davidson, M. M., ... Vázquez-Carrera, M. (2014). PPAR β/δ attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and induces autophagic markers in human cardiac cells. *International Journal of Cardiology*, 174(1), 110–8. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.03.176>
- Patel, A., Sharif-Naeini, R., Folgering, J. R. H., Bichet, D., Duprat, F., & Honoré, E. (2010). Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 460(3), 571–81. <http://doi.org/10.1007/s00424-010-0847-8>
- Patel, V., Adya, R., Chen, J., Ramanjaneya, M., Bari, M. F., Bhudia, S. K., ... Randeva, H. S. (2014). Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One*, 9(2), e87102. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087102>
- Paur, H., Wright, P. T., Sikkil, M. B., Tranter, M. H., Mansfield, C., O’Gara, P., ... Harding, S. E. (2012). High levels of circulating epinephrine trigger apical cardiodepression in a β 2-adrenergic receptor/Gi-dependent manner: a new model of Takotsubo cardiomyopathy. *Circulation*, 126(6), 697–706. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.111591>
- Pazos, P., Lima, L., Casanueva, F. F., Diéguez, C., & García, M. C. (2013). Interleukin 6 deficiency modulates the hypothalamic expression of energy balance regulating peptides during pregnancy in mice. *PLoS One*, 8(8), e72339. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072339>
- Pedram, A., Razandi, M., Lubahn, D., Liu, J., Vannan, M., & Levin, E. R. (2008). Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology*, 149(7), 3361–9. <http://doi.org/10.1210/en.2008-0133>
- Pei, D. Q., & Shih, C. H. (1991). An “attenuator domain” is sandwiched by two distinct transactivation domains in the transcription factor C/EBP. *Molecular and Cellular Biology*, 11(3), 1480–7.
- Peng, X., Kraus, M. S., Wei, H., Shen, T.-L., Pariaut, R., Alcaraz, A., ... Guan, J.-L. (2006). Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(1), 217–27. <http://doi.org/10.1172/JCI24497>
- Peraldi, P., Hotamisligil, G. S., Buurman, W. A., White, M. F., & Spiegelman, B. M. (1996). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(22), 13018–22.

- Pereira, R. C., Stadmeier, L. E., Smith, D. L., Rydziel, S., & Canalis, E. (2007). CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) decreases bone formation and causes osteopenia. *Bone*, *40*(3), 619–26. <http://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.028>
- Permana, P. A., Menge, C., & Reaven, P. D. (2006). Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*(2), 507–14. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.012>
- Peterson, L. R., Herrero, P., Schechtman, K. B., Racette, S. B., Waggoner, A. D., Kisrieva-Ware, Z., ... Gropler, R. J. (2004). Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation*, *109*(18), 2191–6. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127959.28627.F8>
- Peterson, L. R., Waggoner, A. D., Schechtman, K. B., Meyer, T., Gropler, R. J., Barzilai, B., & Dávila-Román, V. G. (2004). Alterations in left ventricular structure and function in young healthy obese women. *Journal of the American College of Cardiology*, *43*(8), 1399–1404. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.10.062>
- Petrich, B. G., Gong, X., Lerner, D. L., Wang, X., Brown, J. H., Saffitz, J. E., & Wang, Y. (2002). c-Jun N-terminal kinase activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocytes. *Circulation Research*, *91*(7), 640–7.
- Petrich, B. G., Molkenstin, J. D., & Wang, Y. (2003). Temporal activation of c-Jun N-terminal kinase in adult transgenic heart via cre-loxP-mediated DNA recombination. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *17*(6), 749–51. <http://doi.org/10.1096/fj.02-0438fje>
- Pinto, A. R., Godwin, J. W., Chandran, A., Hersey, L., Ilinykh, A., Debuque, R., ... Rosenthal, N. a. (2014). Age-related changes in tissue macrophages precede cardiac functional impairment. *Aging*, *6*(5), 399–413.
- Pinto, A. R., Godwin, J. W., & Rosenthal, N. A. (2014). Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem Cell Research*, *13*(3PB), 705–714. <http://doi.org/10.1016/j.scr.2014.06.004>
- Pinto, A. R., Paolicelli, R., Salimova, E., Gospocic, J., Slonimsky, E., Bilbao-Cortes, D., ... Rosenthal, N. A. (2012). An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PloS One*, *7*(5), e36814. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036814>
- Planavila, A., Calvo, R. R., & Vázquez-Carrera, M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of fatty acid oxidation in cardiac hypertrophy. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *6*(3), 357–63.
- Planavila, A., Iglesias, R., Giralt, M., & Villarroya, F. (2011). Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovascular Research*, *90*(2), 276–84. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvq376>
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovascular Research*, *106*(1), 19–31. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvu263>
- Planavila, A., Rodríguez-Calvo, R., Jové, M., Michalik, L., Wahli, W., Laguna, J. C., & Vázquez-Carrera, M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *65*(4), 832–41. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.011>
- Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A., & van der Wall, E. E. (2000). The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, *101*(3), 336–44.
- Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Hinescu, M. E., Cretoiu, D., Ceafalan, L., Regalia, T., ... Mandache, E. (2006). Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *10*(2), 429–58.

- Popovici, C., Roubin, R., Coulier, F., & Birnbaum, D. (2005). An evolutionary history of the FGF superfamily. *BioEssays*, 27(8), 849–857. <http://doi.org/10.1002/bies.20261>
- Posch, M. G., Perrot, A., Berger, F., & Ozcelik, C. (2010). Molecular genetics of congenital atrial septal defects. *Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society*, 99(3), 137–47. <http://doi.org/10.1007/s00392-009-0095-0>
- Potthoff, M. J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., ... Burgess, S. C. (2009). FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26), 10853–10858. <http://doi.org/10.1073/pnas.0904187106>
- Potthoff, M. J., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2012). Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes & Development*, 26(4), 312–324. <http://doi.org/10.1101/gad.184788.111>
- Predmore, J. M., Wang, P., Davis, F., Bartolone, S., Westfall, M. V., Dyke, D. B., ... Day, S. M. (2010). Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation*, 121(8), 997–1004. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.904557>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2009). Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(3-4), 89–97. <http://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.05.001>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, 7(12), 715–26. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Prossnitz, E. R., & Maggiolini, M. (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 308(1-2), 32–8. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2009.03.026>
- Purcell, N. H., Tang, G., Yu, C., Mercurio, F., DiDonato, J. A., & Lin, A. (2001). Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6668–73. <http://doi.org/10.1073/pnas.111155798>
- Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., & Li, X. (2009). Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metabolism*, 9(4), 327–38. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.006>
- Qiang, L., & Accili, D. (2012). FGF21 and the second coming of PPARγ. *Cell*, 148(3), 397–8. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.020>
- Radovan Zak, & Hort, W. (1985). Growth of the heart in health and disease edited by Radovan Zak Raven Press, New York (1984) 480 pages, illustrated 0-89004-734-0, Clinical Cardiology Volume 8, Issue 3. *Clinical Cardiology*, 8(3), 186. <http://doi.org/10.1002/clc.4960080313>
- Rahman, S. M., Janssen, R. C., Choudhury, M., Baquero, K. C., Aikens, R. M., de la Houssaye, B. A., & Friedman, J. E. (2012). CCAAT/Enhancer-binding Protein β (C/EBPβ) Expression Regulates Dietary-induced Inflammation in Macrophages and Adipose Tissue in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34349–34360. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.410613>
- Ramji, D. P., & Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal*, 365(Pt 3), 561–575. <http://doi.org/10.1042/BJ20020508>
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*, 1(7285), 785–9.

- Ray, A., & Ray, B. K. (1994). Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP-beta and C/EBP-delta and their activation by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(6), 4324–32.
- Régnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., & Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, *90*(2), 373–83.
- Reinehr, T., Woelfle, J., Wunsch, R., & Roth, C. L. (2012). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF-21) and Its Relation to Obesity, Metabolic Syndrome, and Nonalcoholic Fatty Liver in Children: A Longitudinal Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *97*(6), 2143–2150. <http://doi.org/10.1210/jc.2012-1221>
- Ribas, F., Villarroya, J., Hondares, E., Giralt, M., & Villarroya, F. (2014). FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *The Biochemical Journal*, *463*(2), 191–9. <http://doi.org/10.1042/BJ20140403>
- Rieck, S., & Kaestner, K. H. (2010). Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *21*(3), 151–8. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.001>
- Rimbaud, S., Sanchez, H., Garnier, A., Fortin, D., Bigard, X., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2009). Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(6), 952–9.
- Riquelme, C. a., Magida, J. a., Harrison, B. C., Wall, C. E., Marr, T. G., Secor, S. M., & Leinwand, L. a. (2011). Fatty Acids Identified in the Burmese Python Promote Beneficial Cardiac Growth. *Science*, *334*(6055), 528–531. <http://doi.org/10.1126/science.1210558>
- Ritter, O., & Neyses, L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends in Molecular Medicine*, *9*(7), 313–21.
- Robson, S. C., Hunter, S., Boys, R. J., & Dunlop, W. (1989). Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *The American Journal of Physiology*, *256*(4 Pt 2), H1060–5.
- Robson, S. C., Hunter, S., Moore, M., & Dunlop, W. (1987). Haemodynamic changes during the puerperium: a Doppler and M-mode echocardiographic study. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *94*(11), 1028–39.
- Rockman, H. A., Koch, W. J., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, *415*(6868), 206–12. <http://doi.org/10.1038/415206a>
- Rodeheffer, R. J., Tanaka, I., Imada, T., Hollister, A. S., Robertson, D., & Inagami, T. (1986). Atrial pressure and secretion of atrial natriuretic factor into the human central circulation. *Journal of the American College of Cardiology*, *8*(1), 18–26.
- Ron, D., & Habener, J. F. (1992). CHOP , a novel developmentally regulated nuclear protein that aimerizes with transcription factors C / EBP and LAP and functions as a dominant- negative inhibitor of gene transcription. *Genes & Development*, *6*, 439–453. <http://doi.org/10.1101/gad.6.3.439>
- Ross, R. S. (2002). The extracellular connections: the role of integrins in myocardial remodeling. *Journal of Cardiac Failure*, *8*(6 Suppl), S326–31. <http://doi.org/10.1054/jcaf.2002.129263>
- Ross, R. S., & Borg, T. K. (2001). Integrins and the Myocardium. *Circulation Research*, *88*(11), 1112–1119. <http://doi.org/10.1161/hh1101.091862>
- Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2002). *Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis*. Gulf Professional Publishing.
- Rothermel, B. A., McKinsey, T. A., Vega, R. B., Nicol, R. L., Mammen, P., Yang, J., ... Williams, R. S. (2001). Myocyte-

- enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3328–33. <http://doi.org/10.1073/pnas.041614798>
- Rowe, G. C., Jiang, A., & Arany, Z. (2010). PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circulation Research*, 107(7), 825–38. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223818>
- Ruffell, D., Mourkioti, F., Gambardella, A., Kirstetter, P., Lopez, R. G., Rosenthal, N., & Nerlov, C. (2009). A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17475–80. <http://doi.org/10.1073/pnas.0908641106>
- Rugh, R., & Somogyi, C. (1969). The effect of pregnancy on peripheral blood in the mouse. *The Biological Bulletin*, 136(3), 454–60.
- Russell, L. K. (2004). Cardiac-Specific Induction of the Transcriptional Coactivator Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator-1 Promotes Mitochondrial Biogenesis and Reversible Cardiomyopathy in a Developmental Stage-Dependent Manner. *Circulation Research*, 94(4), 525–533. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000117088.36577.EB>
- Rydén, M. (2009). Fibroblast growth factor 21: an overview from a clinical perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(13), 2067–73. <http://doi.org/10.1007/s00018-009-0003-9>
- Saarelainen, H., Laitinen, T., Raitakari, O. T., Juonala, M., Heiskanen, N., Lyyra-Laitinen, T., ... Heinonen, S. (2006). Pregnancy-related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 70(6), 768–72.
- Salotti, J., Sakchaisri, K., Tourtellotte, W. G., & Johnson, P. F. (2015). An Arf-Egr-C/EBPβ Pathway Linked to Ras-Induced Senescence and Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 35(5), 866–883. <http://doi.org/10.1128/MCB.01489-14>
- Sandiford, I., & Wheeler, T. (1924). THE BASAL METABOLISM BEFORE, DURING, AND AFTER PREGNANCY. *J. Biol. Chem.*, 62(2), 329–352.
- Sanna, B., Brandt, E. B., Kaiser, R. A., Pfluger, P., Witt, S. A., Kimball, T. R., ... Molkentin, J. D. (2006). Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), 7327–32. <http://doi.org/10.1073/pnas.0509340103>
- Sanna, B., Bueno, O. F., Dai, Y.-S., Wilkins, B. J., & Molkentin, J. D. (2005). Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 865–78. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.3.865-878.2005>
- Sarruf, D. A., Thaler, J. P., Morton, G. J., German, J., Fischer, J. D., Ogimoto, K., & Schwartz, M. W. (2010). Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes*, 59(7), 1817–24. <http://doi.org/10.2337/db09-1878>
- Savoia, C., Volpe, M., Alonzo, A., Rossi, C., & Rubattu, S. (2010). Natriuretic peptides and cardiovascular damage in the metabolic syndrome: molecular mechanisms and clinical implications: Figure 1. *Clinical Science*, 118(4), 231–240. <http://doi.org/10.1042/CS20090204>
- Savu, O., Jurcuț, R., Giușcă, S., van Mieghem, T., Gussi, I., Popescu, B. A., ... Voigt, J.-U. (2012). Morphological and functional adaptation of the maternal heart during pregnancy. *Circulation. Cardiovascular Imaging*, 5(3), 289–

97. <http://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.970012>

- Schilling, J., Lai, L., Sambandam, N., Dey, C. E., Leone, T. C., & Kelly, D. P. (2011). Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 signaling. *Circulation. Heart Failure*, 4(4), 474–82. <http://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.959833>
- Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2), 253–62.
- Schmidt, A. G., Edes, I., & Kranias, E. G. (2001). Phospholamban: a promising therapeutic target in heart failure? *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 15(5), 387–96.
- Schneider, J. E., & Wade, G. N. (1987). Body composition, food intake, and brown fat thermogenesis in pregnant Djungarian hamsters. *The American Journal of Physiology*, 253(2 Pt 2), R314–20.
- Schrem, H., Klempnauer, R., & Borlak, R. (2004). Liver-Enriched Transcription Factors in Liver Function and Development. Part II: the C/EBPs and D Site-Binding Protein in Cell Cycle Control, Carcinogenesis, Circadian Gene Regulation, Liver Regeneration, Apoptosis, and Liver-Specific Gene Regulation. *Cell Cycle*, 5(2), 291–330. <http://doi.org/10.1124/pr.56.2.5.291>
- Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., ... Lattanzio, G. (1995). Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *The EMBO Journal*, 14(9), 1932–41.
- Serluca, F. C. (2008). Development of the proepicardial organ in the zebrafish. *Developmental Biology*, 315(1), 18–27. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.007>
- Serra, A. J., Santos, M. H. H., Bocalini, D. S., Antônio, E. L., Levy, R. F., Santos, A. A., ... Tucci, P. J. F. (2010). Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 13), 2431–42. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187310>
- Seth, M., Zhang, Z.-S., Mao, L., Graham, V., Burch, J., Stiber, J., ... Rosenberg, P. (2009). TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circulation Research*, 105(10), 1023–30. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206581>
- Shai, S.-Y. (2002). Cardiac Myocyte-Specific Excision of the beta1 Integrin Gene Results in Myocardial Fibrosis and Cardiac Failure. *Circulation Research*, 90(4), 458–464. <http://doi.org/10.1161/hh0402.105790>
- Shao, Y., Redfors, B., Scharin Täng, M., Möllmann, H., Troidl, C., Szardien, S., ... Omerovic, E. (2013). Novel rat model reveals important roles of β -adrenoreceptors in stress-induced cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, 168(3), 1943–50. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.12.092>
- Shenoy, S. K., & Rockman, H. A. (2011). Cardiovascular biology: heart fails without pump partner. *Nature*, 477(7366), 546–7. <http://doi.org/10.1038/477546a>
- Shubeita, H. E., Martinson, E. A., Van Bilsen, M., Chien, K. R., & Brown, J. H. (1992). Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4), 1305–9.
- Slangen, B. F., Out, I. C., Verkeste, C. M., & Peeters, L. L. (1996). Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *The American Journal of Physiology*, 270(5 Pt 2), H1779–84.
- 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., & van Bilsen, M. (2008). Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and

- attenuated by peroxisome proliferator-activated receptors PPARalpha and PPARdelta. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(43), 29109–18. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802143200>
- Smith, R., Duguay, A., Bakker, A., Li, P., Weiszmann, J., Thomas, M. R., ... Li, Y. (2013). FGF21 Can Be Mimicked In Vitro and In Vivo by a Novel Anti-FGFR1c/ β -Klotho Bispecific Protein. *PLoS ONE*, 8(4), e61432. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061432>
- Songstad, N. T., Johansen, D., How, O.-J., Kaaresen, P. I., Ytrehus, K., & Acharya, G. (2014). Effect of transverse aortic constriction on cardiac structure, function and gene expression in pregnant rats. *PLoS One*, 9(2), e89559. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089559>
- Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L. J. (1996). Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *The American Journal of Physiology*, 271(5 Pt 2), H2183–9.
- Sorenson, R. L., & Brelje, T. C. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme*, 29(6), 301–7. <http://doi.org/10.1055/s-2007-979040>
- Souders, C. A., Borg, T. K., Banerjee, I., & Baudino, T. A. (2012). Pressure overload induces early morphological changes in the heart. *The American Journal of Pathology*, 181(4), 1226–35. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.015>
- Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., & Gill, D. L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16586–91. <http://doi.org/10.1073/pnas.0606894103>
- Speakman, J. R., & McQueenie, J. (1996). Metabolic Rate : The Link Limits to Sustained between Food Intake , Basal Metabolic Rate , and Morphology in Reproducing Mice , *Mus musculus*. *Physiological Zoology*, 69(4), 746–769.
- Spiegelman, B. M., Choy, L., Hotamisligil, G. S., Graves, R. A., & Tontonoz, P. (1993). Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 6823–6.
- Stachowiak, E. K., Fang, X., Myers, J., Dunham, S., & Stachowiak, M. K. (2003). cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *Journal of Neurochemistry*, 84(6), 1296–312.
- Stanley, W. C. (1991). Myocardial lactate metabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 23(8), 920–4.
- Stanley, W. C. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews*, 85(3), 1093–1129. <http://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Sterneck, E., Tessarollo, L., & Johnson, P. F. (1997). An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes & Development*, 11(17), 2153–62.
- Stetson, S. J., Perez-Verdia, A., Mazur, W., Farmer, J. A., Koerner, M. M., Weilbaecher, D. G., ... Torre-Amione, G. (2001). Cardiac hypertrophy after transplantation is associated with persistent expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*, 104(6), 676–81.
- Stilli, D., Bocchi, L., Berni, R., Zaniboni, M., Cacciani, F., Chaponnier, C., ... Clément, S. (2006). Correlation of alpha-skeletal actin expression, ventricular fibrosis and heart function with the degree of pressure overload cardiac hypertrophy in rats. *Experimental Physiology*, 91(3), 571–80. <http://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032607>
- Sucov, H. M., Gu, Y., Thomas, S., Li, P., & Pashmforoush, M. (2009). Epicardial control of myocardial proliferation and

morphogenesis. *Pediatric Cardiology*, 30(5), 617–25. <http://doi.org/10.1007/s00246-009-9391-8>

- Suganami, T., Nishida, J., & Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(10), 2062–8. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13>
- Sugden, M. C., Changani, K. K., Bentley, J., & Holness, M. J. (1992). Cardiac glucose metabolism during pregnancy. *Biochemical Society Transactions*, 20(2), 195S.
- Sugden, M. C., & Holness, M. J. (1993). Cardiac carbohydrate and lipid utilization during late pregnancy. *Biochemical Society Transactions*, 21 (Pt 3)(3), 312S.
- Sugden, P. H., & Clerk, A. (1998). “Stress-responsive” mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circulation Research*, 83(4), 345–52.
- Suzuki, M., Uehara, Y., Motomura-Matsuzaka, K., Oki, J., Koyama, Y., Kimura, M., ... Imamura, T. (2008). betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(4), 1006–14. <http://doi.org/10.1210/me.2007-0313>
- Tachibana, H., Perrino, C., Takaoka, H., Davis, R. J., Naga Prasad, S. V., & Rockman, H. A. (2006). JNK1 is required to preserve cardiac function in the early response to pressure overload. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(4), 1060–6. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.065>
- Taegtmeier, H., & Overturf, M. L. (1988). Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension*, 11(5), 416–26.
- Taegtmeier, H., Razeghi, P., & Young, M. E. (2002). Mitochondrial proteins in hypertrophy and atrophy: a transcript analysis in rat heart. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 29(4), 346–50.
- Takano, H., Nagai, T., Asakawa, M., Toyozaki, T., Oka, T., Komuro, I., ... Masuda, Y. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation Research*, 87(7), 596–602.
- Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., ... Kass, D. A. (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nature Medicine*, 11(2), 214–22. <http://doi.org/10.1038/nm1175>
- Tan, B. K., Hallschmid, M., Adya, R., Kern, W., Lehnert, H., & Randeve, H. S. (2011). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in Human Cerebrospinal Fluid: Relationship With Plasma FGF21 and Body Adiposity. *Diabetes*, 60(11), 2758–2762. <http://doi.org/10.2337/db11-0672>
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., ... Kishimoto, T. (1995). Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell*, 80(2), 353–61.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *The EMBO Journal*, 16(24), 7432–43. <http://doi.org/10.1093/emboj/16.24.7432>
- Tang, Q.-Q., Grønborg, M., Huang, H., Kim, J.-W., Otto, T. C., Pandey, A., & Lane, M. D. (2005). Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9766–71. <http://doi.org/10.1073/pnas.0503891102>
- Taniike, M., Yamaguchi, O., Tsujimoto, I., Hikoso, S., Takeda, T., Nakai, A., ... Otsu, K. (2008). Apoptosis signal-

- regulating kinase 1/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. *Circulation*, 117(4), 545–52. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710434>
- Tarone, G., & Lembo, G. (2003). Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy. *Trends in Molecular Medicine*, 9(9), 376–82.
- Timchenko, L. T., Iakova, P., Welm, A. L., Cai, Z.-J., & Timchenko, N. A. (2002). Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 22(20), 7242–57.
- Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., & Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Research*, 27(22), 4517–25.
- Timchenko, N., Wilson, D. R., Taylor, L. R., Abdelsayed, S., Wilde, M., Sawadogo, M., & Darlington, G. J. (1995). Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1192–202.
- Toker, A., & Newton, A. C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell*, 103(2), 185–8.
- Tominaga, H., Maeda, S., Hayashi, M., Takeda, S., Akira, S., Komiya, S., ... Imamura, T. (2008). CCAAT/enhancer-binding protein beta promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5373–86. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0329>
- Toral, M., Romero, M., Jiménez, R., Mahmoud, A. M., Barroso, E., Gómez-Guzmán, M., ... Duarte, J. (2015). Carnitine palmitoyltransferase-1 up-regulation by PPAR- β/δ prevents lipid-induced endothelial dysfunction. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 129(9), 823–37. <http://doi.org/10.1042/CS20150111>
- Townsend, N., Nichols, M., Scarborough, P., & Rayner, M. (2015). Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015. *European Heart Journal*, ehv428. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv428>
- Trowell, O. A., & Willmer, E. N. (1939). Studies on the Growth of Tissues in vitro: VI. The Effects of some Tissue Extracts on the Growth of Periosteal Fibroblasts. *J. Exp. Biol.*, 16(1), 60–70.
- Tsukada, J., Saito, K., Waterman, W. R., Webb, A. C., & Auron, P. E. (1994). Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), 7285–97.
- Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., & Auron, P. E. (2011). The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*, 54(1), 6–19. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.12.019>
- Tsukamoto, O., Minamino, T., Okada, K., Shintani, Y., Takashima, S., Kato, H., ... Kitakaze, M. (2006). Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4), 1125–33. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.120>
- Turturro, A., Witt, W. W., Lewis, S., Hass, B. S., Lipman, R. D., & Hart, R. W. (1999). Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 54(11), B492–501.
- Uebanso, T., Taketani, Y., Yamamoto, H., Amo, K., Ominami, H., Arai, H., ... Takeda, E. (2011). Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: is FGF21 a nutritional adaptation factor? *PLoS One*, 6(8), e22976. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022976>

- Uematsu, S., Kaisho, T., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yamakami, M., Omori, H., ... Akira, S. (2007). The C/EBP Isoform 34-kDa LAP Is Responsible for NF-IL-6-Mediated Gene Induction in Activated Macrophages, but Is Not Essential for Intracellular Bacteria Killing. *The Journal of Immunology*, 179(8), 5378–5386. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5378>
- Umar, S., Nadadur, R., Iorga, A., Amjadi, M., Matori, H., & Eghbali, M. (2012). Cardiac structural and hemodynamic changes associated with physiological heart hypertrophy of pregnancy are reversed postpartum. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 113(8), 1253–9. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00549.2012>
- Umar, S., & van der Laarse, A. (2010). Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 333(1-2), 191–201. <http://doi.org/10.1007/s11010-009-0219-x>
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., ... Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444(7120), 770–774. <http://doi.org/10.1038/nature05315>
- Valente, T., Straccia, M., Gresa-Arribas, N., Denteseano, G., Tusell, J. M., Serratos, J., ... Saura, J. (2013). CCAAT/enhancer binding protein δ regulates glial proinflammatory gene expression. *Neurobiology of Aging*, 34(9), 2110–24. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.007>
- Van Bilsen, M., & Planavila, a. (2014). Fatty acids and cardiac disease: Fuel carrying a message. *Acta Physiologica*, 211(3), 476–490. <http://doi.org/10.1111/apha.12308>
- van Bilsen, M., van der Vusse, G. J., & Reneman, R. S. (1998). Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 437(1), 2–14. <http://doi.org/10.1007/s004240050739>
- van Bilsen, M., van Nieuwenhoven, F. A., & van der Vusse, G. J. (2008). Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovascular Research*, 81(3), 420–428. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvn282>
- van der Vusse, G. J., Glatz, J. F., Stam, H. C., & Reneman, R. S. (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiological Reviews*, 72(4), 881–940.
- van Eickels, M., Grohé, C., Cleutjens, J. P. M., Janssen, B. J., Wellens, H. J. J., Doevendans, P. A., ... Doevendans, P. A. (2001). 17-Estradiol Attenuates the Development of Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation*, 104(12), 1419–23. <http://doi.org/10.1161/hc3601.095577>
- van Oppen, A. C., Stigter, R. H., & Bruinse, H. W. (1996). Cardiac output in normal pregnancy: a critical review. *Obstetrics and Gynecology*, 87(2), 310–8. [http://doi.org/10.1016/0029-7844\(95\)00348-7](http://doi.org/10.1016/0029-7844(95)00348-7)
- Vassiliadis, S., Ranella, A., Papadimitriou, L., Makrygiannakis, A., & Athanassakis, I. (1998). Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. *Mediators of Inflammation*, 7(2), 69–72. <http://doi.org/10.1080/09629359891199>
- Vega, R. B., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2003). Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 36981–4. <http://doi.org/10.1074/jbc.R300023200>
- Vega, R. B., Rothermel, B. A., Weinheimer, C. J., Kovacs, A., Naseem, R. H., Bassel-Duby, R., ... Olson, E. N. (2003). Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 669–74. <http://doi.org/10.1073/pnas.0237225100>
- Velez, D. R., Fortunato, S. J., Morgan, N., Edwards, T. L., Lombardi, S. J., Williams, S. M., & Menon, R. (2008). Patterns of cytokine profiles differ with pregnancy outcome and ethnicity. *Human Reproduction (Oxford, England)*,

- 23(8), 1902–9. <http://doi.org/10.1093/humrep/den170>
- Véniant, M. M., Komorowski, R., Chen, P., Stanislaus, S., Winters, K., Hager, T., ... Xu, J. (2012). Long-acting FGF21 has enhanced efficacy in diet-induced obese mice and in obese rhesus monkeys. *Endocrinology*, *153*(9), 4192–203. <http://doi.org/10.1210/en.2012-1211>
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research*, *79*(2), 208–17. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvn098>
- Villarroya, F., Felipe, A., & Mampel, T. (1986). Sequential changes in brown adipose tissue composition, cytochrome oxidase activity and GDP binding throughout pregnancy and lactation in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, *882*(2), 187–91.
- Villarroya, J., Flachs, P., Redondo-Angulo, I., Giralt, M., Medrikova, D., Villarroya, F., ... Planavila, A. (2014). Fibroblast growth factor-21 and the beneficial effects of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, *49*(11), 1081–9. <http://doi.org/10.1007/s11745-014-3948-x>
- Virgo, B. B., & Bellward, G. D. (1974). Serum progesterone levels in the pregnant and postpartum laboratory mouse. *Endocrinology*, *95*(5), 1486–90. <http://doi.org/10.1210/endo-95-5-1486>
- Vlahos, C. J., McDowell, S. A., & Clerk, A. (2003). Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *2*(2), 99–113. <http://doi.org/10.1038/nrd1009>
- von Gise, A., Zhou, B., Honor, L. B., Ma, Q., Petryk, A., & Pu, W. T. (2011). WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Developmental Biology*, *356*(2), 421–31. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.668>
- Wade, G. N., Jennings, G., & Trayhurn, P. (1986). Energy balance and brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in Syrian hamsters. *The American Journal of Physiology*, *250*(5 Pt 2), R845–50.
- Wang, D., Zhu, W., Li, J., An, C., & Wang, Z. (2013). Serum concentrations of fibroblast growth factors 19 and 21 in women with gestational diabetes mellitus: association with insulin resistance, adiponectin, and polycystic ovary syndrome history. *PLoS One*, *8*(11), e81190. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081190>
- Wang, F., Kan, M., Yan, G., Xu, J., & McKeehan, W. L. (1995). Alternately spliced NH₂-terminal immunoglobulin-like Loop I in the ectodomain of the fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(17), 10231–5.
- Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W. J., & Timchenko, N. A. (2001). C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Molecular Cell*, *8*(4), 817–28.
- Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., ... Darlington, G. J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice. *Science (New York, N.Y.)*, *269*(5227), 1108–12.
- Wei, W., Dutchak, P. A., Wang, X., Ding, X., Wang, X., Bookout, A. L., ... Wan, Y. (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(8), 3143–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1200797109>
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., ... Ferrante, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(1), 115–24. <http://doi.org/10.1172/JCI24335>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796–808.

<http://doi.org/10.1172/JCI19246>

- Welm, A. L., Mackey, S. L., Timchenko, L. T., Darlington, G. J., & Timchenko, N. A. (2000). Translational induction of liver-enriched transcriptional inhibitory protein during acute phase response leads to repression of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27406–13. <http://doi.org/10.1074/jbc.M002343200>
- Welm, A. L., Timchenko, N. A., & Darlington, G. J. (1999). C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 1695–704.
- Wente, W., Efanov, A. M., Brenner, M., Kharitononkov, A., Köster, A., Sandusky, G. E., ... Gromada, J. (2006). Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*, 55(9), 2470–8. <http://doi.org/10.2337/db05-1435>
- Wethmar, K., Bégay, V., Smink, J. J., Zaragoza, K., Wiesenthal, V., Dörken, B., ... Leutz, A. (2010). C/EBPbetaDeltaORF mice--a genetic model for uORF-mediated translational control in mammals. *Genes & Development*, 24(1), 15–20. <http://doi.org/10.1101/gad.557910>
- White, D. E., Coutu, P., Shi, Y.-F., Tardif, J.-C., Nattel, S., St Arnaud, R., ... Muller, W. J. (2006). Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. *Genes & Development*, 20(17), 2355–60. <http://doi.org/10.1101/gad.1458906>
- Wilkins, B. J., Dai, Y.-S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., ... Molkenin, J. D. (2004). Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 94(1), 110–8. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000109415.17511.18>
- Wilkins, B. J., De Windt, L. J., Bueno, O. F., Braz, J. C., Glascock, B. J., Kimball, T. F., & Molkenin, J. D. (2002). Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Molecular and Cellular Biology*, 22(21), 7603–13.
- Wilkins, B. J., & Molkenin, J. D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1178–91. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.121>
- Williams, J. G., Ojaimi, C., Qanud, K., Zhang, S., Xu, X., Recchia, F. A., & Hintze, T. H. (2008). Coronary nitric oxide production controls cardiac substrate metabolism during pregnancy in the dog. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 294(6), H2516–23. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01196.2007>
- Williams, J. G., Rincon-Skinner, T., Sun, D., Wang, Z., Zhang, S., Zhang, X., & Hintze, T. H. (2007). Role of nitric oxide in the coupling of myocardial oxygen consumption and coronary vascular dynamics during pregnancy in the dog. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2479–H2486. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00036.2006>
- Williams, S. C., Baer, M., Dillner, A. J., & Johnson, P. F. (1995). CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *The EMBO Journal*, 14(13), 3170–83.
- Winick, M. (1989). *Nutrition, pregnancy, and early infancy*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Winter, E. M., & Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(6), 692–703. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-6522-3>
- Wollert, K. C., Fiedler, B., Gambaryan, S., Smolenski, A., Heineke, J., Butt, E., ... Drexler, H. (2002). Gene transfer of

- cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. *Hypertension*, 39(1), 87–92.
- Wong, A. Y., Kulandavelu, S., Whiteley, K. J., Qu, D., Langille, B. L., & Adamson, S. L. (2002). Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(3), H918–25. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00641.2001>
- Wong, C. Y., O'Moore-Sullivan, T., Leano, R., Byrne, N., Beller, E., & Marwick, T. H. (2004). Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*, 110(19), 3081–7. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147184.13872.0F>
- Woo, Y. C., Xu, A., Wang, Y., & Lam, K. S. L. (2013). Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clinical Endocrinology*, 78(4), 489–96. <http://doi.org/10.1111/cen.12095>
- Wu, A.-L., Kolumam, G., Stawicki, S., Chen, Y., Li, J., Zavala-Solorio, J., ... Sonoda, J. (2011). Amelioration of type 2 diabetes by antibody-mediated activation of fibroblast growth factor receptor 1. *Science Translational Medicine*, 3(113), 113ra126. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002669>
- Xia, C., Cheshire, J. K., Patel, H., & Woo, P. (1997). Cross-talk between transcription factors NF-kappa B and C/EBP in the transcriptional regulation of genes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(12), 1525–39.
- Xia, Y., Lee, K., Li, N., Corbett, D., Mendoza, L., & Frangogiannis, N. G. (2009). Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(4), 471–81. <http://doi.org/10.1007/s00418-008-0541-5>
- Xiao, J., Li, J., Xu, T., Lv, D., Shen, B., Song, Y., & Xu, J. (2014). Pregnancy-induced physiological hypertrophy protects against cardiac ischemia-reperfusion injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(1), 229–35.
- Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., ... Véniant, M. M. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models--association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 297(5), E1105–14. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00348.2009>
- Yamada, A. T., Croy, B. A., DeMayo, F. J., S. Lee Adamson, & Burke, S. D. (2014). The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00029-1>
- Yamada, T., Tobita, K., Osada, S., Nishihara, T., & Imagawa, M. (1997). CCAAT/enhancer-binding protein delta gene expression is mediated by APRE/STAT3. *Journal of Biochemistry*, 121(4), 731–8.
- Yamaguchi, O., Higuchi, Y., Hirotsu, S., Kashiwase, K., Nakayama, H., Hikoso, S., ... Otsu, K. (2003). Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15883–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.2136717100>
- Yang, S. J., Hong, H. C., Choi, H. Y., Yoo, H. J., Cho, G. J., Hwang, T. G., ... Choi, K. M. (2011). Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women. *Clinical Endocrinology*, 75(4), 464–9. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04078.x>
- Yie, J., Hecht, R., Patel, J., Stevens, J., Wang, W., Hawkins, N., ... Xu, J. (2009). FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation. *FEBS Letters*, 583(1), 19–24. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.023>
- Yie, J., Wang, W., Deng, L., Tam, L.-T., Stevens, J., Chen, M. M., ... Wang, M. (2012). Understanding the physical

- interactions in the FGF21/FGFR/ β -Klotho complex: structural requirements and implications in FGF21 signaling. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(4), 398–410. <http://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01325.x>
- Yin, F. C., Spurgeon, H. A., Rakusan, K., Weisfeldt, M. L., & Lakatta, E. G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *The American Journal of Physiology*, 243(6), H941–7.
- Yu, H., Xia, F., Lam, K. S. L., Wang, Y., Bao, Y., Zhang, J., ... Xu, A. (2011). Circadian Rhythm of Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Is Related to Diurnal Changes in Fatty Acids in Humans. *Clinical Chemistry*, 57(5), 691–700. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2010.155184>
- Zaha, V. G., & Young, L. H. (2012). AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart. *Circulation Research*, 111(6), 800–14. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255505>
- Zahnow, C. a. (2002). CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 4(3), 113–121.
- Zannad, F., Briancon, S., Juilliere, Y., Mertes, P. M., Villemot, J. P., Alla, F., & Virion, J. M. (1999). Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *Epidémiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancée en Lorraine. Journal of the American College of Cardiology*, 33(3), 734–42.
- Zhang, C., Huang, Z., Gu, J., Yan, X., Lu, X., Zhou, S., ... Li, X. (2015). 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), 1937–48. <http://doi.org/10.1007/s00125-015-3630-8>
- Zhang, D., Gaussin, V., Taffet, G. E., Belaguli, N. S., Yamada, M., Schwartz, R. J., ... Schneider, M. D. (2000). TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nature Medicine*, 6(5), 556–63. <http://doi.org/10.1038/75037>
- Zhang, L., Sugiyama, T., Murabayashi, N., Umekawa, T., Ma, N., Kamimoto, Y., ... Sagawa, N. (2011). The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice. *Journal of Molecular Endocrinology*, 47(2), 157–65. <http://doi.org/10.1530/JME-11-0030>
- Zhang, S., Weinheimer, C., Courtois, M., Kovacs, A., Zhang, C. E., Cheng, A. M., ... Muslin, A. J. (2003). The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 833–41. <http://doi.org/10.1172/JCI16290>
- Zhang, X., Yeung, D. C. Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z.-G., Liu, F., ... Xu, A. (2008). Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*, 57(5), 1246–53. <http://doi.org/10.2337/db07-1476>
- Zhang, Y., Xie, Y., Berglund, E. D., Colbert Coate, K., He, T. T., Katafuchi, T., ... Mangelsdorf, D. J. (2012). The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *eLife*, 1(1), e00065. <http://doi.org/10.7554/eLife.00065>
- Zheng, B., Cao, L.-S., Zeng, Q.-T., Wang, X., Li, D.-Z., & Liao, Y.-H. (2004). Inhibition of NOS2 ameliorates cardiac remodeling, improves heart function after myocardial infarction in rats. *Basic Research in Cardiology*, 99(4), 264–71. <http://doi.org/10.1007/s00395-004-0470-y>
- Zhou, B., Honor, L. B., He, H., Ma, Q., Oh, J.-H., Butterfield, C., ... Pu, W. T. (2011). Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1894–904. <http://doi.org/10.1172/JCI45529>
- Zou, J., Gan, X., Zhou, H., Chen, X., Guo, Y., Chen, J., ... Lei, J. (2015). Alpha-lipoic acid attenuates cardiac hypertrophy via inhibition of C/EBP β activation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 399, 321–329. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.10.003>

- Zou, J., Li, H., Chen, X., Zeng, S., Ye, J., Zhou, C., ... Liu, P. (2014). C/EBP β knockdown protects cardiomyocytes from hypertrophy via inhibition of p65-NF κ B. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 390(1-2), 18–25. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.007>
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., ... Komuro, I. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biology*, 6(6), 499–506. <http://doi.org/10.1038/ncb1137>



Apéndice

FGF21 and Cardiac Physiopathology

Publicación: Frontiers in Endocrinology

PMID: 26379627

Título: **FGF21 y la fisiopatología cardiaca**

El corazón no se considera tradicionalmente ni productor ni diana del *fibroblast growth factor 21* (FGF21). A pesar de ello, estudios recientes muestran que FGF21 puede actuar como cardiomiocina; es producido por las células cardíacas en niveles significativos y actúa de manera autocrina sobre el propio corazón. El corazón es sensible a los efectos de FGF21, tanto al sistémicamente producido como al local, ya que expresa β -klotho, el co-receptor clave que dota a un tejido de sensibilidad a FGF21. Se ha demostrado que FGF21 protege frente a la inflamación y la hipertrofia cardíacas y frente al estrés oxidativo. La expresión de FGF21 en corazón se incrementa frente a insultos cardíacos como la hipertrofia cardíaca experimental y el infarto de miocardio en modelos de roedor, al igual que en corazones de humanos con insuficiencia cardíaca. Los mecanismos intracelulares que median la regulación transcripcional de FGF21 en respuesta a estímulos exógenos están relacionados con PPAR α y Sirt1. En humanos, los niveles circulantes de FGF21 están elevados en la cardiomiopatía isquémica y en la aterosclerosis y se asocian con un mayor riesgo de patología cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2. Estos avances han permitido conocer más profundamente el papel de FGF21 en corazón y podrían potencialmente ofrecer estrategias terapéuticas contra enfermedades cardíacas.



CrossMark

FGF21 and cardiac physiopathology

Anna Planavila^{1,2}, Ibon Redondo-Angulo^{1,2} and Francesc Villarroya^{1,2*}

¹ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ² CIBER Fisiotopatologia de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

The heart is not traditionally considered either a target or a site of fibroblast growth factor-21 (FGF21) production. However, recent findings indicate that FGF21 can act as a cardiomyokine; that is, it is produced by cardiac cells at significant levels and acts in an autocrine manner on the heart itself. The heart is sensitive to the effects of FGF21, both systemic and locally generated, owing to the expression in cardiomyocytes of β -Klotho, the key co-receptor known to confer specific responsiveness to FGF21 action. FGF21 has been demonstrated to protect against cardiac hypertrophy, cardiac inflammation, and oxidative stress. FGF21 expression in the heart is induced in response to cardiac insults, such as experimental cardiac hypertrophy and myocardial infarction in rodents, as well as in failing human hearts. Intracellular mechanisms involving PPAR α and Sirt1 mediate transcriptional regulation of the *FGF21* gene in response to exogenous stimuli. In humans, circulating FGF21 levels are elevated in coronary heart disease and atherosclerosis, and are associated with a higher risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. These findings provide new insights into the role of FGF21 in the heart and may offer potential therapeutic strategies for cardiac disease.

Keywords: cardiac hypertrophy, sirtuins, PGC1 α , cardiac pathology, oxidative stress

OPEN ACCESS

Edited by:

Matthew J. Potthoff,
University of Iowa, USA

Reviewed by:

Chad Grueter,
University of Iowa Carver
College of Medicine, USA
Bryn Owen,
Imperial College London, UK

*Correspondence:

Francesc Villarroya,
Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular, Facultat
de Biologia, Institut de Biomedicina
de la Universitat de Barcelona,
Universitat de Barcelona,
Avda Diagonal 643,
Barcelona 08028, Spain
fvillarroya@ub.edu

Specialty section:

This article was submitted to *Cellular Endocrinology*, a section of the journal *Frontiers in Endocrinology*

Received: 02 July 2015

Accepted: 14 August 2015

Published: 31 August 2015

Citation:

Planavila A, Redondo-Angulo I and Villarroya F (2015) FGF21 and cardiac physiopathology. *Front. Endocrinol.* 6:133. doi: 10.3389/fendo.2015.00133

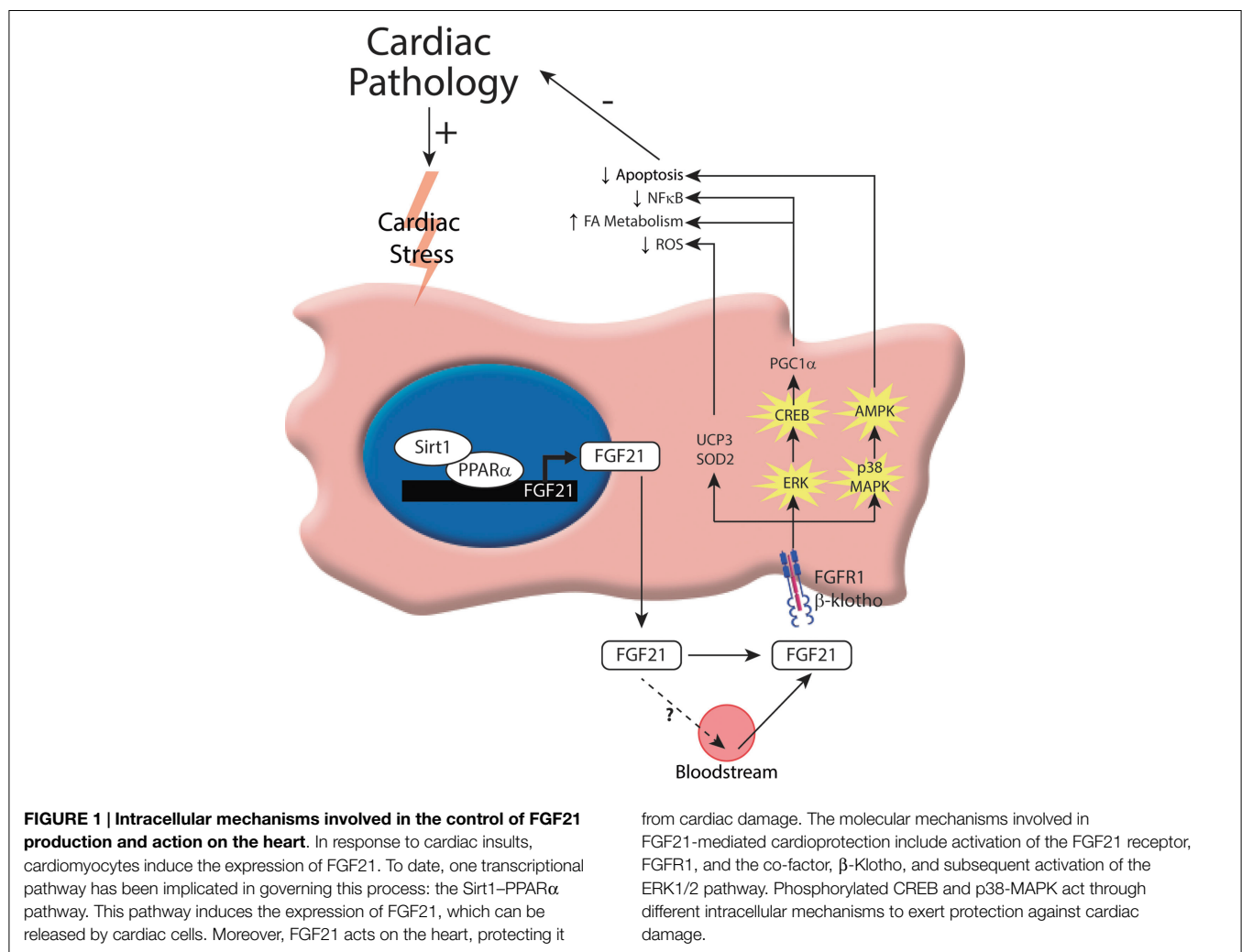
Introduction

More than a decade has passed since fibroblast growth factor 21 (FGF21), the 21st member of the FGF family, was identified and cloned. Among FGFs, FGF21 has been shown to be a secreted protein that acts as a metabolic regulator and plays a role in the control of glucose homeostasis, insulin sensitivity, and ketogenesis (1, 2). FGF21 expression is under the control of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α), and the main site of its production and release into the blood is considered to be the liver (1, 3). Extra-hepatic tissues, such as white and brown adipose tissues and skeletal muscle, also express FGF21 (4–6). Endocrine actions of FGF21 include the promotion of glucose uptake by white adipocytes through induction of the glucose transporter, Glut1 (7), activation of brown fat thermogenic activity (8), and promotion of the appearance of brown fat-like cells in white fat – the so-called “browning” process (9). FGF21 also has autocrine/paracrine effects, such as induction of hepatic ketogenesis (1). The action of FGF21 on target cells requires FGF receptors (mainly FGFR1 and FGFR4 in adipose tissue and liver, respectively) and β -Klotho, a single-pass transmembrane protein that functions as an obligate cofactor for FGF21 signaling (10, 11). The heart was originally not considered an FGF21 target or source, primarily because of modest expression of mRNA for FGF21 and the transcript encoding β -Klotho, the obligate co-receptor for cellular responsiveness to FGF21 (12). Intriguingly, emerging studies have demonstrated that FGF21 is involved in regulating cardiac function. Here, we review recent advances that have led to the current awareness of the role of FGF21 in cardiac pathophysiology.

Cardiac Effects of FGF21

Despite initial evidence excluding the heart as a target tissue of FGF21, recent studies have demonstrated that FGF21 plays an important role in cardiac remodeling (13–16). A recent study from our laboratory provided the first report of the cardioprotective effects of FGF21 (13). This report showed that significant amounts of both the FGF21 receptor, FGFR1, and the co-factor, β -Klotho, are present at the protein level in cardiac cells. Moreover, treatment of cardiomyocytes in culture with FGF21 was found to activate the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, which is considered the main intracellular pathway responsible for FGF21 intracellular actions. *In vivo*, hearts of FGF21-knockout mice exhibit an increase in relative weight and develop enhanced signs of dilatation. In response to isoproterenol infusion, a standard model used to induce cardiac hypertrophy, heart size, and cardiomyocyte volume are increased to a larger extent in FGF21-knockout mice compared with control mice. Furthermore, FGF21 treatment prevents cardiac hypertrophy development (at least, in neonatal mouse models), enhances fatty acid oxidation, and prevents the induction of pro-inflammatory pathways in the heart, thereby confirming

the anti-hypertrophic properties of FGF21 (13). An exploration of the molecular mechanisms underlying these protective effects of FGF21 further revealed that isoproterenol treatment of FGF21-knockout mice upregulates pro-inflammatory markers in association with a decrease in PPAR γ co-activator-1 α (PGC1 α) expression levels. PGC1 α is a transcriptional co-activator involved in the control of energy metabolism and oxidative stress in several tissues, including the heart (17). It was previously reported that cardiac expression of PGC1 α is repressed by hypertrophic (18) and pro-inflammatory stimuli (19, 20). In this context, it was shown that the inhibitory action of FGF21 on cardiac hypertrophy and inflammation is associated with the induction of PGC1 α (13). Moreover, FGF21 was shown to rapidly induce cAMP responsive element binding protein (CREB) phosphorylation in cardiomyocytes, a finding in accord with previous studies on FGFR1-mediated induction of CREB in other cell types (21). This latter effect may explain the observation that FGF21 induces the expression of PGC1 α , a target of CREB (22) and an established repressor of the NF- κ B pro-inflammatory pathway (23). Thus, this study indicates that FGF21 exerts protective effects against cardiac hypertrophy through a mechanism involving PGC1 α (Figure 1).



Other studies have reported that FGF21 also exerts protection after myocardial infarction by inhibiting cardiomyocyte apoptosis (15), attenuating pathological myocardial remodeling, and reducing infarct size (16, 24). Furthermore, oxidative stress, which also plays a role in the pathogenesis of heart failure, is modulated by FGF21 (14). Cardiac FGF21 regulates genes involved in antioxidant pathways, thus preventing the production of reactive oxygen species (ROS) by cardiac cells. FGF21 induces the expression of genes encoding proteins involved in antioxidant pathways in cardiomyocytes in culture, especially uncoupling protein 3 (UCP3) and superoxide dismutase 2 (SOD2). Furthermore, the expression of antioxidant genes in response to signals that stimulate pro-oxidative/pro-inflammatory pathways in the heart is reduced in FGF21-knockout mice. Taken together, these very recent novel findings reveal new roles and mechanisms of action of FGF21 in the heart after myocardial infarction (**Figure 1**).

Finally, it has been proposed that FGF21 is involved in modulating cardiac lipid metabolism and homeostasis (25). In fact, the hormonal factor FGF21 is emerging as a key regulator of metabolism in general, providing significant health benefits and protective effects against metabolic disorders associated with obesity, such as insulin resistance, type II diabetes, and dyslipidemias. Recent initial pilot studies using an FGF21 analog to treat obese patients have shown promising results (26). Paradoxically, however, studies in both mice and humans have shown that obesity is associated with elevated circulating levels of FGF21, suggesting impaired FGF21 signaling (27–29). Thus, obesity has been proposed as an FGF21-resistance state. This phenomenon of reduced FGF21 action in obesity has been attributed to an 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 (30). In obese rats, β -Klotho protein expression in the heart is reduced, indicating that the FGF21-resistance state also occurs in the heart (24). Moreover, FGF21 deletion in mice exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating cardiac lipid accumulation, although it is not clear whether this is a direct effect of the lack of FGF21 action on heart or indirect due to altered systemic lipid homeostasis in diabetic FGF21-null mice (31). A recent study has shown that FGF21 prevents diabetes-induced cardiac apoptosis by activating the ERK–p38MAPK–AMPK pathway (**Figure 1**); therefore, FGF21 has been proposed as a treatment for diabetes-related cardiac damage (32). Collectively, these data point to FGF21 as a key regulator of cardiac metabolism and a potential therapeutic target for the treatment of diabetic cardiomyopathy.

Other research approaches have evidenced mechanisms of myocardium protection by FGF21 (15). Myocardial ischemia activates innate protective processes not only in the heart but also in remote organs. Several recent investigations have demonstrated that the liver responds to ischemic myocardial injury by increasing the secretion of cardioprotective proteins (15, 33). One such protein identified by microarray-based gene expression profiling and protein analysis is FGF21 (33, 34), which was found to be highly increased at the protein level in the liver and also in adipose tissue after myocardial infarction. The authors of these latter studies also reported that this secreted FGF21 acts on ischemic cardiomyocytes to mitigate acute myocardial injury. Thus, systemic FGF21

generated mainly by the liver contributes to protection of the myocardium against ischemic damage.

In summary, current data support the idea that FGF21 acts directly on cardiac tissue to prevent the development of cardiac hypertrophy, reduce infarct damage, and attenuate the development of diabetic cardiomyopathy in animal models.

Cardiac Production of FGF21

After the demonstration that FGF21 exerts cardioprotective effects, the next question raised was whether the heart was also able to endogenously produce FGF21. Our research group obtained the first data that addressed this question (13) showing that FGF21 is expressed in and secreted by cells of the heart in response to different cardiac stress stimuli, such as cardiac hypertrophy and myocardial infarction. FGF21 secreted by heart may function in an autocrine manner and, more unlikely, in an endocrine manner (see below). An analysis of different cell populations isolated from the heart showed that FGF21 is mainly produced by cardiomyocytes. Consistent with this, cardiomyocytes in culture were found to secrete FGF21 protein into the cell culture medium. Mouse models of experimentally induced cardiac hypertrophy and myocardial infarction also showed significant increases in FGF21 expression in the heart. Additional studies reported increases in cardiac FGF21 expression in obese rats (24), in type 1 diabetes (32), under fasting conditions (25), after endoplasmic reticulum (ER) stress (25), and in pro-oxidative/pro-inflammatory conditions (14). Interestingly, it has been shown that the human heart is also a source of FGF21, increasing in patients suffering from heart failure (14). Collectively, these studies indicate that FGF21 expression is induced in the heart in situations of pathological (e.g., infarct, hypertrophy) or physiological (e.g., fasting) stress, suggesting that FGF21 is a cardioprotective molecule secreted by the heart under conditions of stress.

Insight into the mechanism by which *FGF21* gene expression is regulated in the heart was provided by reports showing that the Sirt1–PPAR α pathway is involved in the transcriptional control of *FGF21* (13, 14). This transcriptional pathway, which is also known to be involved in the regulation of FGF21 expression in the liver in the context of the control of carbohydrate and lipid metabolism (35), was found to play a pivotal role in controlling FGF21 expression and release in cardiac cells. Studies using genetic mouse models showed that cardiac FGF21 expression levels are reduced in PPAR α -null mice and Sirt1-null mice compared with wild-type mice, confirming the involvement of this regulatory pathway in the control of cardiac *FGF21* gene expression. *In vitro* studies of cultured cardiomyocytes further showed that inhibition of PPAR α clearly impairs the induction of FGF21 expression caused by Sirt1 overexpression, indicating that Sirt1 acts through PPAR α (**Figure 1**).

Recently, cellular stresses, including ER stress and mitochondrial dysfunction, have been reported to induce FGF21 expression and release in several cellular systems, and there are indications that these same conditions induce FGF21 expression in the heart. In this context, ER stress inducers, such as the saturated fatty acid palmitate and the ER stressor tunicamycin, were shown to significantly increase FGF21 expression in cardiac cells in culture (26).

Recent findings also underscore the potential role of FGF21 under conditions of mitochondrial dysfunction, with several studies showing that skeletal muscle is an FGF21-producing tissue in mice (36, 37) and humans (38), and that a mitochondrial respiratory chain deficiency leads to induction of FGF21 mRNA expression in skeletal muscle (39). In fact, pharmacological alteration of the mitochondrial respiratory chain in skeletal muscle cells in culture strongly induces FGF21 gene expression and FGF21 protein release into the cell culture medium (37). Moreover, it has been reported that muscle mitochondrial respiratory chain deficiencies in human patients are strongly correlated with increased plasma FGF21 levels (40). In addition, it has been recently reported that, in mouse cardiac tissue, mitochondrial dysfunction and stress responses lead to a dramatic – about 300-fold – induction of FGF21 (41).

The transcription factor, ATF4, might also be involved in the transcriptional control of cardiac *FGF21* expression in response to mitochondrial dysfunction or ER stress situations (25, 41). Most studies have proposed that binding of ATF4 to the *FGF21* gene promoter controls *FGF21* gene transcription in the heart and in skeletal muscle in response to signals elicited by mitochondrial dysfunction and ER stress. However, an ATF4-mediated pathway of *FGF21* induction by mitochondrial dysfunction involving increased ROS production has been found in skeletal muscle (36); whether this pathway operates in cardiac cells remains to be determined.

Although it is thought that the induction of FGF21 expression and release by skeletal muscle under conditions, such as pathogenic mitochondrial dysfunction, is responsible, in whole or in part, for the high systemic levels of FGF21 in patients with mitochondrial diseases, whether cardiac production of FGF21 results in altered systemic levels in physiological or pathogenic conditions studied to date remains unknown. The preponderance of currently available evidence clearly supports an autocrine role of FGF21 production by the heart.

Cardiac FGF21: Autocrine Versus Endocrine Actions

The fact that the heart is both a target and a source of FGF21 raises the possibility of a potential autocrine loop for FGF21 in the myocardium. This possibility was first proposed in our recent study (13), where we showed that FGF21 is expressed in and secreted by cardiac cells in response to cardiac stress, and that secreted FGF21 was able to inhibit cardiac damage. This study demonstrated that the heart locally generates FGF21 via the Sirt1–PPAR α pathway that acts in an autocrine manner to prevent hypertrophy, metabolic dysregulation, and activation of pro-inflammatory pathways in cardiac tissue. Collectively, the findings of this study describe a new mechanism for controlling cardiac inflammation and metabolism by locally produced FGF21. More recently, it was found that autocrine-acting FGF21 released by cardiomyocytes functions as an antioxidant factor in the heart, preventing ROS accumulation (14). In this autocrine loop, FGF21 is downstream of Sirt1, which is activated by upstream signals triggered by FGF21 released into the extracellular space (42). Thus, FGF21 release by cardiac cells appears to be both a cardiac

response to oxidative stress and a signal to prevent ROS overflow. Future studies are expected to fill gaps in our current understanding of the relationship between oxidative stress and FGF21 expression.

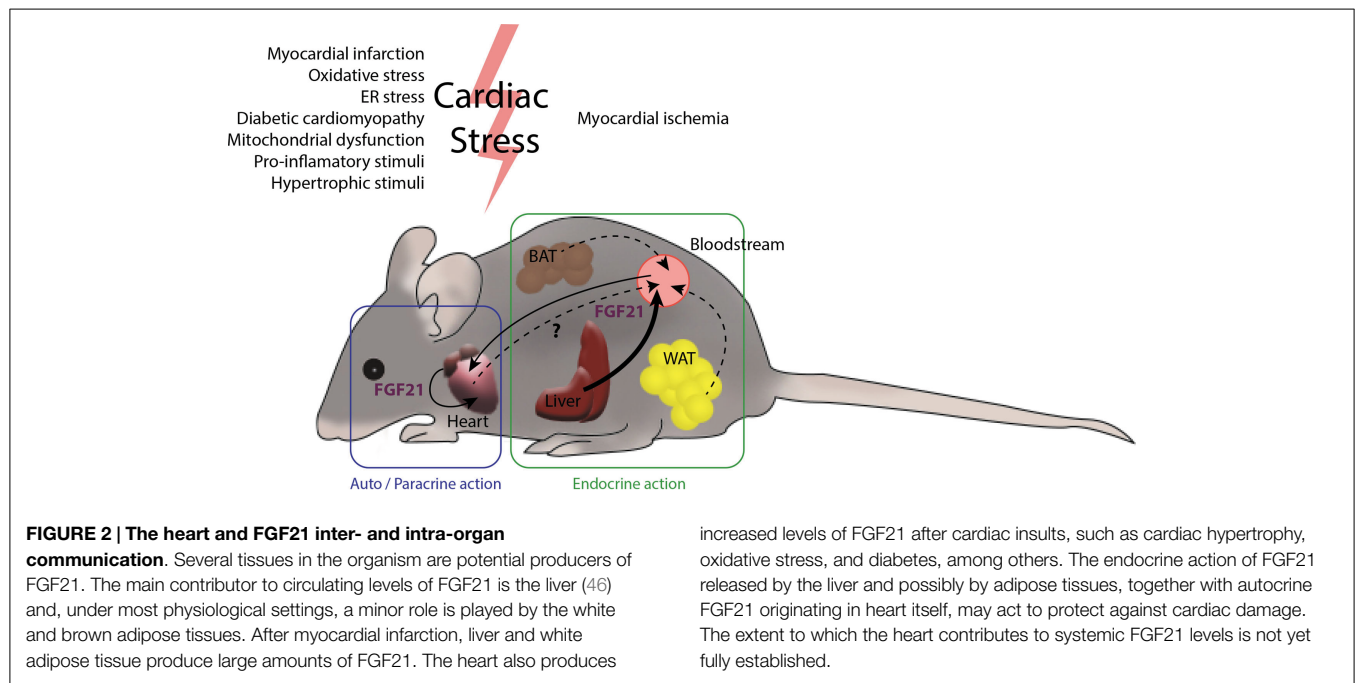
In physiological models of cardiac hypertrophy, such as pregnancy (43), the circulating levels of FGF21 (44) as well as FGF21 expression levels in the heart are increased (45). In this physiological setting, both autocrine and endocrine cardioprotective roles of FGF21 might be at work. In contrast, in pathological hypertrophy, circulating levels of FGF21 are unchanged and FGF21 expression levels are increased only in cardiac tissue, indicating a predominant autocrine role of FGF21 in the heart in this pathological context (13).

The contribution of cardiac FGF21 production to the systemic pool remains to be elucidated. The magnitude of FGF21 expression by the heart compared with that of other tissues known to contribute to systemic FGF21, such as the liver, is relatively low (13), although a contribution of cardiac-derived FGF21 in pathological conditions, in which its production is increased, cannot be excluded. In this context, transgenic mice with cardiac-specific FGF21 overexpression show increased circulating FGF21 levels and altered body mass composition (26), suggesting that FGF21 released by the heart has the potential to act at a distance in an endocrine manner. However, more studies need to be done to elucidate possible endocrine actions of cardiac FGF21 and its actual contributions to whole-body homeostasis in physiological and naturally occurring pathological conditions.

In summary, in addition to the protective role exerted by systemic, circulating FGF21 on the heart, local secretion of FGF21 in the context of cardiac damage may serve as an endogenous, autoregulatory, cardioprotective signaling pathway. Thus, systemic or locally generated FGF21 acts on the myocardium, protecting it from cardiac injury (Figure 2).

FGF21 as a Biomarker for Cardiac Diseases

Several recent clinical studies in humans have explored the role of FGF21 in cardiovascular diseases. As previously mentioned, serum levels of FGF21 are elevated in subjects with adverse lipid profiles, obesity, metabolic syndrome, impaired glucose tolerance, type 2 diabetes mellitus, and hypertension (47, 48). Elevated serum FGF21 levels have also been recently reported in subjects with coronary heart disease or carotid artery plaques independently of established cardiovascular risk factors, suggesting its potential role as a biomarker for atherosclerotic diseases (49–51). Moreover, plasma FGF21 levels have been linked to a higher risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes (52). In addition, serum FGF21 levels are elevated in atrial fibrillation patients in association with atrial remodeling (53). Interestingly, a recent study reported that serum FGF21 levels are independently associated with acute myocardial infarction (54), showing that serum FGF21 levels are markedly increased on the first day after the onset of myocardial infarction and remain high on days 3 and 7; moreover, FGF21 levels were found to be closely related to those of brain natriuretic protein (BNP), a common marker of cardiac diseases. The authors of this study concluded that high levels of



FGF21 might be related to the incidence of re-infarction within 30 days after onset. Collectively, these studies suggest that FGF21 is a potential new biomarker for cardiac diseases.

Conclusion and Perspectives

Several lines of evidence indicate that communication among cardiac cells via secreted factors may contribute to myocardial hypertrophic remodeling (55, 56). Recently, the term cardiomyokine has emerged to describe proteins secreted by the heart that have autocrine, paracrine, and/or endocrine functions crucial for the maintenance of cardiac function (57). Cardiomyokines have been estimated to number between 30 and 60, and include growth factors, endocrine hormones, and cytokines (58, 59). The findings summarized in this review establish FGF21 as a new cardiomyokine crucial for maintaining cardiac function. From a biomedical point of view, the possibility of preventing or even reversing pathological cardiac states and thereby slowing the development of

heart disease is of utmost importance. Collectively, the findings summarized here indicate positive effects of FGF21 on the heart in the context of pathological conditions. Further research is warranted to explore FGF21 as a tool in the development of medical strategies to prevent and/or treat cardiac damage as well for use as a potential biomarker for cardiac diseases. In any case, the intracellular responses evoked by FGF21 represent a new rationale for developing a novel treatment modality based on potentiation of endogenous defenses in diseased hearts.

Acknowledgments

This work was supported by MINECO (grants SAF2014-55725 and SAF2014-55702-JIN), EU (FP7 project BETABAT, grant HEALTH-F2-2011-277713), Generalitat de Catalunya (2014SGR-141), and Fundació BBVA. IR-A was supported by a pre-doctoral fellowship from Gobierno Vasco (Programa de Formación de investigadores del DEUI).

References

1. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* (2007) 5:426–37. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.002
2. Galman C, Lundasen T, Kharitonov A, Bina HA, Eriksson M, Hafstrom I, et al. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPARalpha activation in man. *Cell Metab* (2008) 8:169–74. doi:10.1016/j.cmet.2008.06.014
3. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* (2007) 5:415–25. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.003
4. Muise ES, Azzolina B, Kuo DW, El-Sherbeini M, Tan Y, Yuan X, et al. Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* (2008) 74:403–12. doi:10.1124/mol.108.044826
5. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitonov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* (2008) 582:3805–10. doi:10.1016/j.febslet.2008.10.021
6. Hondares E, Iglesias R, Giral A, Gonzalez FJ, Giral M, Mampel T, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* (2011) 286:12983–90. doi:10.1074/jbc.M110.215889
7. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* (2005) 115:1627–35. doi:10.1172/JCI23606
8. Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giral M, Iglesias R, Villarroya F. 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* (2010) 11:206–12. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.001

9. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* (2012) **26**:271–81. doi:10.1101/gad.177857.111
10. Kharitonov A, Dunbar JD, Bina HA, Bright S, Moyers JS, Zhang C, et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by beta-Klotho. *J Cell Physiol* (2008) **215**:1–7. doi:10.1002/jcp.21357
11. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Elisenkova AV, et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* (2007) **282**:26687–95. doi:10.1074/jbc.M704165200
12. Fon TK, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, et al. Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* (2010) **24**:2050–64. doi:10.1210/me.2010-0142
13. Planavila A, Redondo I, Hondares E, Vinciguerra M, Munts C, Iglesias R, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* (2013) **4**:2019. doi:10.1038/ncomms3019
14. Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, Garrabou G, Casademont J, Giral M, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res* (2015) **106**:19–31. doi:10.1093/cvr/cvu263
15. Liu SQ, Roberts D, Kharitonov A, Zhang B, Hanson SM, Li YC, et al. Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci Rep* (2013) **3**:2767. doi:10.1038/srep02767
16. Joki Y, Ohashi K, Yuasa D, Shibata R, Ito M, Matsuo K, et al. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* (2015) **459**:124–30. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.081
17. Aubert G, Vega RB, Kelly DP. Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1833**:840–7. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.015
18. Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2002) **29**:339–45. doi:10.1046/j.1440-1681.2002.03655.x
19. Schilling J, Lai L, Sambandam N, Dey CE, Leone TC, Kelly DP. Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor $\{\gamma\}$ coactivator-1 signaling. *Circ Heart Fail* (2011) **4**:474–82. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.959833
20. Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, et al. The p65 subunit of NF- κ B binds to PGC-1 α , linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res* (2010) **87**:449–58. doi:10.1093/cvr/cvq080
21. Stachowiak EK, Fang X, Myers J, Dunham S, Stachowiak MK. cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *J Neurochem* (2003) **84**:1296–312. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01624.x
22. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res* (2008) **79**:208–17. doi:10.1093/cvr/cvn098
23. Eisele PS, Salatino S, Sobek J, Hottiger MO, Handschin C. The PGC-1 coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* (2013) **288**:2246–60. doi:10.1074/jbc.M112.375253
24. Patel V, Adya R, Chen J, Ramanjaneya M, Bari MF, Bhudia SK, et al. Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One* (2014) **9**:e87102. doi:10.1371/journal.pone.0087102
25. Brahma MK, Adam RC, Pollak NM, Jaeger D, Zierler KA, Poehler N, et al. Fibroblast growth factor 21 is induced upon cardiac stress and alters cardiac lipid homeostasis. *J Lipid Res* (2014) **55**:2229–41. doi:10.1194/jlr.M044784
26. Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, Deeg MA, Holland WL, et al. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* (2013) **18**:333–40. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.005
27. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* (2010) **59**:2781–9. doi:10.2337/db10-0193
28. Villarroya J, Flachs P, Redondo-Angulo I, Giral M, Medrikova D, Villarroya F, et al. Fibroblast growth factor-21 and the beneficial effects of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* (2014) **49**:1081–9. doi:10.1007/s11745-014-3948-x
29. Gallego-Escuredo JM, Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Domingo P, Giral M, Fruhbeck G, et al. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int J Obes (Lond)* (2014) **39**:121–9. doi:10.1038/ijo.2014.76
30. Diaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, Giral M, Caelles C, Villarroya F. TNF- α represses beta-Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* (2012) **153**:4238–45. doi:10.1210/en.2012-1193
31. Yan X, Chen J, Zhang C, Zhou S, Zhang Z, Chen J, et al. FGF21 deletion exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating cardiac lipid accumulation. *J Cell Mol Med* (2015) **19**:1557–68. doi:10.1111/jcmm.12530
32. Zhang C, Huang Z, Gu J, Yan X, Lu X, Zhou S, 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* (2015) **58**:1937–48. doi:10.1007/s00125-015-3630-8
33. Liu SQ, Wu YH. Liver cell-mediated alleviation of acute ischemic myocardial injury. *Front Biosci (Elite Ed)* (2010) **2**:711–24. doi:10.2741/e131
34. Liu SQ, Tefft BJ, Roberts DT, Zhang LQ, Ren Y, Li YC, et al. Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2012) **303**:H1446–58. doi:10.1152/ajpheart.00362.2012
35. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* (2009) **9**:327–38. doi:10.1016/j.cmet.2009.02.006
36. Kim KH, Jeong YT, Oh H, Kim SH, Cho JM, Kim YN, et al. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat Med* (2013) **19**:83–92. doi:10.1038/nm.3014
37. Ribas F, Villarroya J, Hondares E, Giral M, Villarroya F. FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochem J* (2014) **463**:191–9. doi:10.1042/BJ20140403
38. Hojman P, Pedersen M, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Yfanti C, Akerstrom T, et al. Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes* (2009) **58**:2797–801. doi:10.2337/db09-0713
39. Tynniismaa H, Carroll CJ, Raimundo N, Ahola-Erkkila S, Wenz T, Ruhanen H, et al. Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum Mol Genet* (2010) **19**:3948–58. doi:10.1093/hmg/ddq310
40. Suomalainen A, Elo JM, Pietilainen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol* (2011) **10**:806–18. doi:10.1016/S1474-4422(11)70155-7
41. Dogan SA, Pujol C, Maiti P, Kukut A, Wang S, Hermans S, et al. Tissue-specific loss of DARS2 activates stress responses independently of respiratory chain deficiency in the heart. *Cell Metab* (2014) **19**:458–69. doi:10.1016/j.cmet.2014.02.004
42. Di LF, Itoh N. Cardiac Fgf21 synthesis and release: an autocrine loop for boosting up antioxidant defenses in failing hearts. *Cardiovasc Res* (2015) **106**:1–3. doi:10.1093/cvr/cvv050
43. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, et al. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* (2005) **96**:1208–16. doi:10.1161/01.RES.0000170652.71414.16
44. Cui Y, Giesy SL, Hassan M, Davis K, Zhao S, Boisclair YR. Hepatic FGF21 production is increased in late pregnancy in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2014) **307**:R290–8. doi:10.1152/ajpregu.00554.2013
45. Redondo-Angulo I, Planavila A, Giral M, Villarroya F. Involvement of fibroblast growth factor-21 in gestation-induced cardiac hypertrophy. *Eur Heart J* (2014) **35**(Suppl 1):554–5. doi:10.1093/eurheartj/ehu324
46. Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD, Mangelsdorf DJ, Klierer SA, et al. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* (2014) **63**:4057–63. doi:10.2337/db14-0595
47. Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* (2008) **57**:1246–53. doi:10.2337/db07-1476
48. Semba RD, Crasto C, Strait J, Sun K, Schaumberg DA, Ferrucci L. Elevated serum fibroblast growth factor 21 is associated with hypertension in community-dwelling adults. *J Hum Hypertens* (2013) **27**:397–9. doi:10.1038/jhh.2012.52
49. Chow WS, Xu A, Woo YC, Tso AW, Cheung SC, Fong CH, et al. Serum fibroblast growth factor-21 levels are associated with carotid atherosclerosis independent

- of established cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2013) **33**:2454–9. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301599
50. Lin Z, Wu Z, Yin X, Liu Y, Yan X, Lin S, et al. Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile. *PLoS One* (2010) **5**:e15534. doi:10.1371/journal.pone.0015534
 51. An SY, Lee MS, Yi SA, Ha ES, Han SJ, Kim HJ, et al. Serum fibroblast growth factor 21 was elevated in subjects with type 2 diabetes mellitus and was associated with the presence of carotid artery plaques. *Diabetes Res Clin Pract* (2012) **96**:196–203. doi:10.1016/j.diabres.2012.01.004
 52. Ong KL, Januszewski AS, O'Connell R, Jenkins AJ, Xu A, Sullivan DR, et al. The relationship of fibroblast growth factor 21 with cardiovascular outcome events in the fenofibrate intervention and event lowering in diabetes study. *Diabetologia* (2015) **58**:464–73. doi:10.1007/s00125-014-3458-7
 53. Han X, Chen C, Cheng G, Xie C, Yang M, Shou X, et al. Serum fibroblast growth factor 21 levels are increased in atrial fibrillation patients. *Cytokine* (2015) **73**:176–80. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.019
 54. Zhang W, Chu S, Ding W, Wang F. Serum level of fibroblast growth factor 21 is independently associated with acute myocardial infarction. *PLoS One* (2015) **10**:e0129791. doi:10.1371/journal.pone.0129791
 55. Fredj S, Bescond J, Louault C, Potreau D. Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* (2005) **202**:891–9. doi:10.1002/jcp.20197
 56. Gnechi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* (2005) **11**:367–8. doi:10.1038/nm0405-367
 57. Doroudgar S, Glembotski CC. The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. *Trends Mol Med* (2011) **17**:207–14. doi:10.1016/j.molmed.2010.12.003
 58. Frost RJ, Engelhardt S. A secretion trap screen in yeast identifies protease inhibitor 16 as a novel antihypertrophic protein secreted from the heart. *Circulation* (2007) **116**:1768–75. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.696468
 59. Stastna M, Chimenti I, Marban E, Van Eyk JE. Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. *Proteomics* (2010) **10**:245–53. doi:10.1002/pmic.200900515

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Planavila, Redondo-Angulo and Villarroya. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

