



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**Departamento de Biotecnología**

**&**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN**

**SANITARIA LA FE**

**Grupo de Disfunción Miocárdica y**

**Trasplante Cardíaco**

**BASES GENÓMICAS Y CELULARES DE LA  
CONTRACCIÓN VENTRICULAR.  
PAPEL DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO  
Y LOS CANALES IÓNICOS EN LA  
INSUFICIENCIA CARDÍACA HUMANA**

**TESIS DOCTORAL**

**PRESENTADA POR:**

**ANA ORTEGA GUTIÉRREZ**

**DIRIGIDA POR:**

**Jose Miguel Rivera Otero**

**Manuel Portolés Sanz**

**Esther Roselló Lletí**

**JUNIO, 2016**



Hospital Universitario y Politécnico La Fe  
Instituto de Investigación Sanitaria La Fe  
Valencia

**D. J. MIGUEL RIVERA OTERO**, Investigador Principal del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia,

**D. MANUEL PORTOLÉS SANZ**, Facultativo Especialista del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia y

**Dña. ESTHER ROSELLÓ LLETÍ**, Investigadora Doctora del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

Que **Dña. ANA ORTEGA GUTIÉRREZ**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, en el grupo acreditado de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco, el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral, que se presenta bajo el título de: “BASES GENÓMICAS Y CELULARES DE LA CONTRACCIÓN VENTRICULAR. PAPEL DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y LOS CANALES IÓNICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA HUMANA”.

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 8 de Junio de 2016

Fdo. Dr. J. Miguel  
Rivera Otero

Fdo. Dr. Manuel  
Portolés Sanz

Fdo. Dra. Esther  
Roselló Lletí

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- “Implantación de un programa multidisciplinar de gestión de pacientes con insuficiencia cardíaca”. RD06/0003/1001, Red de Investigación en Insuficiencia Cardíaca (REDINSCOR), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Cinética del transporte núcleo-citoplasmático de los cardiomiocitos humanos en la insuficiencia cardíaca. Análisis celular y de expresión génica”. PI-10/00275, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Alteraciones moleculares y estructurales en la insuficiencia cardíaca”. RD12/0042/0003, Red de Investigación Cardiovascular (RIC), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Transporte núcleo citoplasma y cambios de expresión génica en la insuficiencia cardíaca. Puesta en marcha de una nueva estrategia terapéutica” PI-13/00100, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dr. J. Miguel Rivera Otero.
- “Seguimiento de pacientes sometidos a trasplante cardíaco. Estudio de marcadores de rechazo implicados en el transporte núcleo-citoplasma”. PI-14/01506, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). IP: Dra. Esther Roselló Lletí.
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

*A mi padre*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, mi agradecimiento a los directores de esta Tesis Doctoral, el Dr. Miguel Rivera, el Dr. Manuel Portolés y la Dra. Esther Roselló. A Miguel, por haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora, por su exigencia y críticas constructivas que me han hecho madurar profesionalmente. A Manolo, le agradezco su colaboración en el trabajo y enseñanza, sus buenos consejos y el compañerismo y positividad que me ha transmitido durante estos años. A Esther, gracias por enseñarme tanto, por su apoyo y orientación, por ser una gran compañera y por hacerme ver el vaso siempre medio lleno y que el esfuerzo merece la pena.

Al personal de la Unidad de Coordinación de Trasplantes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe por su cooperación en la obtención de muestras cardíacas.

Al Dr. Rafael Sirera del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, por su estrecha colaboración y ayuda durante mi periodo como doctoranda.

Al Dr. Enrique Lara-Pezzi, a Marina López y sus compañeros del Grupo de Regulación Molecular de la Insuficiencia Cardíaca del CNIC en Madrid, por haberme acogido en su laboratorio y hacer mi estancia muy agradable, amena y productiva.

A mis queridas compañeras durante todos estos años, Estefanía y Esther. Gracias de todo corazón por acogerme desde el primer día, por enseñarme y ayudarme en mi trabajo, por los buenos consejos que me han dado. Por apoyarme en las malas épocas y por las risas en las buenas, y, sobre todo, por esos momentos inolvidables en las largas noches de trasplante y las divertidas anécdotas vividas juntas todo este tiempo. A Estefanía, de nuevo, que ha sido una buenísima compañera en este camino compartido hacia la tesis, gracias por aconsejarme y ayudarme tanto en todo y por esa complicidad que me ha mostrado siempre. A Carolina, aunque lleva menos tiempo con nosotros, le

agradezco todo su apoyo y colaboración y sobre todo esos buenos momentos que hemos tenido juntas.

También quiero dar las gracias a los “Colegas” del Instituto de Investigación. A Inma, Pili y Amparo, por acogerme desde el principio como una más, por enseñarme sus “trucos” de laboratorio y valiosos consejos y sobre todo por esas risas compartidas. A Lorena, Roger, Ana, Toni, Dolors, Silvia y Pili, por mostrarse siempre dispuestos a ayudarme y por su colaboración en este trabajo.

A mis amigos de toda la vida quiero darles las gracias por la curiosidad que han mostrado siempre por mi trabajo y sobre todo por esas risas juntos en los momentos de estrés.

Por último, aunque no menos importante, quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres, por educarme y darme la oportunidad de escoger este camino, por apoyarme e interesarse siempre por mi trabajo, especialmente a mi madre por su apoyo y comprensión en los momentos difíciles que hemos vivido juntas. A David, muchísimas gracias por su paciencia, por ayudarme en todo y hacerme la vida más fácil, pero principalmente, gracias por sacarme una sonrisa en los malos momentos y por su apoyo incondicional todos estos años.

Muchas gracias a todos por haber colaborado de un modo u otro en esta etapa de mi vida, profesional y personalmente.



## RESUMEN

La insuficiencia cardíaca es un síndrome multifactorial que se acompaña de alteraciones en la función ventricular y dilatación de las cámaras cardíacas, siendo causa de aumento de morbilidad, mortalidad y gasto sanitario. Las miocardiopatías dilatada e isquémica son causas muy frecuentes de este síndrome. A pesar de los avances que se han producido en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, el pronóstico no ha mejorado significativamente en los últimos años. Es por ello, que existe una necesidad de desarrollar nuevas estrategias para su tratamiento, dada la eficacia limitada de las terapias actuales.

Este síndrome puede estar asociado a alteraciones en la contracción del corazón. El retículo endoplásmico es el principal almacén de calcio intracelular necesario para el inicio del proceso de contracción del corazón. Por otro lado, los canales iónicos regulan la contracción del músculo cardíaco y son responsables de las corrientes de iones que determinan e influyen sobre el potencial de acción cardíaco.

En esta Tesis nos planteamos estudiar, en un grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca, los cambios existentes en las proteínas que conforman la estructura y participan en la respuesta a estrés del retículo endoplásmico, así como analizar la expresión génica de canales iónicos cardíacos y relacionar estas alteraciones con la disfunción ventricular de estos pacientes.

Nuestros resultados muestran la presencia de alteraciones en la mayoría de proteínas estructurales y de respuesta a estrés del retículo endoplásmico, siendo RRBP1 la que presenta relaciones significativas

con la disfunción cardíaca de los pacientes y también con la proteína de estrés XBP1. Ello evidencia una dependencia específica entre estructura y estrés de este orgánulo y una influencia de estas alteraciones estructurales sobre la función ventricular de los pacientes.

Además, mostramos diferentes cambios de expresión en un gran número de canales iónicos cardíacos mediante microarrays y secuenciación de ARN. De estos canales, en la miocardiopatía dilatada encontramos que los niveles reducidos de *CACNG8* se relacionan con una mejora en la función y los niveles aumentados de *KCNJ2* y *KCNN3* se relacionan con una mayor disfunción ventricular. En el caso de estas alteraciones en la miocardiopatía isquémica, los niveles reducidos del canal *TRPM7* favorecen una mejora de la función del ventrículo izquierdo. La expresión génica diferencial de esta categoría en ambas miocardiopatías, podría explicar las alteraciones en las diferentes corrientes iónicas que afectan al proceso de contracción del miocardio en la insuficiencia cardíaca.

En conclusión, demostramos la presencia de alteraciones en dos componentes clave para la contracción del miocardio que pueden proporcionar nuevas bases para su estudio y regulación como diana de posibles tratamientos para la mejora de la alteración en la contractilidad del corazón en pacientes con insuficiencia cardíaca.

## **RESUM**

La insuficiència cardíaca és una síndrome multifactorial que s'acompanya d'alteracions en la funció ventricular i dilatació de les cambres cardíques, a més de ser causa d'augment de morbiditat, mortalitat i cost sanitari. Les miocardiopaties dilatada i isquèmica són causes molt freqüents d'esta síndrome. A pesar dels avanços que s'han produït en el tractament de la insuficiència cardíaca, el pronòstic no ha millorat significativament en els últims anys. És per això que hi ha una necessitat de desenvolupar noves estratègies per al seu tractament, donada l'eficàcia limitada de les teràpies actuals.

Esta síndrome s'associa amb alteracions en la contracció del cor. El reticle endoplàsmic és el principal magatzem de calci intracel·lular necessari per a l'inici del procés de contracció del cor. D'altra banda, els canals iònics regulen la contracció del múscul cardíac i són responsables dels corrents d'ions que determinen i influïxen sobre el potencial d'acció cardíac.

En esta Tesi ens plantegarem estudiar, en un grup de pacients amb insuficiència cardíaca, els canvis existents en les proteïnes que conformen l'estructura i participen en la resposta a estrés del reticle endoplàsmic, així com analitzar l'expressió gènica de canals iònics cardíacs i relacionar estes alteracions amb la disfunció ventricular dels pacients.

Els nostres resultats mostren la presència d'alteracions en la majoria de proteïnes estructurals i de resposta a estrés del reticle endoplàsmic, sent la proteïna estructural RRBP1 la que presenta

relacions significatives amb la disfunció cardíaca dels pacients i també amb la proteïna d'estrés XBP1. Això evidencia una dependència específica entre estructura i estrés d'este orgànu i una influència d'estes alteracions estructurals sobre la funció ventricular dels pacients. A més, mostrem diferents canvis d'expressió en un gran nombre de canals iònics cardíacs per mitjà de microarrays i seqüenciació d'ARN. D'estos canals, trobem que els nivells reduïts de *CACNG8* es relacionen amb una millora en la funció i els nivells augmentats de *KCNJ2* i *KCNN3* es relacionen amb una major disfunció ventricular en la miocardiopatia dilatada. En el cas d'estes alteracions en la miocardiopatia isquèmica, els nivells reduïts del canal *TRPM7* afavorixen una millora de la funció del ventricle esquerre. L'expressió gènica diferencial d'esta categoria en ambdós miocardiopaties, podria explicar les alteracions en els diferents corrents iònics que afecten el procés de contracció del miocardi en la insuficiència cardíaca.

En conclusió, demostrem la presència d'alteracions en dos components clau per a la contracció del miocardi que poden proporcionar noves bases per al seu estudi i regulació com a diana de possibles tractaments per a la millora de l'alteració en la contractilitat del cor en pacients amb insuficiència cardíaca.

## **ABSTRACT**

Heart failure is a multifactorial syndrome characterized by alterations in ventricular function and cardiac chambers dilation, being a cause of increase of morbidity, mortality and health costs. Dilated and ischemic cardiomyopathies are frequent causes of this syndrome. Despite the progress in treatment of heart failure, the prognosis has not improved significantly in the last years, because of that, we need a development of novel treatment strategies, given the limited efficacy of current therapies.

This syndrome can be associated to alterations in heart contraction. Endoplasmic reticulum is the major intracellular calcium storage necessary for heart contraction onset. On the other hand, ion channels regulate heart contraction and are responsible for the ion currents that determine and influence the action potential of heart muscle.

In this Thesis we aimed to study, in a group of patients with heart failure, the changes existing in the structural and stress response proteins of the endoplasmic reticulum, as well as the gene expression of cardiac ion channels, relating these alterations with ventricular dysfunction of these patients.

Our results showed the presence of alterations in the majority of structural and stress proteins of the endoplasmic reticulum, being the structural protein RRBP1 related to ventricular dysfunction and also to the stress protein XBP1. This evidences a specific dependency between stress and structure in this organelle and an influence of structural changes in ventricular function of patients.

Additionally, we showed different expression changes of a large number of cardiac ion channels through microarrays and RNA sequencing techniques. Of these channels, down-regulation of *CACNG8* related to ventricular function improvement and increased levels of *KCNJ2* and *KCNN3* with ventricular dysfunction in dilated cardiomyopathy. In ischemic cardiomyopathy, reduced levels of *TRPM7* channel were related to a better ventricular function. Differential gene expression of this category in both cardiomyopathies, could explain the changes in the different ion currents that affect the myocardial contraction process in heart failure.

In conclusion, we show alterations in the expression of two key components of cardiac muscle contraction that could provide novel basis for their study and regulation as possible therapeutic targets for the improvement of cardiac contractility in patients with heart failure.

## **ABREVIATURAS**

ACC, *American College of Cardiology*

ATF4, *activating transcription factor 4*

ATF6, *activating transcription factor 6*

AHA, *American heart Association*

CKAP4, *cytoskeleton-associated protein 4*

CI, canales iónicos

CNT, control

DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo

DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo

ECG, electrocardiograma

eIF2 $\alpha$ , *eukaryotic initiation factor 2 alpha*

ESC, Sociedad Europea de Cardiología

FA, fracción de acortamiento

FE, fracción de eyección

GRP78, *glucose-related protein 78*

IC, insuficiencia cardíaca

IRE1, *inositol-requiring protein-1*

MCD, miocardiopatía dilatada

MCI, miocardiopatía isquémica

NYHA, *New York Heart Association*

PERK, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*

RE, retículo endoplásmico

RNA-seq, secuenciación de ARN

RRBP1, *ribosomal receptor-binding protein 1*

RT-qPCR, PCR cuantitativa en tiempo real

UPR, *unfolded protein response*

VI, ventrículo izquierdo

XBP1, *X-box binding protein 1*

# ÍNDICE

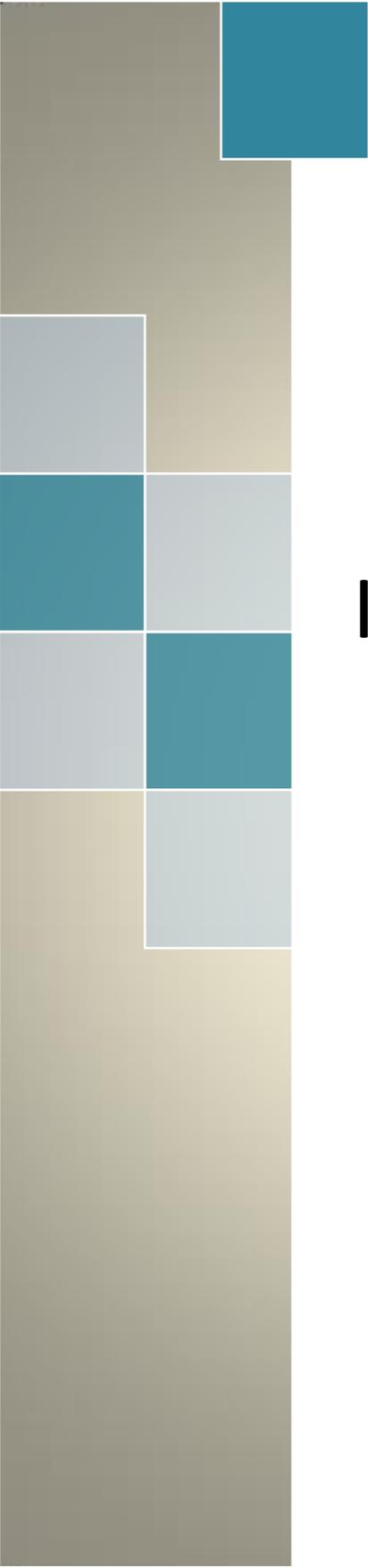


<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. INSUFICIENCIA CARDÍACA</b>	<b>2</b>
1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	2
1.1.1. Definición	2
1.1.2. Clasificación	3
1.2. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	7
1.2.1. Diagnóstico	7
1.2.2. Tratamiento	9
1.3. FACTORES DE RIESGO Y COMORBILIDADES	11
1.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ETIOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS	12
1.4.1. Prevalencia, incidencia y pronóstico	12
1.4.2. Etiología	13
1.4.3. Fisiopatología	16
<b>2. LA CONTRACCIÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA</b>	<b>19</b>
2.1. PROCESO DE CONTRACCIÓN DEL CORAZÓN	19
2.2. COMPONENTES CELULARES IMPLICADOS EN LA CONTRACCIÓN	22
2.2.1. Fibras musculares cardíacas	22
2.2.2. Estructuras celulares implicadas en la contracción	23
2.2.3. Proteínas implicadas en la contracción	26
2.3. MECANISMO DE CONTRACCIÓN DE LAS FIBRAS CARDÍACAS	29
2.4. EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA CONTRACCIÓN CARDÍACA	31
2.4.1. Localización y estructura del retículo endoplásmico	31
2.4.2. Implicación del retículo endoplásmico en la contracción cardíaca	33
2.4.3. Estrés y respuesta a estrés del retículo endoplásmico	34
2.4.4. Alteraciones del retículo endoplásmico relacionadas con la insuficiencia cardíaca	38
2.5. IMPLICACIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS DE MEMBRANA EN LA CONTRACCIÓN CARDÍACA	40
2.5.1. Estructura de los canales iónicos	40
2.5.2. Localización y función de los canales iónicos	41
2.5.3. Tipos y clasificación de los canales iónicos	42
2.5.4. Los potenciales de acción cardíacos e implicación de los canales iónicos	51
2.5.5. Alteraciones de los canales iónicos en la insuficiencia cardíaca	55

<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> -----	<b>56</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> -----	<b>59</b>
<b>1. GRUPOS CLÍNICOS</b> -----	<b>60</b>
<b>2. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE TEJIDO CARDÍACO</b> -----	<b>64</b>
2.1. OBTENCIÓN -----	64
2.2. PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO-----	65
<b>3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO MIOCÁRDICO</b> -----	<b>66</b>
3.1. HOMOGENIZACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN PROTEICA TOTAL-----	66
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA-----	66
3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT -----	68
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-----	68
3.3.2. Transferencia en seco-----	71
3.3.3. Tinción de geles -----	73
3.3.4. Inmunodetección de proteínas -----	74
3.4. INMUNOFLUORESCENCIA -----	77
3.4.1. Inclusión en parafina -----	77
3.4.2. Corte y desparafinación -----	77
3.4.3. Inmunodetección -----	78
3.5. MICROARRAYS DE ADN-----	80
3.5.1. Extracción de ARN total -----	81
3.5.2. Tratamiento con DNAsa y precipitación de ARN total -----	83
3.5.3. Retrotranscripción a ADNc para su uso en microarrays de ADN -----	84
3.5.4. Fragmentación y marcaje de ADNc -----	85
3.5.5. Hibridación en microarrays de Affymetrix -----	85
3.5.6. Análisis computacional de los resultados -----	87
3.6. TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN DE ARN -----	88
3.6.1. Extracción de ARN poli (A) -----	89
3.6.2. Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN -----	91
3.6.3. Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo -----	94
3.6.4. Preparación de <i>Templated Beads</i> -----	97
3.6.5. Secuenciación -----	103
3.6.6. Análisis computacional de los resultados -----	106

3.7. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL -----	107
3.7.1. Técnica de RT-qPCR-----	107
3.7.2. Extracción y precipitación de ARN y retrotranscripción a ADNc-----	109
3.7.3. Reacción de RT-qPCR-----	111
3.7.4. Cuantificación relativa de la expresión génica -----	113
<b>4. CARACTERIZACIÓN EN CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES -----</b>	<b>116</b>
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS-----</b>	<b>118</b>
<b>6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO-----</b>	<b>119</b>
<b>IV. RESULTADOS-----</b>	<b>120</b>
<b>1. ESTUDIO SOBRE LAS ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA-----</b>	<b>121</b>
1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES -----	121
1.2. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO -----	123
1.3. NIVELES DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO -----	126
1.4. DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO -----	129
1.5. CORRELACIONES ENTRE PROTEÍNAS DE ESTRÉS Y ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA -----	130
<b>2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA MEDIANTE MICROARRAYS-----</b>	<b>131</b>
2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES -----	131
2.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA -----	133
2.3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS POR RT-qPCR-----	135
2.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA -----	136
2.5. CARACTERIZACIÓN DE RUTAS FUNCIONALES-----	137
<b>3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN-----</b>	<b>139</b>
3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES -----	139
3.2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA -----	143

3.3. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE GENES ALTERADOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA-----	146
3.4. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DE ARN EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA-----	147
3.5. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE GENES ALTERADOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA-----	149
3.6. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CANALES IÓNICOS CARDÍACOS Y LOS PARÁMETROS DE FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO -----	150
3.7. VALIDACIÓN POR RT-qPCR DE LOS GENES RELACIONADOS CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR -----	152
3.8. ANÁLISIS PROTEICO DE LOS CANALES IÓNICOS RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO -----	154
<b>V. DISCUSIÓN -----</b>	<b>156</b>
1. ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE RESPUESTA A ESTRÉS Y ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA-----	157
2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA. ESTUDIO DE MICROARRAYS-----	163
3. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DE ARN-----	171
<b>VI. CONCLUSIONES -----</b>	<b>172</b>
<b>VII. REFERENCIAS -----</b>	<b>172</b>



# I. INTRODUCCIÓN



## **1. INSUFICIENCIA CARDÍACA**

### **1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN**

#### **1.1.1. Definición**

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome en el que el corazón no puede mantener un suministro de oxígeno acorde a las necesidades de los tejidos metabólicos del organismo, a causa de la presencia de una anomalía en la función o estructura cardíacas (1).

El Grupo de Trabajo de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) define la IC como un síndrome en el que los pacientes presentan una serie de síntomas, como la disnea tanto en reposo como al realizar ejercicio, fatiga y edemas en los tobillos; acompañado de signos típicos, como la presión venosa yugular elevada, crepitaciones pulmonares y latido apical desplazado, que se producen como consecuencia de una alteración en la estructura o la función cardíacas (2).

Además de esta definición, deben destacarse otros términos relacionados como la IC aguda, crónica, sistólica, diastólica, izquierda y derecha. En primer lugar, la IC aguda se caracteriza por una repentina aparición de los signos y síntomas, como por ejemplo por la presencia de un infarto agudo de miocardio, que están relacionados con una función cardíaca anormal y que puede manifestarse con o sin previo diagnóstico de enfermedad cardíaca (3). En segundo lugar, la IC crónica es aquella que se produce durante un periodo de tiempo prolongado (2).

Por otro lado, la IC sistólica hace referencia a una alteración en la capacidad de contracción del ventrículo, que se observa clínicamente por

una reducción en la fracción de eyección (FE) ventricular. La IC diastólica es aquella en la que existe una alteración en la relajación y una dificultad de llenado por parte de los ventrículos. Se diagnostica cuando los síntomas y signos de la IC ocurren en presencia de una FE del ventrículo izquierdo (VI) preservada. Es muy común que si existe una disfunción ventricular sistólica, ésta vaya acompañada por una afectación diastólica, por lo que ambos tipos no deben considerarse como entidades fisiopatológicas separadas. Suele ser más adecuado el término de IC con FE preservada o dañada. La disfunción diastólica es poco frecuente en pacientes jóvenes, mientras que su importancia aumenta en ancianos, siendo las mujeres el grupo en que es más frecuente (4).

La IC izquierda y derecha pueden tener como causa más habitual la enfermedad de las arterias coronarias (manifestada por cardiopatía isquémica, angina de pecho e infarto de miocardio). Causa más específica de la IC izquierda es la hipertensión arterial. Mientras que la IC derecha añade como causa frecuente la hipertensión pulmonar (4).

### 1.1.2. Clasificación

Existen dos clasificaciones principales que proporcionan información muy útil y complementaria sobre la presencia y severidad de la IC. Sin embargo, estas dos clasificaciones difieren en los aspectos en los que se basan para establecer los estadios de la enfermedad.

### 1.1.2.1. Clasificación funcional según la *New York Heart Association*

La clasificación funcional de la *New York Heart Association* (NYHA) (Tabla 1) se utiliza comúnmente en la selección de pacientes que forman parte de casi todos los ensayos aleatorizados de tratamiento de la IC, y por lo tanto, para describir qué pacientes se benefician de tratamientos eficaces, utilizándose ampliamente en la práctica clínica y la investigación.

**Tabla 1.** Clasificación funcional según la *New York Heart Association* basada en la gravedad de los síntomas y la actividad física.

<b>Clase I</b>	Sin limitación para la actividad física. La actividad física normal no causa excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
<b>Clase II</b>	Ligera limitación para la actividad física. Cómodo en reposo pero la actividad física normal resulta en excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
<b>Clase III</b>	Marcada limitación para la actividad física. Cómodo en reposo, si bien, una actividad física menor de lo normal resulta en excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
<b>Clase IV</b>	Incapacidad para mantener actividad física sin molestias. Puede haber síntomas en reposo. Si se realiza alguna actividad física, las molestias aumentan

(Extraída de McMurray J et al. *Guía de práctica clínica de la ESC sobre diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica 2012. Rev Esp Cardiol. 2012;65:938.e1-e59*).

En esta clasificación, la severidad de la IC está basada en el estado sintomático y en la capacidad de realizar actividades físicas (2). Es un tipo de clasificación que implica un enfoque más subjetivo por parte del clínico y puede cambiar frecuentemente en cortos periodos de tiempo. Aunque la reproducibilidad y validez pueden ser problemáticos, la clasificación funcional de la NYHA es un predictor independiente de mortalidad (5). Los

pacientes clasificados en la Clase I de la NYHA no presentan síntomas atribuibles a la cardiopatía; siendo los de las clases II, III y IV los que poseen síntomas de carácter leve, moderado y grave, respectivamente (2).

### 1.1.2.2. Clasificación según la *American College of Cardiology/American Heart Association* (ACC/AHA)

En la clasificación de la IC que establecen estas instituciones, se acentúa la importancia de reconocer a los pacientes que se encuentran en alto riesgo de padecer IC y se centran en la corrección de los principales factores de riesgo para la enfermedad. En esta clasificación, la severidad de la IC se basa en la estructura y el daño producido en el músculo cardíaco. Se enfatiza el desarrollo y progresión del síndrome y puede ser usada para describir individuos y poblaciones (5) (Tabla 2).

Asimismo, se reconoce que tanto los factores de riesgo como las anormalidades de la estructura cardíaca se encuentran asociados a la IC. Los estadios del síndrome establecidos por esta clasificación son progresivos, es decir, una vez el paciente aumenta a un estadio más elevado, es imposible la regresión hacia un estadio más temprano. La progresión en las fases de IC está asociada con una reducción de la supervivencia a 5 años y un aumento de las concentraciones en plasma de péptidos natriuréticos. Las intervenciones que se llevan a cabo en cada estadio van enfocadas a una reducción de los factores de riesgo (Clase A), tratamiento estructural de la enfermedad cardíaca (Clase B) y reducción de la morbilidad y mortalidad (Clases C y D). Además, se reconoce que es un síndrome altamente prevenible (por el control de la presión arterial y otros

factores de riesgo) y que va precedido generalmente por anomalías cardiovasculares funcionales y estructurales asintomáticas (6).

**Tabla 2.** Clasificación de la insuficiencia cardíaca según la *American College Cardiology* y *American Heart Association*.

Clase	Descripción	Ejemplo
A	Alto riesgo, sin síntomas	Hipertensión, enfermedad de las arterias coronarias, diabetes mellitus
B	Enfermedad estructural del corazón, sin signos ni síntomas	Hipertrofia ventricular izquierda, disfunción sistólica asintomática del ventrículo izquierdo
C	Enfermedad estructural del corazón, síntomas previos o actuales	Disnea o fatiga debida a insuficiencia cardíaca
D	Enfermedad estructural del corazón, síntomas refractarios que requieren intervenciones especializadas	Insuficiencia cardíaca en etapa terminal

(Modificada de Mosterd A et al. *Clinical epidemiology of heart failure*. *Heart* 2007;93:1137-46).

## 1.2. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

### 1.2.1. Diagnóstico

El diagnóstico de IC resulta complicado, sobre todo si se trata de las etapas iniciales del síndrome. Esto se debe a que la mayoría de los síntomas y signos no son específicos (Tabla 3), lo que no ayuda a discriminar entre IC y otras enfermedades.

**Tabla 3.** Síntomas y signos de insuficiencia cardíaca.

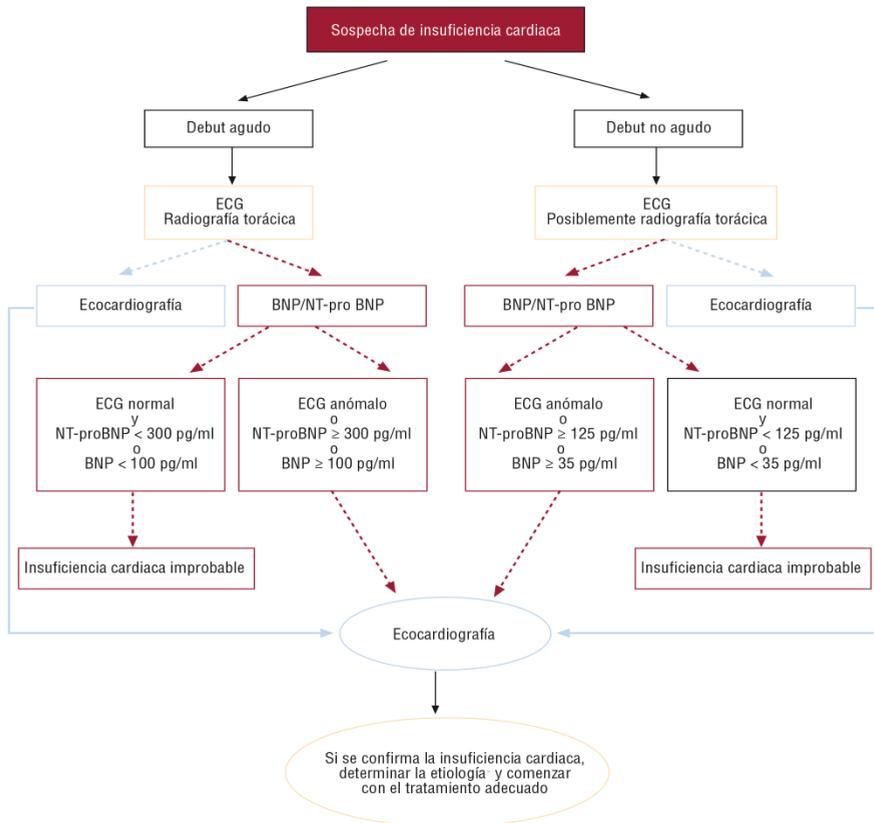
Síntomas		Signos	
Típicos	Disnea	Más específicos	Presión venosa yugular elevada
	Ortopnea		Reflujo hepatoyugular
	Disnea paroxística nocturna		3 <sup>er</sup> sonido del corazón (ritmo galopante)
	Baja tolerancia al ejercicio		Impulso apical desplazado lateralmente
	Fatiga, cansancio, más tiempo de recuperación al acabar ejercicio		Soplo cardíaco
	Edema en los tobillos		Edema periférico (tobillos, del sacro, escrotal)
Menos típicos	Tos nocturna	Menos específicos	Crepitaciones pulmonares
	Sibilancias		Menor entrada de aire y matidez a la percusión en las bases pulmonares (efusión pleural)
	Aumento de peso (> 2kg/semana)		Taquicardia
	Pérdida de peso (insuficiencia cardíaca avanzada)		Pulso irregular
	Sensación de hinchazón		Taquipnea (> 16 rpm)
	Pérdida de apetito		Hepatomegalia
	Confusión (especialmente en ancianos)		Ascitis
	Depresión		Pérdida de tejido (caquexia)
	Palpitaciones		
	Síncope		

(Extraída de McMurray J et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica 2012. Rev Esp Cardiol. 2012;65:938.e1-e59).

Los síntomas más típicos de IC son la disnea paroxística nocturna y la ortopnea, pero a su vez también son los menos comunes, especialmente en pacientes con síntomas más débiles (7, 8). Los signos de IC suelen ser retenciones de sodio y agua, por lo que tampoco resultan signos específicos, por ejemplo, el edema periférico, producido como consecuencia de estas retenciones, puede tener otras causas que no son específicas; además, desaparece de forma casi inmediata con la terapia diurética, por lo que los pacientes que ya se encuentran sometidos a tratamiento diurético serán más difíciles de diagnosticar (8, 9). Por otro lado, los signos que son más específicos, como por ejemplo, la presión venosa yugular elevada y el desplazamiento lateral del impulso apical son, al mismo tiempo, más difíciles de detectar y menos reproducibles (8, 9). Existen factores que dificultan aún más el diagnóstico de IC, como la obesidad, la edad avanzada y la enfermedad pulmonar crónica (10-12).

A parte del diagnóstico sindrómico que analiza los signos y los síntomas, se establecen otra serie de parámetros de diagnóstico, basados en aspectos fisiopatológicos, etiológicos y funcionales que requieren la realización de una serie de estudios y pruebas diagnósticas como son el análisis de la historia clínica del paciente, la exploración física, la realización de ecocardiografía, electrocardiograma (ECG) y pruebas de laboratorio hematológicas y bioquímicas (por ejemplo medición de la concentración de péptidos natriuréticos) y radiografía de tórax. Además, también se pueden realizar pruebas adicionales como la resonancia magnética nuclear y pruebas invasivas como la angiografía coronaria o el cateterismo (2). Todas estas pruebas quedan recogidas en un algoritmo diagnóstico desarrollado

por la ESC que debería aplicarse a aquellos pacientes con sospecha de IC (Figura 1).



**Figura 1.** Algoritmo para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca o disfunción ventricular. ECG: electrocardiograma. En la presentación aguda, también se puede utilizar MR-proANP (punto de corte, 120 pmol/l, < 120 pmol/l = insuficiencia cardíaca improbable). (Extraída de McMurray J et al. Guía de práctica clínica de la ESC sobre diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda y crónica 2012. Rev Esp Cardiol. 2012;65:938.e1-e59).

### 1.2.2. Tratamiento

El tratamiento en pacientes con IC establecida tiene como objetivo aliviar los síntomas y signos, mejorar la supervivencia y evitar el ingreso hospitalario. Aunque anteriormente los ensayos clínicos se centraban en la

mortalidad, actualmente se reconoce que la prevención de la hospitalización por IC es importante para los pacientes y para los sistemas de atención sanitaria (13).

Se ha observado un descenso en los índices de mortalidad y hospitalización, que refleja la capacidad de los tratamientos eficaces para ralentizar o prevenir el empeoramiento progresivo de la IC. Situación que puede venir acompañada de una remodelación inversa del VI y una reducción de las concentraciones circulantes de péptidos natriuréticos (14, 15). Existen unas pautas de tratamiento farmacológico actuales publicadas por la ESC en las cuales se establecen una serie de recomendaciones (2).

### 1.3. FACTORES DE RIESGO Y COMORBILIDADES

Existen algunos factores de riesgo conocidos que pueden crear predisposición a desarrollar IC. La edad avanzada y el sexo masculino constituyen factores de riesgo. Además, la hipertensión y la presencia de infarto de miocardio previo son factores de riesgo bien establecidos, siendo el infarto de miocardio un factor que puede duplicar o incluso triplicar el riesgo de IC. Por otro lado, la diabetes mellitus también se considera otro factor de riesgo ya que provoca una alteración de la microcirculación coronaria, produce disfunción endotelial y anormalidades metabólicas; es por ello, que se considera que puede aumentar hasta cinco veces el riesgo de IC. El sobrepeso y la obesidad están bien establecidos como factores de riesgo, actúan sobre el posible desarrollo de IC en la manera en que se produce un riesgo aterogénico, alteración de las condiciones de carga cardíaca, potencian cambios estructurales y funcionales, además de producir activación neurohormonal, deficiencia natriurética, alteración respiratoria durante el sueño y enfermedad renal crónica. Existen otros factores de riesgo con una relación menos constante con la IC como son el consumo excesivo de alcohol y café, el tabaquismo, la dislipidemia, la apnea del sueño, la vida sedentaria, el estrés y la depresión (16).

## 1.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, ETIOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS

### 1.4.1. Prevalencia, incidencia y pronóstico

La guía actual de IC indica que aproximadamente entre el 1-2% de la población adulta de países desarrollados padece IC, pero su prevalencia aumenta hasta un 10% o más en personas mayores de 70 años, siendo la media de edad de personas con IC de 75 años. La incidencia de este síndrome se establece entre 5-10 casos por cada 1.000 al año (2, 6, 17). Las personas con edades inferiores a 50 años desarrollan IC con menor frecuencia, es a partir de esta edad cuando se produce un aumento significativo y progresivo tanto de la prevalencia como de la incidencia (6). En los grupos más jóvenes, el desarrollo de IC es más frecuente en varones, sin embargo, a edades avanzadas, la prevalencia es similar en ambos sexos (1). Aunque la supervivencia ha aumentado significativamente en los últimos años, los ratios absolutos de mortalidad en personas que padecen IC permanecen elevados durante los primeros 5 años de diagnóstico (5).

La IC es una causa común de hospitalización, particularmente en personas mayores de 65 años (18). El tratamiento de estos pacientes no impide que siga siendo una gran carga para el sistema sanitario de países occidentales. Es la causa del 5% de los ingresos hospitalarios urgentes, ocupa el 10% de las camas hospitalarias y representa aproximadamente el 2% de los gastos sanitarios estatales debido, en gran parte, al coste de las hospitalizaciones (19). Su pronóstico es comparable a las formas más comunes de cáncer. Excepto en el caso de cáncer de pulmón, la IC se asocia con la peor tasa de supervivencia a los 5 años (25% para ambos sexos). Con una tasa de mortalidad del 59% a los 5 años y una pérdida de esperanza de

vida de 6,8 años/1.000 habitantes en hombres y 5,1 años/1.000 habitantes en mujeres (18, 20).

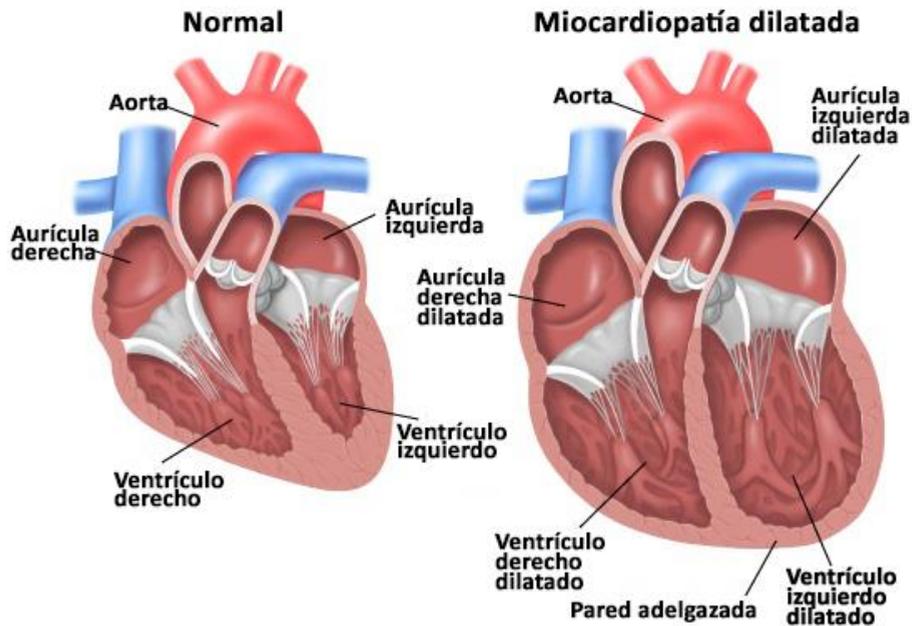
#### 1.4.2. Etiología

La IC puede tener diversas causas, y, frecuentemente no se produce debido a una única causa, si no que la combinación de varias acaban desencadenando esta patología. No existe una clasificación satisfactoria o consensuada de la etiología de este síndrome, produciéndose solapamientos entre las potenciales categorías en las que se clasifica. La enfermedad arterial coronaria es una de las principales causas de IC sistólica, aunque la hipertensión y la diabetes mellitus pueden ser factores contribuyentes. Otras posibles causas de IC sistólica son las infecciones virales previas, el abuso de alcohol, los tratamientos quimioterápicos o la miocardiopatía dilatada (MCD) idiopática. La IC con FE preservada tiene un perfil etiológico y epidemiológico diferente (2).

Las miocardiopatías constituyen una causa muy importante de IC. Se definen como enfermedades del miocardio que provocan una mala función del corazón. Existen diversas clasificaciones de las miocardiopatías, siendo la realizada por la OMS/ISFC la más aceptada (21). Está basada en el modelo fisiopatológico, y si es posible, también en factores patogénicos y etiológicos clasificando las miocardiopatías en MCD, hipertrófica, restrictiva, displasia arritmogénica de ventrículo derecho y las denominadas miocardiopatías específicas, que incluyen la miocardiopatía isquémica (MCI), valvular, hipertensiva y todo un conjunto de formas secundarias a una variedad de agentes y causas, entre las que se encuentra la miocarditis

(22). En este trabajo, nos centraremos en el estudio de dos de las principales causas de IC, la MCD y la MCI.

La MCD se caracteriza por una dilatación progresiva de uno o ambos ventrículos que suele acompañarse de una hipertrofia y una alteración de la contractilidad cardíaca (21) (Figura 2). Lleva a una IC progresiva, una disminución de la función contráctil del VI, arritmias ventriculares y supraventriculares, anomalías del sistema de conducción, tromboembolismo y muerte súbita (23).

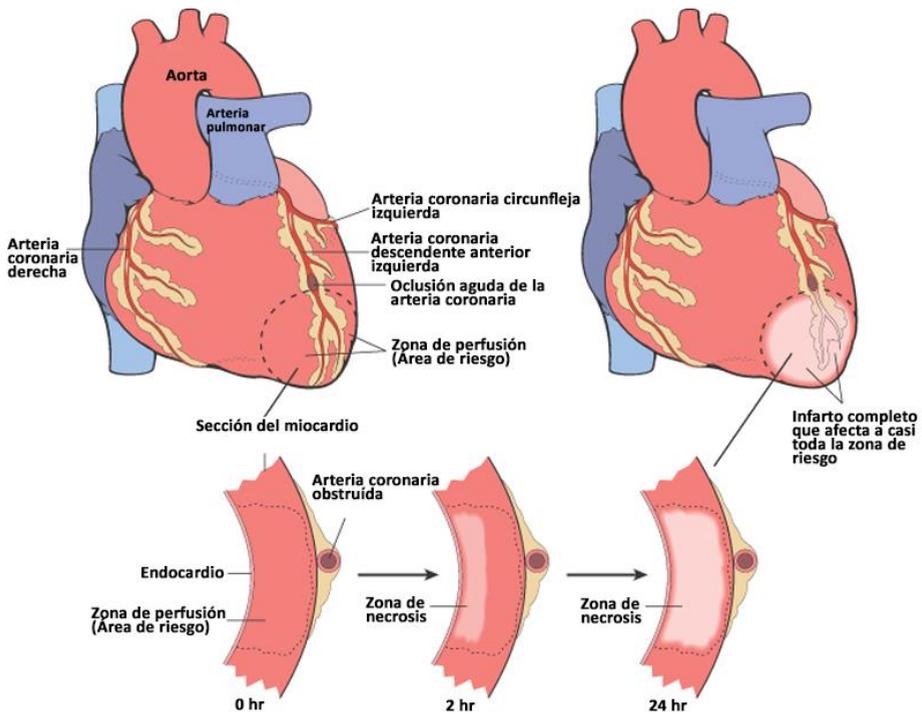


**Figura 2.** Comparación entre corazón normal y corazón con miocardiopatía dilatada que muestra los cambios morfológicos presentes en el corazón enfermo. (Modificada de *delraymedicalctr.com*).

Esta enfermedad del miocardio puede tener diversas causas: viral, alcohólica o tóxica, genética/familiar o bien idiopática como ocurre en la mayoría de los casos. También puede estar asociada a otras cardiopatías en las cuales el grado de disfunción miocárdica no pueda explicarse por una determinada sobrecarga hemodinámica o severidad de un daño isquémico (21, 24). La supervivencia a los 5 años después del diagnóstico es del 50%, los pacientes con frecuencia desarrollan IC congestiva progresiva y complicaciones tales como tromboembolismo y arritmias (25).

La MCI es la afectación miocárdica debida a una desproporción entre el aporte de flujo sanguíneo coronario y los requerimientos miocárdicos, causada por cambios en la circulación coronaria. Clínicamente la MCI puede manifestarse de varias maneras, una de ellas es la IC, que ocurre por diversas razones, como por complicación de un infarto agudo de miocardio previo (Figura 3), o precipitada por arritmias o crisis anginosas (26).

La MCI ha sido, y continúa siendo, la principal causa de muerte en el mundo. Solo en 2013 causó más de 8 millones de muertes en todo el mundo, el 14,8% de todas las muertes y un 41,9% más de las muertes por MCI producidas en 1990 (más de 5 millones) (27).



**Figura 3.** Representación de un infarto de miocardio típico. Se produce una progresión de la necrosis miocárdica después de la oclusión arterial coronaria. (Modificada de Kumar et al. *Pathologic basis of disease. Robbins y Cotran 2009*).

### 1.4.3. Fisiopatología

Actualmente, la naturaleza progresiva de la IC y el éxito o fracaso de las distintas terapias vienen determinados por la existencia de una red compleja de alteraciones a distintos niveles, como son los cambios estructurales, funcionales y biológicos que se producen en el corazón.

El proceso por el cual la disfunción ventricular evoluciona hacia IC, se caracteriza por una fase inicial, en la que se produce un daño miocárdico, ya sea de forma directa a través de sobrecarga ventricular volumétrica o por sobrecarga de presión, incluso a través de una restricción de llenado

ventricular (28), que conducen a un descenso del gasto cardíaco y a un aumento de la presión venosa. Como consecuencia de ello, se activan una serie de “*mecanismos de compensación*” (29, 30). Son mecanismos cuyo objetivo inicial es aumentar el gasto cardíaco y mantener la presión arterial, asegurando la perfusión a los órganos vitales como el cerebro y corazón. Entre estos mecanismos se encuentran, la activación neurohormonal, el mecanismo de Frank-Starling y el remodelado ventricular. Sin embargo, posteriormente contribuyen al empeoramiento del cuadro clínico; es el caso del sistema simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona. La activación de estos sistemas, provoca finalmente consecuencias deletéreas, como son el daño endotelial, el incremento de radicales libres, la apoptosis, la fibrosis cardíaca y la generación de arritmias. Además, los niveles de péptidos natriuréticos aumentan para regular algunas de las respuestas neurohumorales exacerbadas, sin embargo, con el transcurso de la enfermedad su acción tiende a atenuarse.

El mecanismo de Frank-Starling describe la capacidad del corazón para cambiar su fuerza de contracción y, por tanto, el volumen sistólico en respuesta a los cambios en el retorno venoso (31). Este mecanismo juega un papel compensatorio importante en las primeras etapas de la IC (32).

El estrés hemodinámico crónico sobre el corazón conduce a alteraciones en el tamaño, forma, estructura y función del ventrículo. Este remodelado implica cambios en la masa ventricular, la composición y el volumen, y cambios generales en su geometría que inicialmente son compensatorios. El corazón se agranda para aumentar el volumen ventricular que conduce a un mayor volumen sistólico y mayor gasto

cardíaco a pesar de una FE deprimida. El espesor de la pared del miocardio y la masa ventricular aumentan para mantener el gasto cardíaco (33).

Aunque es importante la compensación durante etapas tempranas de IC, los resultados a largo plazo de su activación resultan perjudiciales (33, 34). El agrandamiento y la hipertrofia del ventrículo conducen a un aumento de la tensión de la pared y fibrosis que finalmente perjudica la contractilidad. Además, también aumenta la apoptosis miocárdica; y existe asincronía contráctil significativa en el ventrículo dilatado y remodelado que conduce a un bombeo menor y progresivo empeoramiento (33).

A nivel celular y molecular se producen una serie de alteraciones en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como en algunas de las corrientes iónicas que participan en la generación del potencial de acción de los miocitos cardíacos y, por tanto, en la contracción y relajación del músculo cardíaco, aspecto que se explicará con detalle en el Apartado 2 de la Introducción. La remodelación cardíaca precede al cuadro clínico de la insuficiencia y contribuye a su deterioro. Mensajeros químicos como la endotelina-1, la norepinefrina y la angiotensina II, que activan la cascada de las MAP quinasas, provocan hipertrofia cardíaca, lo que favorece la isquemia y la aparición de arritmias (33).

Por todo ello, el manejo farmacológico de la IC debe ir enfocado a los mecanismos fisiopatológicos afectados, es decir, a evitar el bloqueo de las acciones deletéreas de los sistemas neuroendocrinos sobreestimulados y a evitar la pérdida de miocitos, la generación de fibrosis y de arritmias cardíacas, para lo cual es indispensable el manejo apropiado de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (35, 36).

## 2. LA CONTRACCIÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

La contracción del músculo cardíaco es un proceso que se encuentra alterado en la IC, cuya aparición provoca alteraciones en la estructura y la función del corazón. En la MCD no isquémica la disfunción de la contracción es más acusada que en la MCI, a causa de la gran dilatación del corazón. Aunque en la MCI pueda haber dilatación, el defecto en la contracción se puede producir también a causa del reemplazamiento del tejido muscular miocárdico por tejido fibrótico, es decir, los cardiomiocitos encargados de la función contráctil van siendo reemplazados por fibroblastos, convirtiendo al corazón en una masa distendida y con contracción reducida.

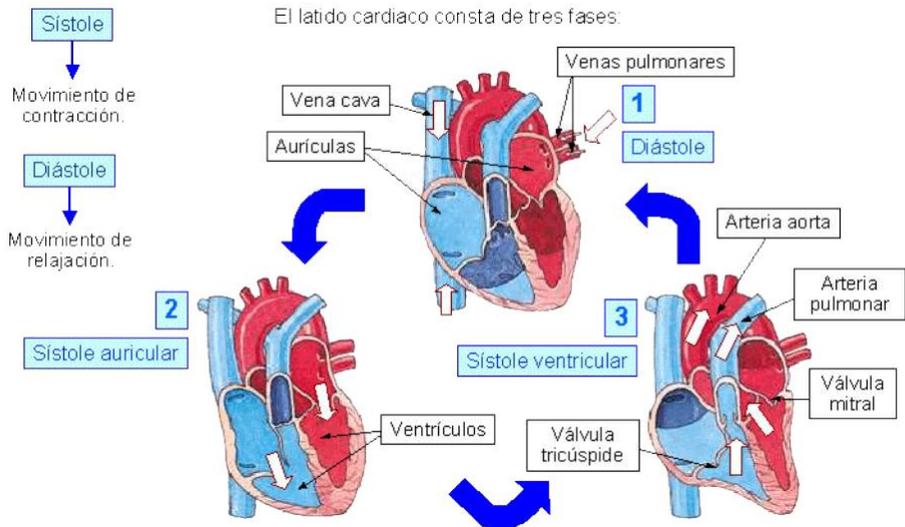
### 2.1. PROCESO DE CONTRACCIÓN DEL CORAZÓN

Un ciclo cardíaco incluye tanto los procesos eléctricos (potencial de acción y propagación) como los mecánicos (sístole y diástole) que tienen lugar durante un latido cardíaco. Cada ciclo consta de dos sístoles (auricular y ventricular) y dos diástoles (auricular y ventricular) (Figura 4) (37).

- **Sístole auricular:** las aurículas se contraen y facilitan el paso de un pequeño volumen de sangre a los ventrículos. La despolarización auricular determina la sístole auricular. En este momento los ventrículos están relajados.
- **Sístole ventricular:** tiene una duración de 0,3 segundos durante los cuales los ventrículos se contraen y al mismo tiempo las aurículas están relajadas (diástole auricular). Al final de la sístole auricular, el impulso eléctrico llega a los ventrículos y ocasiona primero la despolarización y posteriormente la contracción ventricular. La

contracción del ventrículo ocasiona un aumento de la presión intraventricular que provoca el cierre de las válvulas auriculoventriculares. Este cierre genera un ruido audible en la superficie del tórax y que constituye el primer ruido cardíaco. Durante unos 0,05 segundos, tanto las válvulas semilunares como las auriculoventriculares se encuentran cerradas. Este es el periodo de contracción isovolumétrica. Al continuar la contracción ventricular provoca un rápido aumento de la presión en el interior de las cavidades ventriculares. Cuando la presión de los ventrículos es mayor que la presión de las arterias, se abren las válvulas semilunares y tiene lugar la fase de eyección ventricular.

- Diástole ventricular: el inicio de la diástole ventricular es debido a la repolarización ventricular. La velocidad de eyección de la sangre va disminuyendo de forma progresiva, disminuye la presión intraventricular y se cierran las válvulas semilunares. El cierre de las válvulas aórtica y pulmonar genera el segundo ruido cardíaco. Las válvulas semilunares impiden que la sangre refluya hacia las arterias cuando cesa la contracción de miocardio ventricular. El ventrículo es una cavidad cerrada, con las válvulas auriculoventriculares y semilunares cerradas. Tiene un volumen constante, se relaja de forma progresiva y disminuye la presión intraventricular. Cuando la presión ventricular disminuye por debajo de la presión auricular, se abren las válvulas auriculoventriculares y se inicia la fase de llenado ventricular. La sangre fluye desde las aurículas a los ventrículos siguiendo un gradiente de presión.

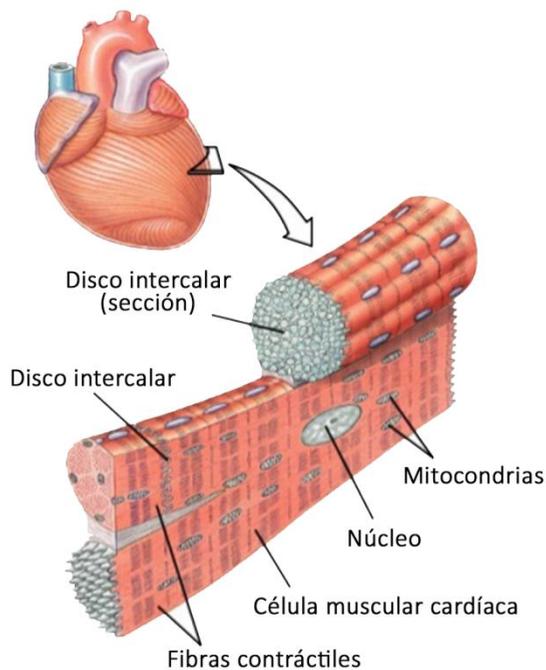


**Figura 4.** Esquema del ciclo cardíaco. Las flechas indican los flujos sanguíneos en cada fase del ciclo. (Extraída de <http://bombacardiaca.blogspot.com.es/p/ciclo-cardiaco.html>).

## 2.2. COMPONENTES CELULARES IMPLICADOS EN LA CONTRACCIÓN

### 2.2.1. Fibras musculares cardíacas

El músculo cardíaco está formado por células musculares (cardiomiocitos) ramificadas en los extremos que pueden tener 1 o 2 núcleos elipsoidales, grandes y centrales. En los polos nucleares se pueden observar gránulos de lipofucsina de color amarillento. Los cardiomiocitos tienen un diámetro aproximado de 15  $\mu\text{m}$  y una longitud de 100  $\mu\text{m}$ , presentan estriaciones transversales similares a las del músculo esquelético (Figura 5).



**Figura 5.** Sección del corazón ampliada que muestra la organización en fibras musculares. (Modificada de <http://www.ufrgs.br/fisiologiacaclular>).

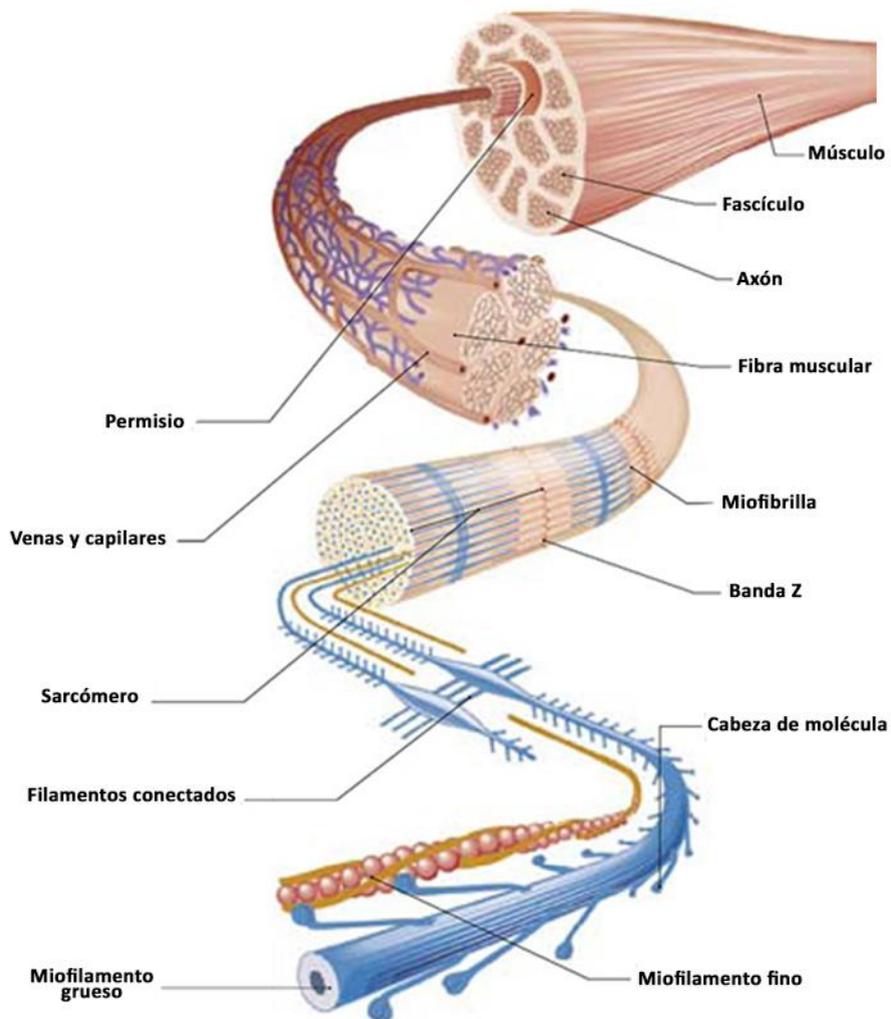
### 2.2.2. Estructuras celulares implicadas en la contracción

El retículo endoplásmico (RE) no se encuentra muy desarrollado y su estructura es muy diferente al del resto de tipos celulares, formando envoltorios alrededor de las miofibrillas especializados en acumular calcio. Sin embargo, las mitocondrias son muy numerosas y su distribución es regular, dividiendo a las células cardíacas en miofibrillas aparentes. Estas células se encuentran unidas entre sí por un tipo de unión característico del músculo cardíaco como son los discos intercalares. Estas estructuras se encuentran en regiones de la membrana donde los extremos de dos células se enfrentan y se ubican en lugar de un disco Z (Figura 6). Contienen diferentes complejos de unión que permiten al miocardio formar un sincitio desde el punto de vista funcional. Presentan una porción transversal, en la cual se ubican dos tipos de unión intercelular: *fascia adherens* y *macula adherens*. Y una porción lateral, que es paralela a los miofilamentos, en la cual se ubican uniones de comunicación (nexos o *gap junctions*).

La *fascia adherens* es un tipo de unión propia del corazón, aunque su estructura es semejante a la de las zonas de adhesión de los epitelios. Estas estructuras anclan filamentos de actina a la membrana plasmática y también unen las membranas de células adyacentes. De esta manera, asocian el aparato contráctil de cada célula con el de la célula vecina.

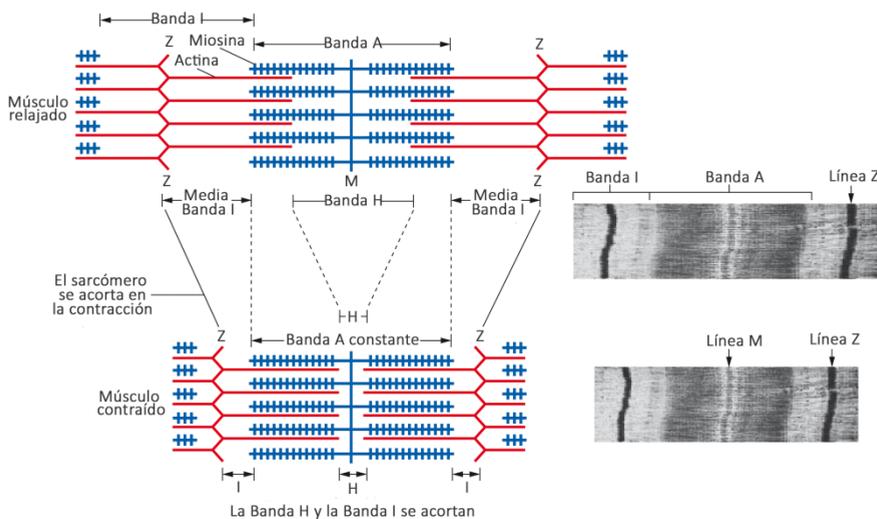
La *macula adherens* corresponde a desmosomas típicos que se ubican en las porciones transversales y paralelas del disco. Estas estructuras anclan los filamentos intermedios de desmina de la fibra cardíaca y participan, junto con la *fascia adherens*, en la adhesión de las membranas plasmáticas de células vecinas.

Las uniones de comunicación (nexos o *gap*), corresponden a sitios que permiten el paso de iones y moléculas pequeñas desde el citoplasma de una célula a la célula vecina, permitiendo una rápida conducción de los potenciales de acción (38).



**Figura 6.** Representación gráfica de la organización intracelular de la fibra muscular. (Modificada de [www.grandesimagenes.com/fibra-muscular/](http://www.grandesimagenes.com/fibra-muscular/)).

Las miofibrillas tienen repetidas unidades micro-anatómicas, llamadas sarcómeros, que son sus unidades funcionales básicas, y se ensamblan para constituir la unidad contráctil básica del tejido cardíaco, dando lugar a su apariencia estriada (Figura 6). Los sarcómeros constan de varias regiones bien diferenciadas que pudieron ser discernidas al ser observadas al microscopio electrónico. Cada sarcómero corresponde a la región comprendida entre dos discos Z. Dentro de cada sarcómero se alternan bandas oscuras (bandas A) con bandas claras (bandas I), y está formado por diversas proteínas organizadas en filamentos gruesos (cadenas pesada y ligera de la miosina) y delgados (actina, troponinas C, I y T, tropomiosinas, titinas y nebulinas). Aproximadamente 50 sarcómeros componen una miofibrilla y un conjunto de 50 a 100 miofibrillas constituyen un cardiomiocito (Figura 7) (39).



**Figura 7.** Estructura del sarcómero en la contracción y relajación del músculo. A la derecha, imagen de microscopía electrónica del sarcómero. (Modificada de <https://courses.candelalearning.com/apvccs/chapter/muscular-levels-of-organization/>).

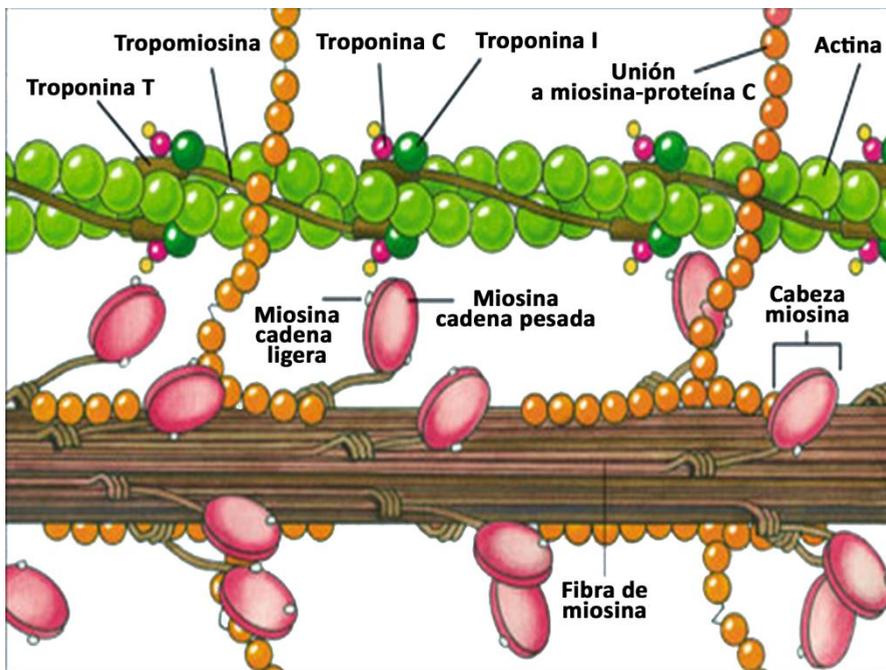
### 2.2.3. Proteínas implicadas en la contracción

Las diferentes proteínas que forman la estructura sarcomérica se ensamblan entre sí para producir la contracción de la fibra. Existe un acople tanto mecánico como eléctrico entre las miofibrillas para contraer y relajar el músculo de forma coordinada. Los filamentos delgados están formados por actina F (filamentosa) y G (globular), troponina y tropomiosina, formando las bandas I. La actina F es un polímero largo formado por dos cadenas de monómeros globulares de actina G enrolladas entre sí formando una doble espiral. Cada monómero de actina G es una región de interacción con la miosina (Figura 8).

La tropomiosina es una molécula larga y fina con forma cilíndrica que contiene dos cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí y unidas por sus extremos para formar filamentos largos localizados a lo largo del surco existente entre los dos filamentos de actina. La troponina es un complejo de tres subunidades: TnT que se une a la tropomiosina, TnC que tiene afinidad por iones  $\text{Ca}^{2+}$  y TnI que cubre el punto en el que se unen actina y miosina. Cada molécula de tropomiosina tiene una región concreta donde se une un complejo de troponina (Figura 8).

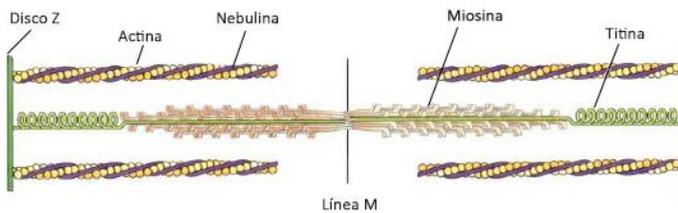
Los filamentos gruesos están formados por unas 200 moléculas de miosina, que corresponden a las bandas A (regiones con miosina y actina) y bandas H (formadas sólo por miosina) del sarcómero. El tipo de miosina presente en el músculo es la miosina II, tiene forma de bastón, y está formada por dos cadenas pesadas que poseen una cabeza globular y una cola en  $\alpha$ -hélice, y dos cadenas ligeras. La zona globular posee regiones específicas para su unión a ATP y con actividad ATPasa, además es también

la región de unión a la actina. Las moléculas de miosina están dispuestas de manera que las cabezas globulares se orientan hacia fuera de la espiral enrollada. Las colas en  $\alpha$ -hélice de dos cadenas pesadas se enrollan una alrededor de la otra en una estructura en espiral para formar un dímero, y dos cadenas ligeras se asocian con el cuello de cada región de la cabeza para formar la molécula completa de miosina II. La orientación de las moléculas de miosina se invierte a partir de la zona central del sarcómero, denominada línea M, lo mismo ocurre con los filamentos de actina, por lo que la orientación relativa de ambos tipos de filamentos es la misma en ambas mitades del sarcómero (Figura 8) (39).



**Figura 8.** Estructura y organización de las proteínas implicadas en la contracción muscular cardíaca formando los filamentos delgado (parte superior) y grueso (parte inferior). (Modificada de [www.analesranf.com](http://www.analesranf.com)).

La estructura y estabilidad del sarcómero viene también determinada por las proteínas titina y nebulina (Figura 9). La titina es una proteína de gran tamaño que se extiende desde la línea M hasta el disco Z y que actúa como muelle manteniendo los filamentos de miosina centrados en el sarcómero, además de mantener la tensión en reposo, que permite al músculo retraerse si se extiende en exceso. Los filamentos de nebulina se extienden desde el disco Z y están asociados con la actina regulando el ensamblaje y longitud de sus filamentos (39).



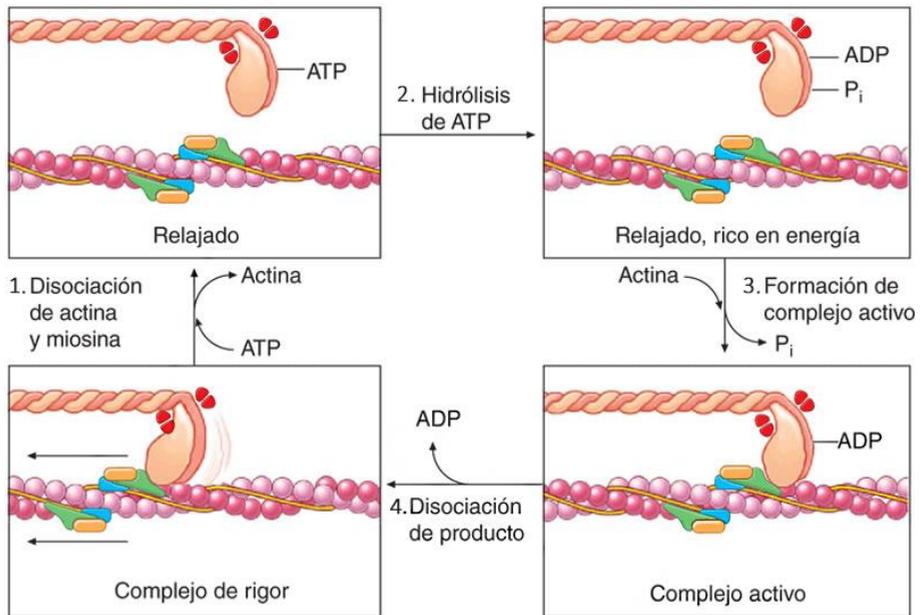
**Figura 9.** Moléculas de titina y nebulina asociadas a los filamentos de actina y miosina en el sarcómero. (Extraída de Cooper Hausman. *La célula*. Marbán 2011).

### 2.3. MECANISMO DE CONTRACCIÓN DE LAS FIBRAS CARDÍACAS

El modelo de deslizamiento de los filamentos propuesto por primera vez por Andrew Huxley y Ralph Niedergerke en 1954 (40) constituye la base para comprender el proceso de contracción muscular. Según este modelo, se produce un acortamiento de los sarcómeros durante la contracción muscular, de manera que los discos Z se acercan, produciéndose una reducción de las bandas H e I hasta desaparecer casi por completo. La contracción se produce debido al deslizamiento de los filamentos de actina y miosina entre sí. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina, formando puentes cruzados entre ambos grupos de filamentos, además de esta unión física, las cabezas globulares de la miosina fijan e hidrolizan ATP, lo cual proporciona la energía necesaria para provocar cambios conformacionales en la miosina que posibiliten el deslizamiento de las fibras de actina y miosina entre sí.

James Spudich y Michael Sheetz (41) propusieron un mecanismo molecular a partir de la determinación de la estructura tridimensional de la miosina por Ivan Rayment *et al.* (42) y de estudios *in vitro* sobre el movimiento de la miosina a lo largo de los filamentos de actina. En este mecanismo, el ciclo de interacción de la miosina con la actina comienza con ambas moléculas unidas fuertemente entre sí y sin presencia de ATP (Figura 10, complejo de rigor), a continuación se une ATP, lo que produce la disociación del complejo actina-miosina (Figura 10, paso 1), y la hidrólisis de ATP es lo que provoca un cambio conformacional en la miosina que afecta a la región del cuello que une las cadenas ligeras (Figura 10, paso 2). Esta región que posee ahora una conformación distinta, actúa como una palanca desplazando la cabeza globular de la miosina 5 nm, donde se vuelve a unir a

la actina pero en una nueva posición, liberando los productos de hidrólisis del ATP (ADP y  $P_i$ ), lo que desencadena el retorno de la miosina a su conformación original, deslizando de esta manera los filamentos de actina hacia la línea M (Figura 10, pasos 3 y 4).



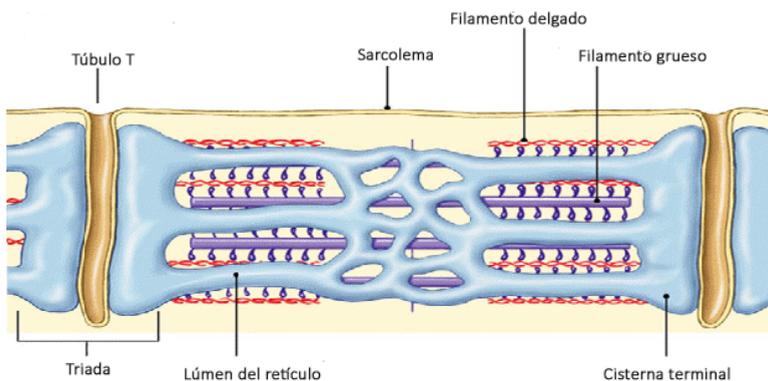
**Figura 10.** Esquema del mecanismo de contracción de las fibras musculares cardíacas. (Modificada de Am Katz. *Heart failure: cardiac function and dysfunction. Atlas of heart diseases.* WS Colucci, 2002).

## 2.4. EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA CONTRACCIÓN CARDÍACA

El RE es el encargado de la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  desde su interior, a través del receptor de rianodina 2 (RyR2), al citoplasma del cardiomiocito cuando se va a producir un ciclo de contracción de la fibra. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen a las moléculas de tropomiosina para iniciar la contracción de la fibra. Y después almacena de nuevo el  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal SERCA2 para permitir la relajación de la fibra. Es por ello que el RE tiene especial relevancia en la contracción y en la IC.

### 2.4.1. Localización y estructura del retículo endoplásmico

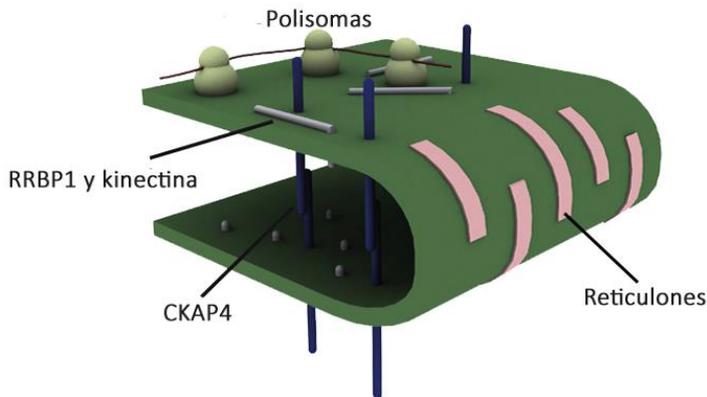
El RE forma una red de túbulos que rodea a las miofibrillas de los cardiomiocitos. A nivel de la Banda I poseen una orientación longitudinal con respecto a la miofibrilla, y en el centro de la Banda A es donde forman una red de túbulos más desarrollada. Hacia la Banda I los sarcotúbulos forman cisternas terminales que poseen un mayor tamaño y se localizan perpendicularmente a las miofibrillas y al lado de los túbulos-T, formando las denominadas tríadas (Figura 11).



**Figura 11.** Localización y estructura del retículo endoplásmico en la fibra cardíaca. (Modificada de [www.fotoseimagenes.net](http://www.fotoseimagenes.net)).

A nivel molecular, el RE está formado por una serie de proteínas que configuran la estructura de túbulos y cisternas (Figura 12). La red de túbulos difiere respecto a la estructura de las cisternas en que ésta tiene una elevada curvatura de membrana que viene determinada por las proteínas denominadas reticulones. Se han identificado 4 familias génicas de reticulones (reticulones 1, 2, 3 y 4 (Nogo)) en la especie humana (43-47), que, además de conferir la curvatura a los túbulos, regulan el tráfico vesicular y el proceso de apoptosis (48-50).

Otras proteínas que forman la estructura del RE son *cytoskeleton-associated protein 4* (CKAP4), kinectina y *ribosomal receptor-binding protein 1* (RRBP1). Estas proteínas se encuentran en abundancia en las cisternas del RE y ausentes en los túbulos. CKAP4 conserva la distancia adecuada entre membranas adyacentes, mientras que kinectina y RRBP1 aplanan la superficie de las cisternas. Todo ello garantiza un apilamiento correcto de las cisternas y un espacio suficiente en el lumen para albergar proteínas luminales como por ejemplo chaperonas (51).

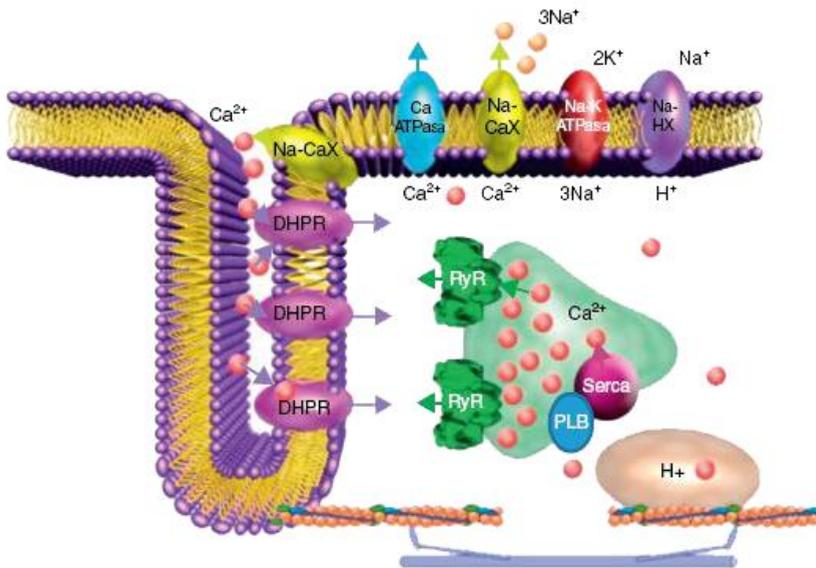


**Figura 12.** Proteínas estructurales del retículo endoplásmico. RRBP1, *ribosomal receptor-binding protein 1*; CKAP4, *cytoskeleton-associated protein 4*. (Modificada de Lin S et al. *Molecular basis for sculpting the endoplasmic reticulum membrane. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2012;44:1436-1443).

#### 2.4.2. Implicación del retículo endoplásmico en la contracción cardíaca

El RE es el principal almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cardiomiocitos y tiene un papel muy relevante en el acoplamiento de la excitación-contracción, mediante la regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sarcoplasma durante la contracción y relajación del corazón. En el cardiomiocito, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es inducida por el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra por los canales tipo L dependientes de voltaje (DHPR) (52). Dicha liberación se efectúa a través del RyR2 que se encuentra en tetrámeros formando un canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE muy próximo a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (53, 54).

Otra de las proteínas del RE importantes en la contracción es la calsecuestrina que es una de las más abundantes del RE y que tiene la capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  en una cantidad suficiente para permitir que se produzcan diversas contracciones repetidas (55). La proteína encargada de bombear el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol de vuelta al RE durante la relajación muscular es la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE SERCA2a (isoforma mayoritaria expresada en el músculo cardíaco) (56, 57). Cuando se inicia la despolarización, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la célula a través de los canales tipo L, lo que induce la activación de RyR2 y, por tanto, la liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares del RE. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  liberados al citosol se unen a la troponina T permitiendo la activación de la maquinaria contráctil. Para que se produzca la relajación, las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  deben volver a sus niveles basales, por lo que, a través de SERCA2a, que almacena el  $\text{Ca}^{2+}$  en RE de nuevo, y del canal de membrana intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), se consigue disminuir la concentración de este ion en el citosol permitiendo la relajación de las fibras musculares cardíacas (Figura 13) (58, 59).



**Figura 13.** Localización de los principales componentes implicados en el proceso de contracción cardíaca. Las flechas indican la dirección de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales iónicos (DHPR y RyR), intercambiadores Na-CaX y bombas (SERCA, Ca-ATPasa). Na-K ATPasa, bomba ATPasa de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; Na-HX, intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; PLB, fosfolamban; RyR, receptor de rianodina. (Extraída de [www.scielo.org.mx](http://www.scielo.org.mx)).

#### 2.4.3. Estrés y respuesta a estrés del retículo endoplásmico

El RE es el orgánulo principal de síntesis y maduración de proteínas secretoras, de síntesis de lípidos y de almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Diversos factores pueden afectar a la homeostasis del RE y alterar sus funciones, provocando lo que se denomina estrés del RE. En este proceso se produce una acumulación de proteínas no plegadas y mal plegadas en el lumen del RE, que producen alteraciones celulares que provocan consecuencias patológicas. Diversos estudios han relacionado la alteración de la homeostasis del RE con diversos procesos de enfermedades cardiovasculares, entre ellas el daño por isquemia/reperfusión (60), y la IC (61, 62).

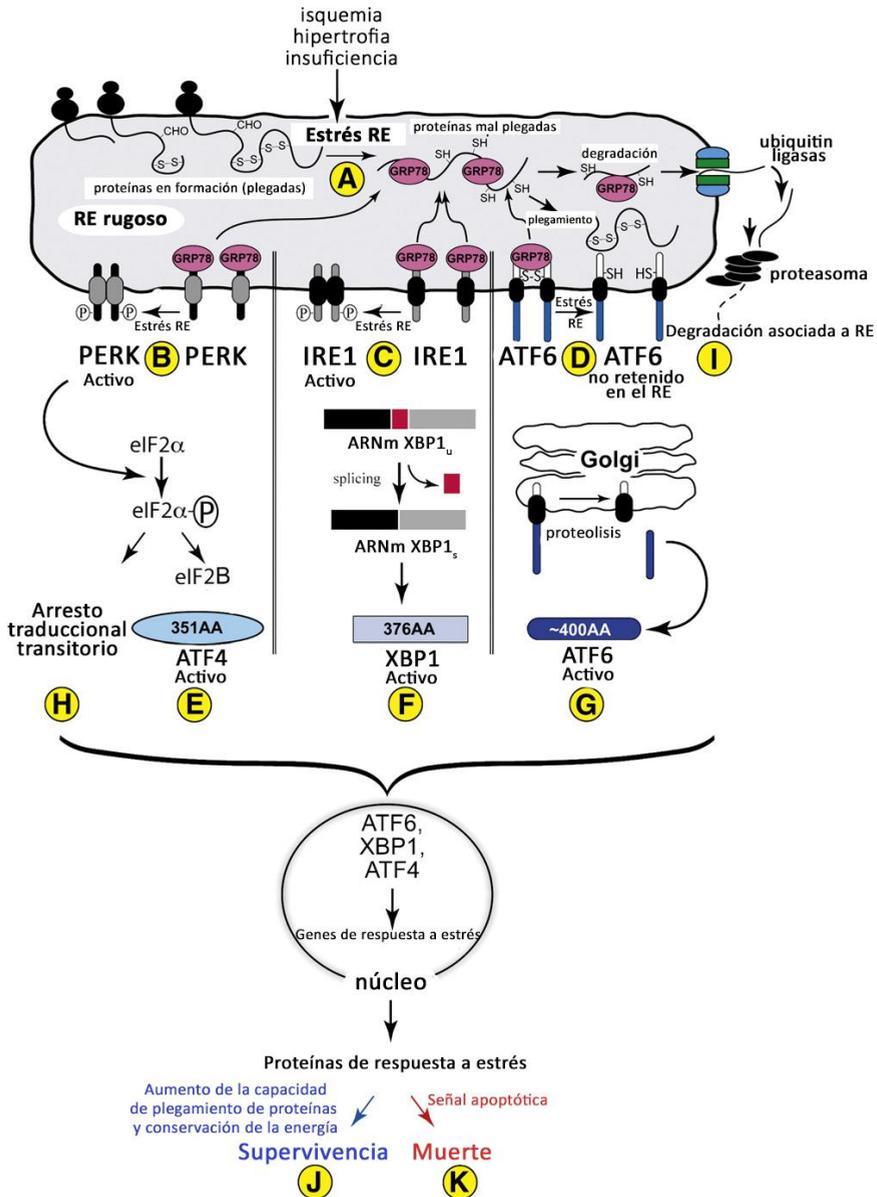
El estrés del RE desencadena una respuesta celular en la cual se encuentran implicadas diferentes rutas que intentan restablecer la homeostasis del RE a través de la atenuación de la síntesis proteica, la inducción transcripcional de genes codificantes de chaperonas y de componentes de degradación asociados al RE y finalmente, si la célula no consigue el restablecimiento de la homeostasis del RE en un cierto lapso de tiempo, pueden activarse rutas apoptóticas para asegurar la supervivencia del organismo (63, 64) (Figura 14).

En todas estas rutas, proteínas transmembrana y del lumen como *inositol-requiring protein-1* (IRE1) y *glucose-related protein 78* (GRP78), y factores de transcripción como *X-box binding protein 1* (XBP1), *activating transcription factor 6* (ATF6), ATF4 y *eukaryotic initiation factor 2 alpha* (eIF2 $\alpha$ ), cooperan juntos para generar la respuesta a estrés del RE, denominada del inglés UPR (*unfolded protein response*) (65). Esta respuesta se desencadena inicialmente a través de 3 sensores transmembrana: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), ATF6 e IRE1 (66, 67) que son los efectores proximales de la UPR. Cuando el plegamiento de proteínas funciona correctamente, estas proteínas transmembrana se encuentran unidas a la chaperona GRP78 estando en su forma inactiva. Sin embargo, cuando se produce un acúmulo de proteínas mal plegadas, la chaperona GRP78 se transloca hacia el lumen rompiendo así la unión con las proteínas transmembrana, y se une a las proteínas mal plegadas para colaborar en su plegamiento (68-72). Esta translocación de GRP78 provoca la activación de los 3 efectores proximales de la UPR, lo que se considera un signo inicial de estrés del RE. Una vez activados estos efectores, se desencadena una cascada de señalización. Por un lado, PERK se dimeriza y se autofosforila

activándose, lo que conduce a la activación del factor de transcripción eIF2 $\alpha$  que se fosforila disminuyendo así la eficiencia en el inicio de la traducción. De esta manera, se consigue disminuir la síntesis de proteínas para evitar su acumulación en el lumen del RE, de forma que se facilita la recuperación de la homeostasis de RE y el restablecimiento del plegamiento adecuado de proteínas (73). Aunque se produce la disminución de la síntesis proteica, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  hace que el ARNm de ATF4 se traduzca con una mayor eficiencia. Esto aumenta los niveles de ATF4, que actúa como inductor transcripcional de diversos genes de respuesta a estrés del RE.

La activación de IRE1 por disociación de GRP78 y su homodimerización y autofosforilación, promueve su actividad endonucleasa que realiza un *splicing* alternativo sobre el ARNm de XBP1. Este *splicing* inusual genera un transcrito con una nueva pauta abierta de lectura que codifica la forma activa de XBP1 que actúa como factor de transcripción de muchos genes de respuesta a estrés del RE (71-74).

ATF6, de igual forma que PERK e IRE1, es una proteína transmembrana unida a GRP78 en condiciones de no estrés. Sin embargo, en situación de estrés del RE, a diferencia de los otros dos sensores, se transloca al aparato de Golgi donde dos proteasas producen su escisión. A continuación, la parte citosólica de ATF6 resultante de la escisión, que posee señales de localización nuclear, se transloca también al núcleo donde regula la transcripción de genes de respuesta a estrés del RE (75, 76).



**Figura 14.** Esquema de la activación de la respuesta a estrés UPR en el RE. En condiciones normales, GRP78 (A) está unida a PERK (B), IRE1 (C) y ATF6 (D). En situación de estrés colabora en el plegamiento proteico y permite la activación de (B), (C) y (D) que por diversos mecanismos activan a otros efectores eIF2α y ATF4 (E), XBP1 (F) y ATF6 (G). (E), (F) y (G) se translocan al núcleo y regulan la expresión de elementos de respuesta a estrés. Dependiendo de la fuerza y duración del estrés, se produce una supervivencia (J) o muerte (K). (Modificada de Doroudgar et al. *New concepts of endoplasmic reticulum function in the heart: programmed to conserve*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013;55:85–91).

#### 2.4.4. Alteraciones del retículo endoplásmico relacionadas con la insuficiencia cardíaca

Diversos estudios sugieren que las alteraciones en la homeostasis del RE y la consiguiente activación de la respuesta UPR y posible apoptosis, están relacionadas con la fisiopatología de enfermedades humanas como la diabetes mellitus, y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (77). En particular, se han asociado estos procesos con enfermedades cardiovasculares como la hipertrofia cardíaca, y la IC (60, 62, 78). En corazones enfermos, factores como la hipoxia, el estrés oxidativo y el aumento de la síntesis proteica pueden desencadenar el estrés del RE. Estudios en modelos animales (79, 80) y en pacientes con IC mostraron que la expresión de la chaperona GRP78 estaba marcadamente aumentada, sugiriendo un papel de la activación UPR en la fisiopatología de la IC (81). También se ha visto que la isquemia puede activar la ruta UPR mediada por ATF6 (82) y en estudios con modelos transgénicos de ratón se ha demostrado que la activación de ATF6 antes de la isquemia tiene un papel protector del corazón ante un episodio de daño por isquemia/reperfusión (83). Por otro lado, varios estudios evidencian que la apoptosis que se desencadena tras un estrés del RE excesivo, estaría implicada en el daño isquémico de cardiomiocitos *in vitro* y en la patogénesis de la MCI *in vivo* (83-86). Otro estudio relacionó el estrés del RE con la MCD a través de la creación de un mutante KDEL (receptor de chaperonas responsable del control de calidad del RE) que desarrolló MCD y además de observarse un aumento de proteínas de estrés del RE, se produjo un defecto funcional en las corrientes tipo L de  $\text{Ca}^{2+}$  (87).

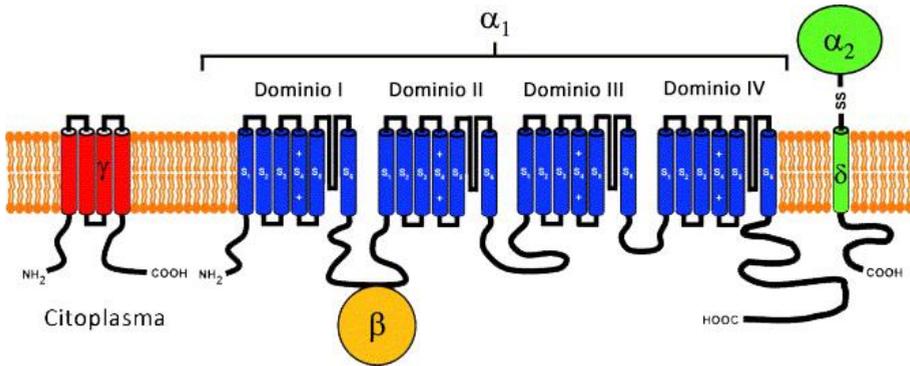
Todos estos estudios evidencian que el estrés del RE, que puede desencadenar rutas de supervivencia o apoptóticas, se encuentra íntimamente ligado a la fisiopatología de muchas enfermedades, entre ellas la MCD y la MCI, etiologías principales de IC y en las que nos vamos a centrar en esta Tesis Doctoral.

## 2.5. IMPLICACIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS DE MEMBRANA EN LA CONTRACCIÓN CARDÍACA

Además de las proteínas motoras que dirigen activamente el proceso de contracción de los cardiomiocitos que forman el músculo cardíaco, existen otros componentes muy relevantes que aportan la estimulación necesaria para el inicio de los ciclos de contracción y relajación de las fibras musculares. En concreto, los canales iónicos (CI) de membrana cardíacos son los encargados de permitir el flujo de iones necesario para cada ciclo de contracción-relajación. Para el correcto funcionamiento de este proceso, es necesario que exista una coordinación tanto espacial como temporal del tránsito de iones a través de las membranas de las fibras cardíacas (88).

### 2.5.1. Estructura de los canales iónicos

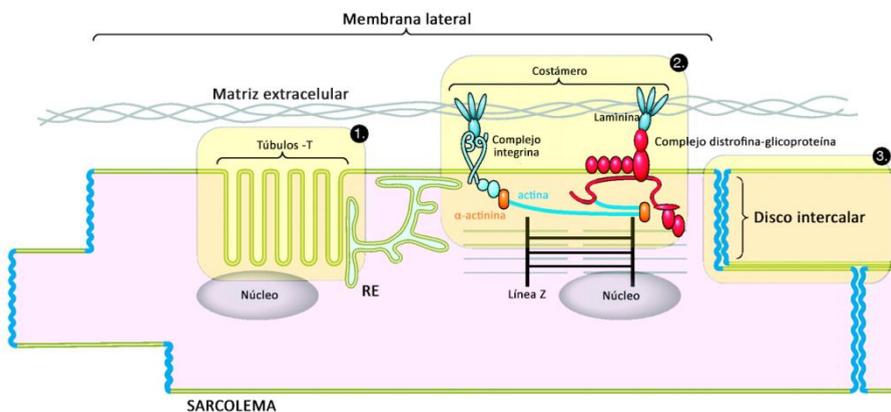
El número y tipos de subunidades proteicas que componen un canal no son los mismos en los diferentes CI, por lo que no existe una estructura común para todos ellos. No obstante, en general, los CI son complejos heteromultiméricos formados por diversas subunidades proteicas embebidas total o parcialmente en la membrana con diferentes funciones. Generalmente, poseen una subunidad  $\alpha$  que es la que constituye el poro hidrofílico en la membrana y que comunica los espacios intra y extracelulares permitiendo el flujo de iones. Además de esta subunidad principal, poseen un número variable de subunidades auxiliares denominadas  $\beta$ , que son dominios transmembrana cuyas funciones son regular la apertura y cierre del canal, su unión con otras moléculas de la matriz extracelular, la expresión de la subunidad  $\alpha$  en la superficie de la membrana celular y su localización preferente (Figura 15) (89).



**Figura 15.** Estructura de un canal iónico de membrana formado por varias subunidades y diversos dominios transmembrana. (Modificada de <http://www.itaca.edu.es/canales-ionicos.htm#estructura>).

### 2.5.2. Localización y función de los canales iónicos

Los CI en el músculo cardíaco se encuentran localizados en tres entidades estructurales y funcionales principales: los túbulos-T y cisternas terminales del RE, los costámeros y los discos intercalares (Figura 16) (90).



**Figura 16.** Principales localizaciones de los canales iónicos en la célula. (1). Túbulos-T y cisternas terminales del RE. (2). Costámeros en la membrana lateral. (3). Discos intercalares. (Modificada de Balse E et al. *Dynamic of Ion Channel Expression at the Plasma Membrane of Cardiomyocytes. Physiological Reviews* 2012;92:1317-1358).

Los CI no son simples poros acuosos, sino que desarrollan tres funciones o propiedades fundamentales:

- Permiten el flujo de iones a una velocidad superior a la que permite cualquier otro sistema biológico, de manera que el flujo de iones puede medirse como una corriente eléctrica, que puede producir importantes cambios en el potencial de membrana.
- Poseen selectividad iónica, es decir, discriminan entre los diferentes tipos de iones que pasan por su canal, además de proporcionar diferentes sitios de unión para varios iones (91).
- En respuesta a un estímulo, las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. En general, existe un estado conductor (estado abierto) y dos no conductores (inactivo y de reposo). A nivel de potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de algunos canales es mínima, pero si puede abrirse en respuesta a un estímulo adecuado (92).

### 2.5.3. Tipos y clasificación de los canales iónicos

Los CI se pueden clasificar en cuatro tipos atendiendo a sus propiedades cinéticas (de activación e inactivación), características farmacológicas y al estímulo que determina el cambio conformacional en:

- Activados por cambios de voltaje (canales voltaje-dependientes).
- Activados tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular (canales receptor-dependientes).

- Activados por mediadores intracelulares ( $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, nucleótidos cíclicos, proteína-quinasa, ácido araquidónico y sus derivados).
- Activados tras deformación mecánica celular (distensión o aumento del volumen celular).

Sin embargo, esta división resulta muchas veces artificial, ya que la despolarización de la membrana puede inducir la liberación de neurotransmisores y ligandos endógenos y activar canales activados por receptores/mediadores, mientras que muchos ligandos endógenos pueden también modificar el potencial de membrana celular y activar canales voltaje-dependientes (92).

Otro tipo de clasificación hace referencia a los tipos de iones que dejan pasar a través del poro en la membrana. De este modo, los CI se clasifican en canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Atendiendo a esta clasificación, y teniendo en cuenta la clasificación propuesta anteriormente, en las sucesivas páginas se detallan los tipos de CI cardíacos y las corrientes iónicas que generan (Tabla 4).

Los CI dependientes de voltaje de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  son los principales responsables de generar y dar forma a los potenciales de acción cardíacos, así como las bombas de intercambio iónico que contribuyen a los flujos iónicos (93).

#### 2.5.3.1. Canales iónicos de $\text{Na}^+$

Los CI de  $\text{Na}^+$  constituyen el arquetipo de CI dependientes de voltaje. El canal humano cardíaco  $\text{Na}_v1.5$  es un miembro de la familia de CI dependientes de voltaje y es el principal responsable de generar las

corrientes de  $\text{Na}^+$ , denominadas  $I_{\text{Na}}$  (93). Este canal está formado por una subunidad principal  $\alpha$  que constituye el canal funcional y múltiples subunidades secundarias  $\beta$ . Posee cuatro dominios homólogos, DI-DIV (94), dispuestos formando una simetría circular para formar el canal (91). Se ha visto que las subunidades  $\beta$  codificadas por los genes *SCN1-4B* tienen un papel relevante en su expresión en la superficie celular, modulan su apertura y cierre y la dependencia de voltaje de la  $I_{\text{Na}}$  (95, 96).

El principal factor determinante para que se produzca la despolarización de la membrana de cardiomiocitos tanto auriculares como ventriculares es la  $I_{\text{Na}}$ . La activación de los canales de  $\text{Na}^+$  conduce a una rápida despolarización de las fibras cardíacas, produciéndose un cambio en el potencial de membrana desde aproximadamente -85 mV hasta -25 mV en un periodo de tiempo de 10 milisegundos (fase 0 del potencial de acción) (97). Los canales de  $\text{Na}^+$  se inactivan con la misma rapidez, y sólo una pequeña cantidad se encuentran abiertos mientras se propaga el potencial de acción (93).

#### 2.5.3.2. Canales iónicos de $\text{Ca}^{2+}$

Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son los principales iones de señalización intracelular. Regulan el acople entre excitación-contracción, la secreción y la actividad de un gran número de enzimas y Cl. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra altamente regulada a pesar de su marcada fluctuación durante la sístole y diástole (91).

Los Cl de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen la principal entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, además de los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX (91).

Después de la rápida despolarización (fase 0) llevada a cabo por la entrada de  $\text{Na}^+$  en el cardiomiocito a través de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, estos canales inducen la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (93).

En el músculo cardíaco existen dos tipos de CI de  $\text{Ca}^{2+}$ : los de tipo L (de bajo umbral) y los de tipo T (tipo transitorio) que transportan  $\text{Ca}^{2+}$  hacia las células. Los primeros se encuentran en todas las células cardíacas. Los de tipo T se encuentran principalmente en las células marcapasos, las fibras de Purkinje y las auriculares (91). Se ha descrito que existe expresión de ambos tipos de canales en el corazón. Los de tipo T son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorios activados por bajo voltaje que se expresan funcionalmente durante el desarrollo, mientras que en cardiomiocitos adultos su expresión se encuentra muy reducida (98). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L poseen elevadas conductancias de canal único y generan corrientes duraderas, además de activarse por alto voltaje (99). Se encuentran en abundancia y se expresan de forma ubicua en el corazón (100).

La apertura de los CI de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L va con retraso y su inactivación ocurre de forma más lenta respecto a los canales de  $\text{Na}^+$  y es dependiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (101). Esta inactivación lenta de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la regulación precisa que ejercen las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  constituyen las bases de la fase *Plateau* (fase 2) del potencial de acción observada en los cardiomiocitos ventriculares.

Los CI de  $\text{Ca}^{2+}$  poseen una estructura similar a la de los canales de  $\text{Na}^+$ , consistente en 4 dominios homólogos, cada uno con 6 segmentos transmembrana (91). El principal canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L cardíaco está

formado por la subunidad  $\alpha$ , codificada por el gen *CACNA1C*, que codifica la proteína  $\text{Ca}_v1.2$ . Además de esta subunidad, el complejo funcional del canal consta de las subunidades auxiliares  $\beta$  y  $\alpha2/\delta$  (100). Estas dos últimas subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuro y están íntimamente asociadas a la subunidad principal (102). Las cuatro subunidades  $\beta$  codificadas por los genes *CACNB1-4* se encargan de modificar las corrientes iónicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , y del tráfico de complejos proteicos del canal hacia las membranas celulares, (103-105) siendo la subunidad  $\beta_2$  la predominante en el corazón (106).

#### 2.5.3.3. Canales iónicos de $\text{K}^+$

Los CI de  $\text{K}^+$  forman la categoría más heterogénea, numerosa y ubicua de proteínas de membrana (107-109). Se clasifican en tres amplias categorías basadas en el número de segmentos transmembrana:

- Canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje con seis segmentos transmembrana ( $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  y  $I_{KCa}$ ).
- Canales de  $\text{K}^+$  rectificadores de entrada con dos segmentos transmembrana y un poro ( $I_{K1}$ ,  $I_{KATP}$ , y  $I_{KAch}$ ).
- Canales de  $\text{K}^+$  de trasfondo con cuatro segmentos transmembrana y dos poros ( $I_{Kp}$ ).

Las diferencias regionales del potencial de acción en las aurículas, ventrículos y a través de las paredes del miocardio vienen determinadas por la variación en el nivel de expresión de estos canales. Presentan una regulación muy precisa, constituyendo la base del cambio en la configuración del potencial de acción en respuesta a variaciones del ritmo cardíaco (91).

Los CI de  $K^+$  dependientes de voltaje con seis segmentos transmembrana están formados por subunidades principales  $\alpha$  que dan lugar a un único poro y múltiples subunidades  $\beta$  auxiliares. A este grupo pertenecen los canales Kv1-4, los *KCNH*, los activados al aumentar la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  *KCNM* y *KCNN* y los *KCNQ* (108). Estos canales se activan durante la despolarización celular y participan en las diferentes fases de la repolarización del potencial de acción celular, modulando la frecuencia y morfología del mismo (92). La estructura de estos canales es similar a uno de los cuatro dominios de los canales de  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$ , y dependiendo del tipo de canal forman homo o heterotetrámeros. Las subunidades accesorias incrementan la actividad del canal y alteran sus propiedades cinéticas (91).

Los canales de  $K^+$  rectificadores de entrada con dos segmentos transmembrana y un poro, constituyen tres corrientes principales ( $I_{K1}$ ,  $I_{KATP}$  y  $I_{KAch}$ ), de las que son responsables los canales Kir, codificados por la familia génica *KCNJ* (110). Juegan un papel importante en la regulación del potencial en reposo celular, evitando la pérdida masiva de iones  $K^+$  intracelulares (108, 111). Estos canales con dos segmentos transmembrana y dos poros, generalmente forman homotetrámeros o heterotetrámeros de cuatro subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (99, 107, 110, 112, 113).

Los canales de  $K^+$  responsables de las corrientes de trasfondo ( $I_{KP}$ ) pertenecen a la familia génica *KCNK* y poseen una estructura diferente a los demás tipos, tienen cuatro segmentos transmembrana y dos poros formando homo o heterodímeros. Las corrientes generadas por estos canales participan en todas las fases del potencial de acción y generalmente no son dependientes de voltaje, si no que se activan o inactivan en función

de uniones a diferentes ligandos o variaciones en parámetros físico-químicos como el pH, la temperatura, ácidos grasos, anestésicos o la distensión mecánica (114).

#### 2.5.3.4. Canales iónicos de Cl<sup>-</sup>

Los canales de Cl<sup>-</sup> poseen un papel muy relevante en la regulación del potencial de membrana de los cardiomiocitos y pueden ser activados por cambios de voltaje, ligandos endógenos o fuerzas físicas como la distensión celular (92). Se han descrito seis corrientes cardíacas diferentes de Cl<sup>-</sup> (115).

- Corriente de Cl<sup>-</sup> activada por proteína kinasa A (PKA) intracelular ( $I_{Cl,PKA}$ ).
- Corriente de Cl<sup>-</sup> activada por proteína kinasa C (PKC) intracelular ( $I_{Cl,PKC}$ ).
- Corriente de Cl<sup>-</sup> activada por proteína ATP extracelular ( $I_{Cl,ATP}$ ).
- Corriente de Cl<sup>-</sup> activada por Ca<sup>2+</sup> intracelular ( $I_{Cl,Ca}$ ).
- Corriente de Cl<sup>-</sup> activada por cambios en el volumen celular ( $I_{Cl,Vol}$ ).
- Corriente de Cl<sup>-</sup> rectificadora de entrada ( $I_{Cl,ir}$ ).

Las tres primeras corrientes han sido englobadas dentro de la corriente  $I_{Cl,CFTR}$  (115, 116). Se ha descrito que están codificadas por el gen *CFTR* (117-119) y se activan en la fase 1 del potencial de acción (120, 121). La corriente  $I_{Cl,PKA}$  se activa en presencia de AMPc lo que estimula la actividad de la PKA durante la fase 1 del potencial de acción (122, 123).

La corriente  $I_{Cl,Ca}$  puede generar corrientes de entrada o de salida en función del potencial de membrana. Está codificada por el gen *CLCA* (124) y a potenciales de membrana positivos, esta corriente genera una corriente

transitoria de salida ( $I_{to2}$ ) que junto con la corriente  $I_{to1}$  inicia la repolarización (fase 1) en las células cardíacas. El papel real de esta corriente en el control de la fase 1 de repolarización depende altamente de la cantidad de  $Ca^{2+}$  que entre a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje así como de los numerosos factores que regulan la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RE (115, 125, 126).

La corriente  $I_{Cl,vol}$  aumenta la corriente de salida repolarizante durante la fase *Plateau* del potencial de acción y produce un pequeño aumento de la corriente de entrada despolarizante cercana al potencial de membrana en reposo (127). Está codificada por el gen *CLCN3* (proteína ClC-3) (128, 129). La corriente  $I_{Cl,ir}$  está codificada por el gen *CLCN2* y se activa en respuesta a distensión celular o variaciones en el pH (130-132). Se activa durante la fase 4 del potencial de acción cardíaco, contribuyendo a la restitución de las concentraciones iónicas (116, 131).

**Tabla 4.** Principales corrientes iónicas cardíacas y genes responsables de las mismas.

Corriente	Descripción	Fase PA	Mecanismo de activación	Proteína	Gen
$I_{Na}$	Corriente de sodio	0	VD	$Na_v1.5$	<i>SCN5A</i>
$I_{Ca,L}$	Corriente de calcio tipo L	2	VD	$Ca_v1.2$	<i>CACNA1C</i>
$I_{Ca,T}$	Corriente de calcio tipo T	2	VD	$Ca_v3.1/3.2$	<i>CACNA1G</i>
$I_{to,f}$	Corriente de potasio transitoria de salida rápida	1	VD	$K_v4.2/4.3$	<i>KCND2/3</i>
$I_{to,s}$	Corriente de potasio transitoria de salida lenta	1	VD	$K_v1.4/1.7/3.4$	<i>KCNA4</i> <i>KCNA7</i> <i>KCNC4</i>
$I_{Kur}$	Corriente de potasio rectificadora de salida ultrarápida	2 y 3	VD	$K_v1.5/3.1$	<i>KCNA5</i> <i>KCNC1</i>

$I_{Kr}$	Corriente de potasio rectificadora de salida rápida	2 y 3	VD	HERG	<i>KCNH2</i>
$I_{Ks}$	Corriente de potasio rectificadora de salida lenta	2 y 3	VD	KVLQT1	<i>KCNQ1</i>
$I_{KCa}$	Corriente de potasio activada por calcio	2 y 3	Ca <sup>2+</sup>	SK, BK	<i>KCNMA1</i> <i>KCNN1-4</i>
$I_{K1}$	Corriente de potasio rectificadora de entrada	3	VD	Kir 2.1/2.2/2.3	<i>KCNJ2/4/12</i>
$I_{KATP}$	Corriente de potasio dependiente de ATP	3	[ADP]/[ATP] ↑	Kir 6.2 (SURA)	<i>KCNJ11</i>
$I_{KAch}$	Corriente de potasio dependiente de Acetilcolina	3	Acetilcolina	Kir 3.1/3.4	<i>KCNJ3/5</i>
$I_{KP}$	Corrientes de potasio de trasfondo	Todas	Metabolismo, distensión	TWIK-1/2 TASK-1 TRAAK	<i>KCNK1/6</i> <i>KCNK3</i> <i>KCNK4</i>
$I_F$	Corrientes marcapasos	4	VH	HCN2/4	<i>HCN2/4</i>
$I_{Cl,PKA}$	Corriente de cloro activada por PKA intracelular	1	AMPC-PKA	CFTR	<i>CFTR</i>
$I_{Cl,PKC}$	Corriente de cloro activada por PKC intracelular	1	PKC	CFTR	<i>CFTR</i>
$I_{Cl,ATP}$	Corriente de cloro activada por ATP extracelular	1	ATP	CFTR	<i>CFTR</i>
$I_{Cl,Ca}$	Corriente de cloro activada por Ca intracelular	1	[Ca <sup>2+</sup> ] intracelular	CLCA	<i>CLCA</i>
$I_{Cl,Vol}$	Corriente de cloro activada por cambios en el volumen celular	2	Distensión celular	CIC-3	<i>CLCN3</i>
$I_{Cl,ir}$	Corriente rectificadora de entrada de cloro	4	Activación basal, distensión celular, pH	CIC-2	<i>CLCN2</i>

PA, potencial de acción; VD, voltaje despolarización; VH, voltaje hiperpolarización; PKA, fosfoquinasa A; PKC, fosfoquinasa C.

#### 2.5.4. Los potenciales de acción cardíacos e implicación de los canales iónicos

Los cardiomiocitos tienen la propiedad de poder excitarse en respuesta a un estímulo y generar un potencial de acción que va asociado a una respuesta contráctil. El potencial de acción es el cambio reversible en el potencial de membrana que se produce al activarse de forma secuencial diversas corrientes iónicas generadas al producirse una difusión de iones a favor de su gradiente electroquímico. De esta manera, durante la despolarización, el interior celular pasa de estar cargado negativamente a estarlo positivamente (alcanzando +20 ó +30 mV) para luego repolarizarse hasta recuperar de nuevo los -85 mV (99).

Los diferentes tipos celulares que conforman el corazón, como las células auriculares, ventriculares y del sistema de conducción His-Purkinje, en reposo presentan este potencial en reposo negativo (alrededor de -85 mV). Cuando la célula es excitada, se produce una despolarización de la membrana que, si supera el potencial umbral (alrededor de -65 mV), se genera un potencial de acción (91).

La secuencia normal y la contracción sincronizada de las aurículas y ventrículos requieren la rápida activación de grupos de células cardíacas. El mecanismo de activación debe permitir que se produzcan cambios rápidos en el ritmo cardíaco. El potencial de acción de propagación cardíaco permite que se cumplan todos estos procesos. Consta de 5 fases en las que los CI cardíacos regulan el flujo de iones adecuado para cada una de ellas (Figura 17):

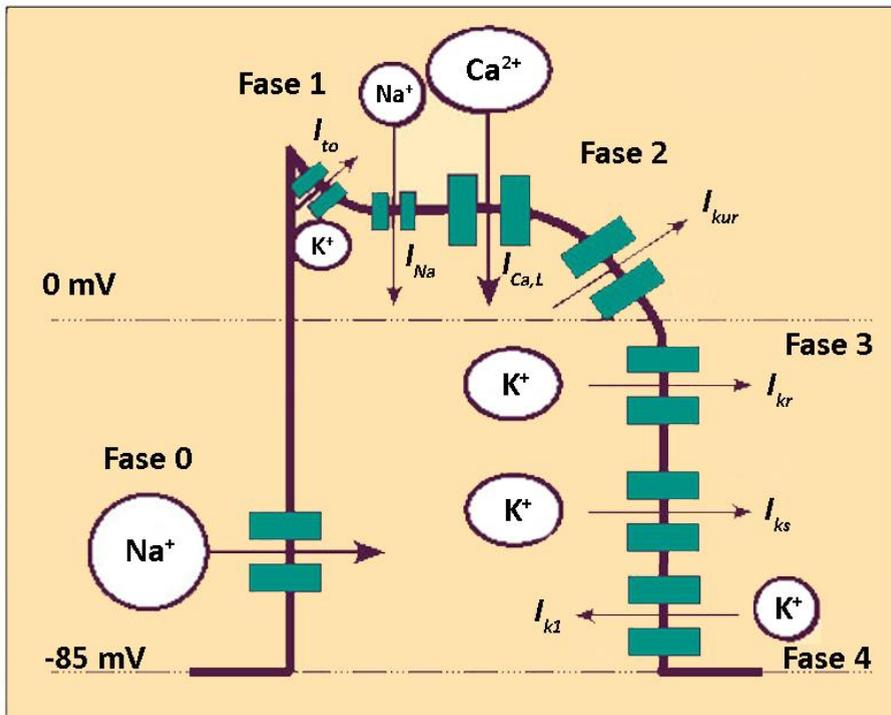
- Fase 0: es la fase en la que se produce una rápida despolarización. El potencial de membrana se desplaza hacia un rango de voltaje positivo. Es consecuencia de una entrada masiva de iones  $\text{Na}^+$  a través de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, que generan una corriente rápida de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ). La activación de estos canales se produce con la despolarización. Se mantienen abiertos permitiendo la entrada de iones  $\text{Na}^+$  durante 1 o 2 milisegundos y después pasan a un estado inactivo. Esta fase es fundamental para que se produzca la rápida propagación del impulso cardíaco.
- Fase 1: es una fase de rápida repolarización. Se produce a causa de la activación de una corriente de rápida activación e inactivación, que es la corriente transitoria ( $I_{\text{to}}$ ). No todas las células cardíacas presentan esta corriente, sólo algunas como las células de His-Purkinje y el epicardio ventricular. También participan otras corrientes como las de  $\text{Cl}^-$   $I_{\text{Cl,CFTR}}$  y  $I_{\text{Cl,PKA}}$ . Esta fase establece el potencial para la siguiente fase del potencial de acción.
- Fase 2: es la fase *Plateau* o de meseta que es la más larga. Es una fase única en las células excitables y marca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Se produce un equilibrio entre:
  - dos corrientes de entrada: una de  $\text{Na}^+$ , a través de la pequeña fracción de  $\text{Cl}$  que no se han inactivado completamente al final de la fase 0, lo que genera la corriente lenta de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{NaL}}$ ) y la de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L que genera la corriente  $I_{\text{Ca}}$ .

- tres corrientes rectificadoras tardías de salida de  $K^+$  de activación ultrarrápida ( $I_{Kur}$ ), rápida ( $I_{Kr}$ ) y lenta ( $I_{Ks}$ ) y una corriente de salida de  $Cl^-$  ( $I_{Cl,Vol}$ ).

La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de la  $I_{Ca}$  dispara la contracción de la célula cardíaca. De hecho, esta entrada de  $Ca^{2+}$  estimula los receptores RyR2 localizados en la superficie del RE y dispara la liberación del  $Ca^{2+}$  almacenado en su lumen. El  $Ca^{2+}$  liberado al citosol se une a la troponina C e inicia el proceso contráctil, uniendo la excitación eléctrica y la respuesta contráctil (acoplamiento electromecánico). Por otro lado, la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RE inactiva el canal de  $Ca^{2+}$ , lo que evita una entrada excesiva de  $Ca^{2+}$  en la célula.

- Fase 3: se produce una aceleración de la repolarización a causa de la inactivación de las corrientes de entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , y la apertura de SERCA2 que almacena el  $Ca^{2+}$  de nuevo en el RE y el predominio de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  activadas durante la fase 2. Al final de la fase 3 se activan otras 3 corrientes de  $K^+$ :
  - Corriente de rectificación interna ( $I_{K1}$ ) que rectifica las corrientes de  $K^+$  para lograr un potencial de membrana en reposo. La densidad de esta corriente es mayor en los cardiomiocitos ventriculares.
  - Corriente generada por canales activados cuando se produce una disminución de los niveles de ATP ( $I_{KATP}$ ). Ello evidencia el mecanismo de acoplamiento entre la actividad eléctrica y metabólica en los cardiomiocitos.

- Corriente generada por canales acoplados a proteínas G inhibitorias y activados por acetilcolina ( $I_{KACH}$ ).
- Fase 4: es la comprendida entre dos potenciales de acción y se corresponde con la diástole, durante esta fase el potencial de membrana permanece estable en su estado de reposo. Es la fase en la que se restituyen las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana participando en ella diversas corrientes antes mencionadas y las producidas por el intercambiador NCX.



**Figura 17.** Esquema de las fases del potencial de acción cardíaco y las principales corrientes iónicas que actúan durante el mismo. Las flechas indican la dirección del flujo iónico. (Extraída de <http://www.urgenciauc.cl/>).

### 2.5.5. Alteraciones de los canales iónicos en la insuficiencia cardíaca

En la IC se produce un desacople entre los procesos de contracción y relajación del músculo cardíaco (133, 134). Los CI son componentes clave para que dicho proceso de contracción-relajación del corazón funcione adecuadamente. Se han llevado a cabo diversos estudios basados en el análisis de mutaciones en genes codificantes de CI que afectan a síndromes cardíacos extensamente estudiados, centrados principalmente en trastornos de la conducción como la fibrilación ventricular (135) y el síndrome de Brugada (136), entre otros.

No menos relevantes que las mutaciones en genes codificantes de CI son las alteraciones a nivel de expresión génica. Existen estudios basados en el análisis de expresión génica diferencial de estos CI en enfermedades cardiovasculares (137, 138). También se han realizado análisis que cuantifican el ARNm de canales de sodio (139, 140), cloro (141), y sobretodo, debido al relevante papel en la contracción cardíaca, hay estudios en canales de calcio (142-147), y a causa de su gran diversidad e implicación en diversos síndromes, hay trabajos demostrando los cambios de expresión de un gran número de canales de potasio (138, 139, 148, 149).

Todos estos estudios revelan que las alteraciones a nivel génico tanto mutacionales como de expresión de genes codificantes de CI, se relacionan íntimamente con el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares, y que su importancia radica en que desarrollan una función esencial para el funcionamiento del proceso de contracción-relajación del músculo cardíaco.



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

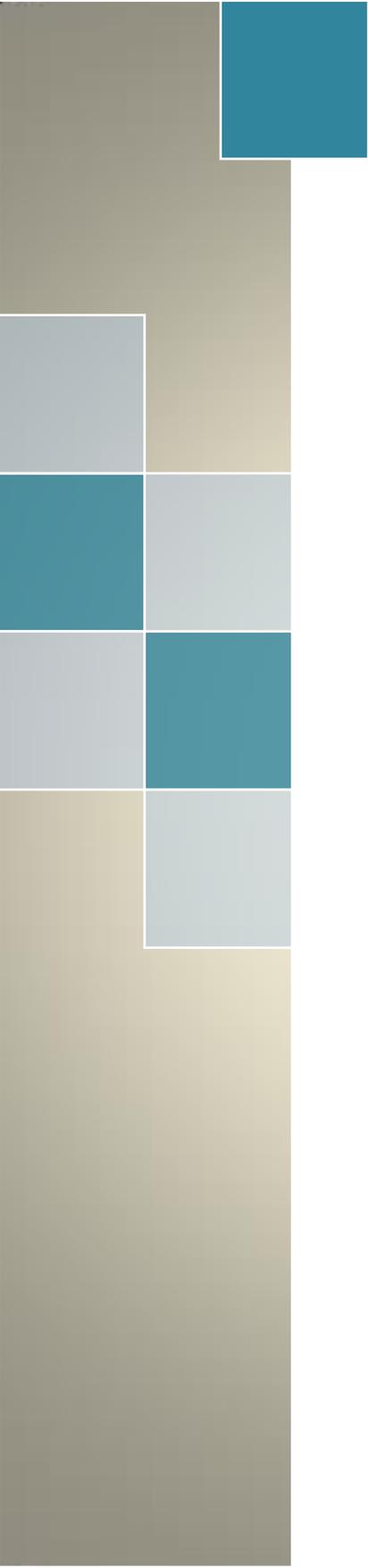


La insuficiencia cardíaca es un síndrome muy complejo, etapa final de muchas enfermedades como la miocardiopatía dilatada y la isquémica. Es el resultado, no sólo de un daño miocárdico, sino de alteraciones en los distintos procesos que participan en la homeostasis del miocardio. Una de las funciones que se encuentran comprometidas en esta patología es la contracción del corazón. Las alteraciones en la estructura y función cardíacas desencadenan esta disfunción contráctil que se observa tanto en la miocardiopatía dilatada, en la que se produce una gran dilatación del corazón, como en la isquémica, en la que se reemplaza el tejido contráctil por zonas de tejido fibrótico. A nivel molecular existe una interacción entre distintos mecanismos que actúan sobre la función de los cardiomiocitos.

Por todo ello, nuestra hipótesis de trabajo es que en un grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada de etiologías dilatada e isquémica, puede existir una alteración global en los distintos componentes implicados en la contracción del músculo cardíaco. Estas alteraciones se hallarían tanto en las moléculas que componen el retículo endoplásmico, orgánulo implicado en la homeostasis de calcio durante el proceso de contracción-relajación, como en los canales iónicos de membrana, que regulan de forma precisa el flujo iónico necesario para la contracción y relajación del miocardio. Además, nos planteamos que las alteraciones en estos componentes podrían guardar relación con parámetros de función ventricular de los pacientes del estudio, pudiendo destacar dichas moléculas como potenciales dianas terapéuticas en la insuficiencia cardíaca.

Analizando un grupo de pacientes diagnosticados de insuficiencia cardíaca, de etiologías dilatada e isquémica, y un grupo de pacientes control sin enfermedad cardíaca, se pretende probar la hipótesis de esta Tesis Doctoral mediante los siguientes objetivos:

1. Analizar las posibles alteraciones en los niveles proteicos de componentes estructurales del retículo endoplásmico y moléculas relacionadas con el estrés de este orgánulo en muestras de ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardíaca.
2. Estudiar las relaciones entre las proteínas alteradas del retículo endoplásmico entre sí y con los parámetros de función ventricular de nuestros pacientes.
3. Determinar los cambios en la expresión génica de canales iónicos, en muestras de tejido ventricular de pacientes con insuficiencia cardíaca, mediante microarrays de expresión y secuenciación de ARN.
4. Estudiar las relaciones entre los genes de canales iónicos diferencialmente expresados y la disfunción ventricular presente en nuestros pacientes.



# III. MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. GRUPOS CLÍNICOS

El grupo de pacientes a partir del cual se extrajeron muestras de VI estuvo formado por individuos con IC sometidos a trasplante cardíaco y procedentes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Todos los pacientes fueron diagnosticados de IC siguiendo los criterios de la ESC y de la AHA (2, 5). La historia clínica previa de cada paciente, en la cual se recogían sus antecedentes hospitalarios (diagnóstico de otras enfermedades, fecha de inicio de la IC, comorbilidades), se encontraba a disposición del Hospital. Además, a estos pacientes se les realizó un estudio pre-trasplante en el Servicio de Cardiología del Hospital en el cual se llevaron a cabo pruebas bioquímicas y hematológicas, ECG, radiografía de tórax, estudio hemodinámico, estudio eco-Doppler y angiografía coronaria.

El diagnóstico de los pacientes con IC fue multifactorial, estableciéndose la etiología a través de un consenso entre la OMS y la *World Heart Federation* (WHF) para la definición de las miocardiopatías (21). Se consideró que la etiología era dilatada no isquémica cuando los pacientes no mostraron antecedentes de angina de pecho típica o infarto de miocardio, el ECG no mostró signos de necrosis miocárdica y las coronarias eran normales en la angiografía coronaria, además de poseer disfunción sistólica del VI ( $FE < 40\%$ ) con dilatación del VI (diámetro diastólico del VI (DTDVI)  $> 55\text{mm}$ ) sin presencia de hipertrofia en la ecocardiografía. Por otro lado, se consideró que la etiología era isquémica cuando los pacientes habían tenido episodios previos documentados de infarto agudo de miocardio, la ecocardiografía mostraba segmentos de contractibilidad normales coexistiendo con otros disquinéticos o aquinéticos, y el ECG mostraba signos de isquemia o necrosis miocárdica.

Además, ninguno de los pacientes había sido diagnosticado de enfermedad valvular primaria.

Todos los pacientes habían sido sometidos a pruebas de esfuerzo y estaban clasificados funcionalmente de acuerdo con los criterios de la NYHA mencionados anteriormente. Además, se encontraban bajo tratamiento médico estable de acuerdo con las guías de la ESC (2).

El grupo control (CNT) estuvo formado por 14 donantes de corazón que fueron considerados inicialmente para trasplante cardíaco pero fueron posteriormente considerados no aptos, bien por incompatibilidad de tamaño o de tipo sanguíneo. Este grupo CNT tenía una media de edad de  $46 \pm 17$  años y el 69,2% eran hombres. No poseía antecedentes de enfermedad cardiovascular, la función ventricular izquierda era normal (>50%) y no había infección activa en el momento del trasplante. La causa de muerte fue por accidente cerebrovascular (68%) o de tráfico (32%).

De las 85 muestras de VI, para el análisis de proteínas del RE se utilizaron un total de 52 muestras (MCD, n=21; MCI, n=21, CNT, n=10). En el ensayo de microarrays se utilizaron 17 muestras (MCD, n=12; CNT, n=5) y en la validación de estos resultados por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) y para el Western blot, aumentamos el tamaño muestral a 29 muestras de VI (MCD, n=21; CNT, n=8). Finalmente, en el estudio de secuenciación de ARN (RNA-seq) se utilizaron 36 muestras (MCD, n=13; MCI, n=13; CNT, n=10), para completar este estudio con validaciones de expresión génica y análisis proteicos de CI en la MCD se aumentó el tamaño muestral (MCD, n=19), y para la validación por RT-qPCR y Western blot en la MCI (MCI, n=14). La Tabla 1 representa las características clínicas del total de pacientes utilizados en este estudio. En el Apartado de Resultados se

irán mostrando las tablas derivadas de cada subestudio con el número de pacientes analizados según el objetivo.

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes utilizados para el estudio.

	MCD (n=36)	MCI (n=35)
Edad (años)	50 ± 13	56 ± 7
Sexo masculino (%)	81	86
Clase NYHA	3,3 ± 0,4	3,2 ± 0,7
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 6	27 ± 4
Hemoglobina (mg/ml)	13 ± 2	13 ± 3
Hematocrito (%)	40 ± 6	38 ± 8
Colesterol total (mg/dl)	141 ± 41	172 ± 42*
Hipertensión previa (%)	27	42
Diabetes mellitus previa (%)	16	36
Fumadores (%)	67	83
FE (%)	20 ± 8	23 ± 7
FA (%)	11 ± 4	12 ± 4
DTSVI (mm)	65 ± 11	56 ± 8*
DTDVI (mm)	74 ± 11	64 ± 8*
Duración enfermedad (meses)	73 ± 58	65 ± 64

MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; Duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón. \*p<0,01.

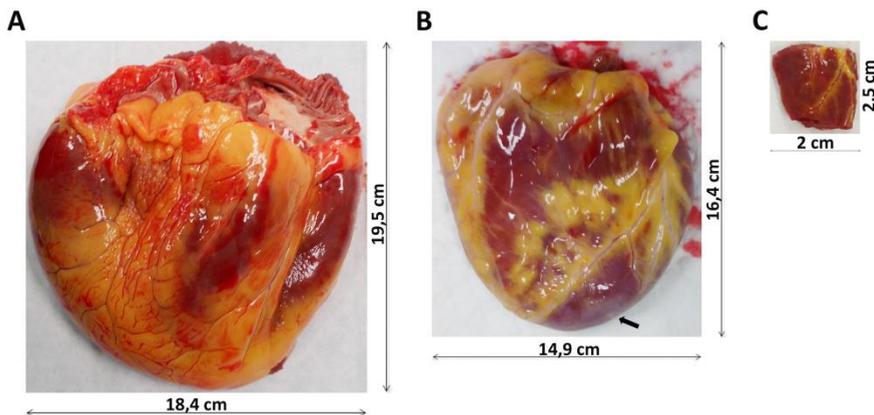
Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y se realizó de conformidad con las líneas directivas de la buena práctica clínica y las normas éticas para las experimentación humana establecida por la

Declaración de Helsinki (150). Los pacientes con MCD y MCI, o los familiares, en el caso de corazones pertenecientes al grupo CNT, dieron su consentimiento informado de forma escrita para la obtención de las muestras de tejido.

## 2. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE TEJIDO CARDÍACO

### 2.1. OBTENCIÓN

Las muestras de miocardio procedentes de corazones explantados de pacientes con MCD y MCI (Figura 1A y 1B, respectivamente) y de personas sanas como CNT, se obtuvieron de la zona del ápex del VI (tamaño aproximado 5 cm<sup>2</sup>, Figura 1C), mediante tijeras quirúrgicas. Inmediatamente tras la extracción, las muestras se introdujeron en tubos estériles con NaCl 0,9 % para su transporte en hielo, y se almacenaron a 4°C por un máximo de 4,4 ± 3 horas desde la pérdida de circulación coronaria, hasta su procesamiento y almacenamiento a -80 °C, para su posterior uso en procedimientos de extracción de proteínas y ARN.



## 2.2. PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

Una vez en el laboratorio, se comenzó con el procesamiento de las muestras a 4°C mediante bisturí y pinzas, y sobre una placa Petri con NaCl 0,9% para lavar la muestra de restos de sangre. Se eliminó la capa más externa del corazón o epicárdica y la parte más profunda del endocardio, donde se encuentran los músculos papilares, quedándose con la parte media del endocardio que corresponde al miocardio. A continuación, se procedió a trocear la muestra en fragmentos de menor tamaño (aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>) que fueron almacenados en criotubos a -80°C debidamente rotulados con la fecha de extracción y la etiología de IC o CNT y número de muestra, para utilizarse en análisis de proteínas o ARN.

Por otro lado, se destinaron parte de los fragmentos de muestra a experimentos de inmunofluorescencia. Las muestras, tras su fragmentación en trozos de aproximadamente de 4 mm<sup>2</sup>, fueron introducidas en tubos de vidrio con tapón de rosca, debidamente rotulados y fijadas en paraformaldehído al 4% en tampón cacodilato. Al día siguiente, se pasaron a etanol al 70° hasta su posterior inclusión en parafina.

### 3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO MIOCÁRDICO

#### 3.1. HOMOGENIZACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN PROTEICA TOTAL

Se cortaron 50 mg de cada muestra de VI almacenadas previamente en criotubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras fueron introducidas en tubos *Lysing matrix D*, específicos para su uso en el homogenizador *Fast Prep* (MP Biomedicals, USA), en tampón de extracción proteica total en proporción 1/10 con el peso de la muestra (2% SDS, 10 mM EDTA, 6 mM Tris-HCl, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (25  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina y 10  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina). Se realizaron 6 pulsos de 60 segundos a 6,5 m/s con el programa CY:24x2 del homogenizador *Fast Prep* con el rotor en todo momento a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Seguidamente, se alicuotaron los homogenados obtenidos en tubos estériles tipo *ependorf* de 1,5 ml y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (*Eppendorf* Modelo 5415R). Se recogió el sobrenadante y se transfirió a tubos estériles tipo *ependorf* de 1,5 ml para realizar seguidamente la determinación proteica de las muestras.

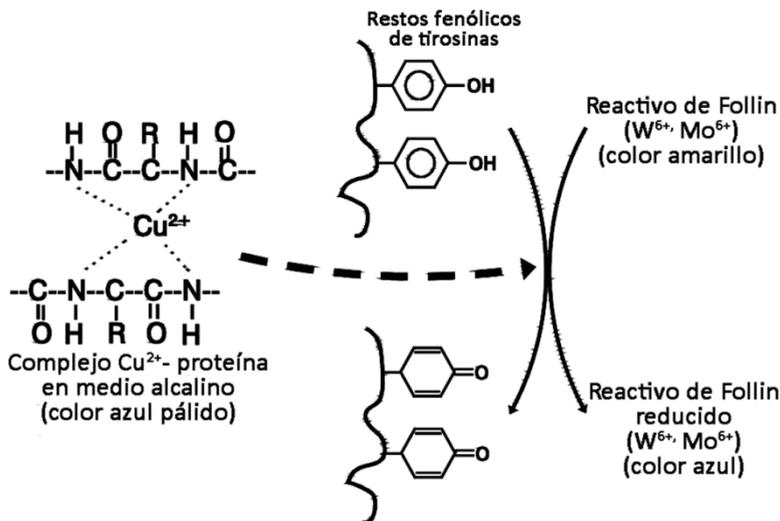
#### 3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La cuantificación de la concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante la modificación de Peterson (1977), del método espectrofotométrico de *Lowry et al.* (1951), basado en la proporcionalidad entre la intensidad de color en la disolución y la concentración proteica, según la Ley de *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde  $A$  es la absorbancia,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absortividad molar dependiente de la longitud de onda ( $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  es la longitud del camino óptico (cm), y  $C$  es la concentración de la sustancia (mol/l).

La determinación de la cantidad proteica se estableció mediante dos reacciones químicas (*Total Protein Kit., Micro Lowry, Sigma Diagnostics, San Luis, USA*) (Figura 2): (a) el tartrato cúprico en medio alcalino se une a los átomos de nitrógeno de los puentes peptídicos de las proteínas, formando complejos de color azul pálido (b) el principal componente del reactivo amarillo *Folin & Ciocalteu*, denominado ácido fosfomolibdotúngstico, es reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en las proteínas dando lugar a un color azul intenso.



**Figura 2.** Esquematación de las dos reacciones químicas en las que se basa el método de Lowry. (Modificada de [yunelijo-k.blogspot.com](http://yunelijo-k.blogspot.com)).

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 620 nm, utilizando la longitud de onda de 450 nm como referencia. La concentración proteica se calculó por interpolación de la absorbancia utilizando una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA) a distintas concentraciones como estándar (151).

Después de determinar la concentración de proteínas de las muestras, se hicieron alícuotas de 60  $\mu$ l en tubos estériles de 0,5 ml, que se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en técnicas de análisis de proteínas y de ARN.

### 3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

#### 3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la utilización de las muestras en la electroforesis, previamente se procedió a su descongelación a  $4^{\circ}\text{C}$  y su preparación. El volumen final de carga en cada pocillo varió en función de la cantidad de pocillos de cada gel. Se utilizaron geles *NuPAGE*<sup>®</sup> *Novex* Bis-Tris 4-12% de poliacrilamida de 20 y 26 pocillos, así como geles *NuPAGE*<sup>®</sup> *Novex* Tris-Acetato 3-8% de 20 pocillos para la separación electroforética de proteínas con un mayor peso molecular. El volumen final de carga en los geles de 20 pocillos fue de 25  $\mu$ l y para los geles de 26 pocillos fue de 15  $\mu$ l. Se utilizaron condiciones de electroforesis tanto reductoras como no reductoras. La Tabla 2 muestra la preparación de las muestras en función del tipo de gel y condición utilizados.

**Tabla 2.** Preparación de las muestras según el tipo de gel de electroforesis y las condiciones utilizadas.

	<i>NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel, 4–12% polyacrylamide</i>		<i>NuPAGE® Novex Tris Acetate Gel, 3–8% polyacrylamide</i>	
	20 pocillos	26 pocillos	20 pocillos	
<b>Muestra</b>	*	*	*	
<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)</i>	6,25	3,75	6,25	
<i>NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)</i>	2,5   -	1,5   -	2,5	-
<b>Agua bidestilada</b>	**	***	**	

\* Volumen de muestra necesario para tener una concentración de proteína de 45 µg/µl.  
 Volumen de agua bidestilada necesario para completar el volumen final de \*\*25 y \*\*\*15 µl.

### 3.3.1.1. Electroforesis en condiciones no reductoras

Posteriormente a la preparación de las muestras para su carga en el gel, éstas se calentaron a 70°C durante 10 minutos en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*). Los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) que contenía el tampón de electroforesis MES 1X (*20X NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen*). Seguidamente, se cargó el marcador de peso molecular conocido en el primer pocillo (*Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen*) y el volumen de carga correspondiente.

La separación electroforética de las diferentes proteínas se realizó de acuerdo con el procedimiento desarrollado por *Laemmli* en 1970 (152) y las

condiciones de voltaje y amperaje fueron de 200 V y 200 mA respectivamente durante 90 minutos en el caso de geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris* y de 150 V y 90mA respectivamente durante 120 minutos para geles *NuPAGE® Novex Tris-Acetato*. De este modo se separaron proteínas de pesos comprendidos entre 3,5 y 260 KDa, ambos geles verticales (13 x 8,3 cm) de poliacrilamida en gradiente (4-12% y 3-8%, respectivamente) con 20 y 26 pocillos.

Mediante este tipo de electroforesis SDS-PAGE las proteínas se separaron en función de su tamaño y carga, debido a la utilización del detergente aniónico SDS que permite la desnaturalización de las proteínas al eliminar su estructura secundaria y terciaria, y además las carga negativamente de forma proporcional a su masa.

### 3.3.1.2. Electroforesis en condiciones reductoras

En la electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, además de producirse la desnaturalización de las proteínas, se reducen los puentes disulfuro mediante la adición a las muestras de un agente reductor como puede ser el ditioneitol (DTT) o el 2-mercaptoetanol.

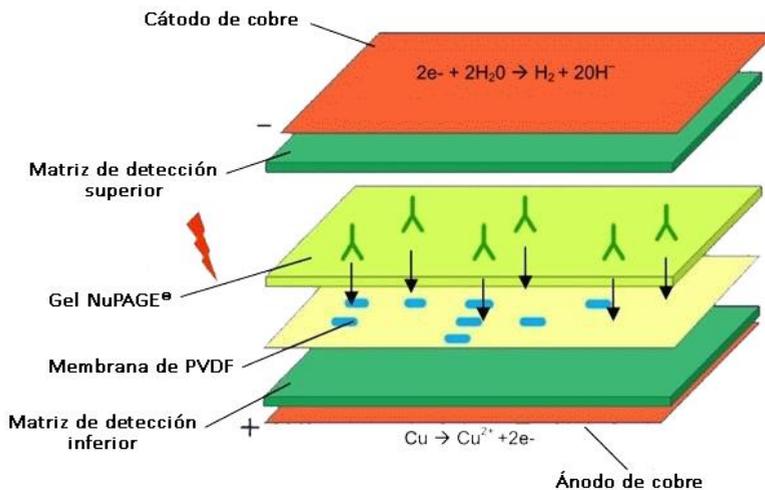
Los geles se corrieron en condiciones reductoras tanto de Bis-Tris 4-12% de poliacrilamida como de Tris-Acetato 3-8% de poliacrilamida. Después de la preparación de las muestras con el agente reductor (*NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)*, *Invitrogen*), éstas se calentaron en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks*, *Barnstead International*) durante 10 minutos a 70°C. A continuación los geles se pusieron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner*, *Invitrogen*) con tampón MES 1X (20X *NuPAGE® MES SDS*

*Running Buffer, Invitrogen*) y agente antioxidante (1/400, *NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen*) en la zona de la cubeta en contacto con los geles (cámaras internas).

Después de la electroforesis, se procedió a la transferencia y tinción de los geles.

### 3.3.2. Transferencia en seco

La transferencia de las proteínas separadas en geles de poliacrilamida a membranas de PVDF se realizó mediante la utilización del sistema en seco *iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen)*. La transferencia de proteínas desde el gel a la membrana se produce por un campo eléctrico (electrotransferencia) mediante el montaje de un *sandwich* con los componentes requeridos (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la transferencia en seco mediante el sistema *iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen)*. (Modificada de <https://www.thermofisher.com>).

Los *iBlot® Gel Transfer Stacks* (matrices gelificadas superior e inferior) incorporan los tampones de ánodo y cátodo actuando como depósitos de iones. Este formato elimina la necesidad de utilizar tampones elaborados previamente y permite minimizar la manipulación y aumenta la consistencia de la transferencia al no generar el ánodo de cobre átomos de oxígeno como resultado de la electrolisis del agua, como ocurre en la transferencia húmeda.

El diseño de la unidad *iBlot® Gel Transfer Device* reduce la distancia entre los electrodos y el voltaje necesario. Este sistema, combinado con la tecnología de la matriz gelificada de los *iBlot® Gel Transfer Stacks*, le permite generar una alta energía y corriente que aumentan la velocidad y reducen el tiempo de transferencia de las proteínas.

Para realizar la transferencia, en primer lugar, se desencastró el gel del *cassette* por medio de una espátula, y se situó sobre un papel de filtro humedecido (*iBlot® Filter Paper*), se eliminó la parte inferior o reborde y la parte superior correspondiente a los pocillos (*Stacking gel*). A continuación, se destapó el envoltorio conjunto del ánodo y el cátodo (*iBlot® 2 Transfer Stacks*) y se separaron ambas partes gracias al papel separador que se encuentra diferenciándolas. Sobre la parte correspondiente al ánodo que contenía la membrana de PVDF (0,2  $\mu\text{m}$ ), se colocó el gel en contacto directo con la membrana, quedando el papel de filtro en la parte superior. Para evitar la aparición de posibles burbujas en la membrana durante la transferencia, se utilizó el rodillo *Blotting Roller*. Seguidamente, se colocó el cátodo sobre el papel de filtro, quedando la superficie de cobre en la cara externa y se volvieron a eliminar las posibles burbujas con el *Blotting Roller*. Por último, se colocó el *sandwich* sobre el dispositivo *iBlot® 2 Gel Transfer*

*Device* y en la parte superior, sobre el cátodo, se colocó una esponja de resina de melamina gris (*iBlot® 2 Absorbent Pad*), que lleva una tira metálica adherida para hacer contacto con la tapa de la unidad de transferencia, y de esta forma completar el circuito eléctrico. Esta esponja absorbe el exceso de líquido de los *stacks* que se produce durante la transferencia y genera la presión necesaria y uniforme para el ensamblaje de las diferentes partes dentro de la unidad. Finalmente, se cerró la tapa del dispositivo *iBlot® 2 Gel Transfer Device* y se eligió un programa de transferencia con un voltaje constante de 20 V y una duración de 10 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de transferencia, se tiñó el gel para comprobar la eficacia de la misma. La membrana de PVDF se incubó inmediatamente, con tampón TBS con 0,05% de Tween (TBS-T) y 1% de BSA (*Tipo V, Sigma*), durante toda la noche a 4°C, para bloquear los sitios de unión inespecíficos.

### 3.3.3. Tinción de geles

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con el kit de tinción de *Coomassie (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen)*. El gel se agitó sumergido en la solución de tinción (20% *Stainer A*, 5% *Stainer B* y 20% metanol) durante un mínimo de 3 horas y un máximo de 12 horas. A continuación, se lavó con agua bidestilada, para eliminar el exceso de tinción, en agitación suave durante al menos 7 horas y un máximo de 3 días; o hasta que no se aprecian cambios en la intensidad de las bandas.

### 3.3.4. Inmunodetección de proteínas

El protocolo utilizado para detectar las proteínas transferidas se basó en el descrito por Towbin *et al.* en 1979 (153):

- Lavado de la membrana con TBS-T: se sustituyó la solución de bloqueo (BSA) por TBS-T.
- Incubación con el anticuerpo primario: se sustituyó el TBS-T en el que se encontraban las membranas, por TBS-T con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave.

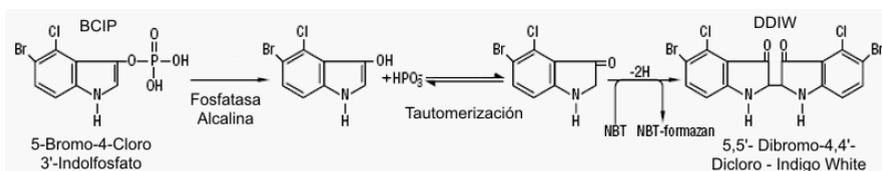
**Tabla 3.** Descripción anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección (Western blot).

Proteína	Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial
IRE1	monoclonal	ratón	1/400	Abcam
p-IRE1	monoclonal	conejo	1/200	Millipore Corporation
GRP78	policlonal	conejo	1/600	Abcam
XBP1	monoclonal	ratón	1/400	Abcam
ATF6	policlonal	conejo	1/1.000	Abcam
ATF4	monoclonal	ratón	1/400	Abcam
p-eIF2 $\alpha$	monoclonal	conejo	1/250	Millipore Corporation
Reticulón 1	policlonal	conejo	1/500	Abcam
RRBP1	policlonal	conejo	1/250	Abcam
Kinectina	policlonal	conejo	1/500	Abcam
CKAP4	policlonal	conejo	1/1.000	Abcam
Nogo A+B	policlonal	conejo	1/250	Abcam
SCN2B	policlonal	conejo	1/200	Abcam
KCNJ5	policlonal	conejo	1/500	Abcam
CACNG8	policlonal	conejo	1/1.000	Abcam
Kir2.1 (KCNJ2)	monoclonal	conejo	1/1.000	Abcam
KCNN3	policlonal	conejo	1/500	Abcam
TRPM7	monoclonal	conejo	1/1.500	Abcam
GAPDH	monoclonal	ratón	1/1.000	Abcam

- Lavados: 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación.
- Incubación con el anticuerpo secundario: se utilizaron los correspondientes anticuerpos secundarios todos ellos conjugados con fosfatasa alcalina, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave.
  - Anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (*Sigma-Aldrich*).
  - Anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (*Sigma-Aldrich*).
- Lavados: 3 lavados de 5 minutos con TBS-T y 3 lavados de 5 minutos con TBS, en agitación.
- Revelado del antígeno-anticuerpo: se incubó la membrana con solución de revelado *BCIP/NBT* (*SigmaFast™BCIP®/NBT Tablet, Sigma-Aldrich*) preparada en el momento de uso y en oscuridad (1 pastilla + 10 ml de agua bidestilada). La reacción se llevó a en total oscuridad durante 1 hora máximo.

El cloruro de *nitroblue tetrazolium* (NBT) es un compuesto formado por la unión de dos grupos tetrazol con un alto poder oxidante. Se utiliza comúnmente en inmunología para la detección de la actividad fosfatasa alcalina, la cual se usa como marcador conjugado a un anticuerpo. El 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (BCIP) es un sustrato cromogénico artificial utilizado para la detección colorimétrica sensible a la actividad fosfatasa alcalina, esta enzima hidroliza BCIP a 5-bromo-4-cloro-3-indolil y fosfato inorgánico (154). El bromo-cloro-indol, separado del grupo

fosfato, sufre tautomerización y luego es oxidado por el NBT dando lugar a un compuesto insoluble de color violeta intenso (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo White) (Figura 4).



**Figura 4.** Reacción NBT/BCIP. (Extraída de <http://lookfordiagnosis.com>).

- Parada de la reacción colorimétrica: una vez aparecieron las bandas se paró la reacción colorimétrica con agua bidestilada y a continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua bidestilada antes de dejar secar la membrana en papel de filtro durante al menos 24 horas.
- Análisis cuantitativo de las membranas: una vez seca, la membrana se digitalizó utilizando una estación de análisis de imagen para aplicaciones colorimétricas y fluorescencia (*DNR Bio-Imaging Systems*), equipado con un software de cuantificación de geles y membranas (*GelQuant Pro v12.2*). Los valores obtenidos se relativizaron a GAPDH y finalmente al grupo CNT.

### 3.4. INMUNOFLUORESCENCIA

#### 3.4.1. Inclusión en parafina

Los fragmentos de 45 mm<sup>2</sup> obtenidos tras la recogida de la muestra, se pusieron en tampón de fijación (4% paraformaldehído) y después de 24 horas se pasaron a etanol 70°. Posteriormente, previo a la inclusión en parafina, se lavaron 3 veces con tampón cacodilato durante 10 minutos.

Seguidamente, los fragmentos de tejido se deshidrataron incubándolos en una serie de alcoholes de gradación creciente (30°, 50°, 70°, 80° y 96°) durante 15 minutos y 3 pases de 30, 40 y 10 minutos en alcohol de 100°. La parafina no es miscible con el alcohol por lo que este se sustituyó por xilol en 2 pases de 10 minutos cada uno. Este paso se le conoce como aclaramiento y consiste en embeber la pieza en una sustancia miscible con la parafina, en nuestro caso xilol. A continuación se incubó la muestra en parafina a 60°C durante una hora, tras la cual se cambió por parafina nueva y se dejó en estufa durante toda la noche. La parafina penetra en el tejido haciendo más fácil la obtención de cortes por el micrótopo (*Microm HM 340E, Thermo Fisher Scientific*). Al día siguiente se confeccionó el bloque colocando la pieza de tejido en un molde rectangular que contenía parafina fundida y se dejó enfriar para que solidificase.

#### 3.4.2. Corte y desparafinación

En primer lugar, se enfriaron la cuchilla y el bloque de parafina solidificado que contenía la muestra. El bloque se colocó en el micrótopo (*Microm HM 340E, Thermo Fisher Scientific*) y se cortaron secciones de 5 µm. Los cortes se recogieron con un pincel y se depositaron en una baño de agua bidestilada a 37°C para estirarlos y evitar pliegues en la muestra. A

continuación, se recogieron los cortes con portaobjetos, de modo que quedaran adheridos en la posición deseada, y se dejaron en estufa (*Estufa de cultivos digital IDL.CI 36, LABOLAN*) a 40°C durante 40 minutos.

Dado que la parafina es una sustancia anhidra, las muestras fueron desparafinadas e hidratadas antes de la inmunodetección. Para ello se realizaron dos baños con xilol durante 10 minutos, el primero a 37°C y el segundo a temperatura ambiente. Después se realizó un baño de xilol-etanol 100° (proporción 1:1) durante 10 minutos previo a la hidratación a través de baños en alcohol en orden decreciente (100°, 96°, 80°, 70°) de 10 minutos cada uno. Por último, los cortes se bañaron en agua bidestilada durante 1 minuto.

#### 3.4.3. Inmunodetección

La inmunodetección se realizó de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Azorín *et al.* (155). En primer lugar, las muestras se fijaron con metanol puro durante 4 minutos a -20°C o con 4% paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a 4°C, dependiendo del anticuerpo que se fuera a utilizar. Tras la fijación se hicieron tres lavados con PBS durante 10 minutos.

Para el bloqueo, las muestras se incubaron en PBS con 1% de BSA durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios correspondientes (descritos en el Apartado anterior de Western blot) se prepararon en este mismo tampón y con ellos se incubaron los cortes durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de realizar 3 lavados de 10 minutos con PBS con 1% de BSA, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con Alexa, 1 hora a temperatura ambiente. A una dilución 1/50 en PBS con 1% de BSA.

- Alexa Fluor®488 IgG anti-ratón producido en pollo (*Invitrogen*)
- Alexa Fluor®488 IgG anti-conejo producido en pollo (*Invitrogen*)

A continuación se lavaron una vez con PBS con 1% de BSA y dos veces con PBS durante 10 minutos. Finalmente se secaron completamente y se montaron en *Vectashield*® con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para la identificación de núcleos (*Vector Laboratories*).

Los cortes se examinaron con un microscopio de fluorescencia *Olympus BX50* y las imágenes se procesaron con el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>. Versión 1.46r, *National Institutes of Health*).

### 3.5. MICROARRAYS DE ADN

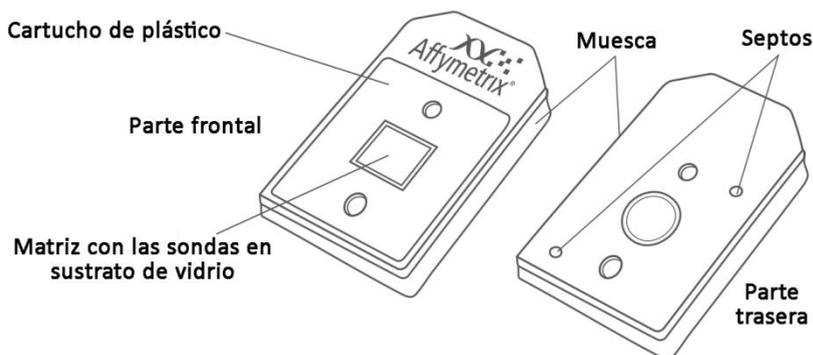
Los microarrays de ADN, también denominados chips de ADN, son una técnica utilizada para analizar la expresión génica diferencial, pudiendo monitorizarse los niveles de miles de genes simultáneamente. Se basa en la capacidad de hibridación entre moléculas de ADN complementarias entre sí mediante puentes de hidrógeno. Cuanto menos complementarias sean las secuencias entre sí, éstas se van a unir con una menor afinidad, por lo que tras el lavado sólo permanecen unidas aquellas que son lo más complementarias entre sí; las secuencias parcialmente complementarias se eliminan. La intensidad de señal de una sonda determinada depende de la cantidad de secuencias complementarias presentes en la muestra, que hibridan con la sonda. De esta manera se puede cuantificar de una forma relativa la cantidad de un determinado gen que se expresa en una célula ó en un tejido en función de la intensidad de señal. Al conocerse la situación concreta de cada sonda en un microarray y de qué gen se trata, se puede comparar la expresión de ese gen en diferentes condiciones.

El chip está formado por una superficie que puede ser de cristal, sílice o plástico, la cual posee unas celdas de unos 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, en donde se depositan miles de copias de una secuencia nucleotídica, conteniendo cada celda una secuencia diferente y estando éstas perfectamente ordenadas sobre la superficie.

Los microarrays de Affymetrix son los chips de ADN más ampliamente utilizados. Su construcción se produce por síntesis de oligonucleótidos de una longitud de 25 nucleótidos *in situ* sobre una placa de vidrio; de tal manera que se sintetizan millones de sondas en un espacio de 1,63  $\text{cm}^2$ . En la síntesis de los oligos se emplea una fotomáscara, que es similar a la

utilizada en la construcción de chips semiconductores, que va sintetizando químicamente los oligos, colocando los nucleótidos uno a uno en su posición determinada.

En este trabajo, la expresión génica de todo el genoma se determinó utilizando los arrays *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* de *Affymetrix* (Figura 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, después de la extracción y precipitación de ARN total, se realizó la retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) y se procedió a la fragmentación y marcaje mediante el uso del kit *GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization* que es específico para su uso en microarrays *GeneChip ST*. Este kit está diseñado para generar dianas de ADN que son cadenas con sentido amplificadas y biotinizadas. Las sondas han sido seleccionadas para distribuirse a lo largo de la longitud de cada transcrito.



**Figura 5.** Partes de un microarray de Affymetrix *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array*. (Modificada de *GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization User Manual for use with the Ambion® WT Expression Kit*).

### 3.5.1. Extracción de ARN total

La extracción de ARN para ser utilizado en la técnica de microarrays y en las posteriores validaciones por RT-qPCR se realizó con el kit de

extracción *RNeasy® Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se pesó una fracción de aproximadamente 30 mg de cada muestra de VI, previamente almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se introdujeron en tubos *Lysing Matrix D* que contenían 300  $\mu\text{l}$  de tampón RLT (contiene isotiocianato de guanidina para la lisis y para facilitar la adherencia a la membrana de sílice que se usa posteriormente) y 3  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (para desnaturalizar ribonucleasas), ambos fríos. Para homogenizar el tejido, se utilizó el programa MP:24x2 del sistema *FastPrep-24*, 8 ciclos de 30 segundos a 6,5 m/s. Después se centrifugaron 1 minuto a 13.000 rpm (*centrífuga Eppendorf modelo 5415 R*) para eliminar la espuma, se añadieron 590  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasas (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen*) y 10  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (para la digestión de proteínas presentes en la muestra) y se incubaron a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Tras centrifugar 3 minutos a 10.000 g se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió la mitad del volumen recuperado de etanol 96° (aproximadamente 400  $\mu\text{l}$ ), mezclando por inversión. A continuación, se pasó todo el volumen por tubos *mini column* (pasando cada vez volúmenes de 700  $\mu\text{l}$ ) que contienen una membrana de sílice donde queda adherido el ARN. La columna se lavó con 350  $\mu\text{l}$  de tampón RW1 (contiene sal de guanidina y etanol para realizar lavados) y las trazas de ADN se eliminaron con un tratamiento de DNasa disuelto en tampón RDD (que facilita la digestión de ADN por las DNAsas y asegura que el ARN permanezca en la columna). Se volvió a lavar una vez con 350  $\mu\text{l}$  de tampón RW1 y dos veces con tampón RPE (elimina trazas de sales), de esta forma se eliminaron los restos de

DNasa y cualquier contaminante que pudiera haber. Finalmente el ARN se eluyó con 35 µl de agua libre de RNasas.

Para analizar la concentración y pureza del ARN extraído, se utilizó el espectrofotómetro *Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)* y se evaluó la calidad mediante una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*). Todas las muestras de ARN alcanzaron un mínimo *RNA Integrity Number (RIN) ≥7,0*. Después de comprobar la calidad de todas las muestras, se congelaron a -80°C para su posterior uso.

### 3.5.2. Tratamiento con DNasa y precipitación de ARN total

El ARN total se trató nuevamente con DNasas para eliminar cualquier traza de ADN persistente. Para ello se incubó 1 µg de ARN total de todas las muestras con DNasa (*Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, Sigma-Aldrich*) a temperatura ambiente durante 10 minutos y, posteriormente, se realizaron 3 extracciones consecutivas: dos con fenol-cloroformo (*Phenol:Chloroform 5:1, Sigma-Aldrich*) y una final con cloroformo isoamílico (*Chloroform - isoamyl alcohol mixture, FLUKA, Sigma-Aldrich*). A continuación, se precipitó el ARN con etanol 100° y glicógeno (*Glycogen from Mytilus edulis, Sigma-Aldrich*) y se almacenó a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente se procedió a la resuspensión de las muestras. Para ello, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 45 minutos a 4°C. A continuación se lavó el pellet con etanol 70° y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en hielo en 10 µl de agua libre de RNasas durante al menos 1 hora y se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

### 3.5.3. Retrotranscripción a ADNc para su uso en microarrays de ADN

La retrotranscripción o transcripción reversa es una técnica que permite obtener ADNc a partir de moléculas de ARN, que son utilizadas como molde por la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN.

La síntesis de ADNc para ser utilizado en la técnica de microarrays se realizó mediante el kit *WT Expression Kit (Ambion, Life Technologies)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Permite procesar muestras de ARN para usarse en el análisis global del transcriptoma realizado por medio de microarrays de Affymetrix. El kit genera cadenas de ADNc con sentido a partir de ARN total para su fragmentación y marcaje utilizando *GeneChip® WT Terminal Labeling Kit* de Affymetrix. Este producto está optimizado para su uso en los chips *Affymetrix GeneChip® Sense Target (ST) Arrays*. El *WT Expression Kit* establece un protocolo de transcripción reversa que utiliza cebadores que se unen específicamente a ARN no ribosómico, incluyendo tanto ARNm poli (A) como no poli (A).

El protocolo se inició con la síntesis de la primera y segunda cadena de ADNc. A partir de ellas se generó por transcripción *in vitro* ARNc y se purificó y determinó su tamaño y distribución. Seguidamente se realizó un segundo ciclo de síntesis de ADNc, el molde de ARNc se hidrolizó mediante la RNasa H y se purificó el ADNc. Por último, se cuantificó su tamaño y distribución y se almacenó a -20°C hasta su posterior fragmentación y marcaje (Figura 6).

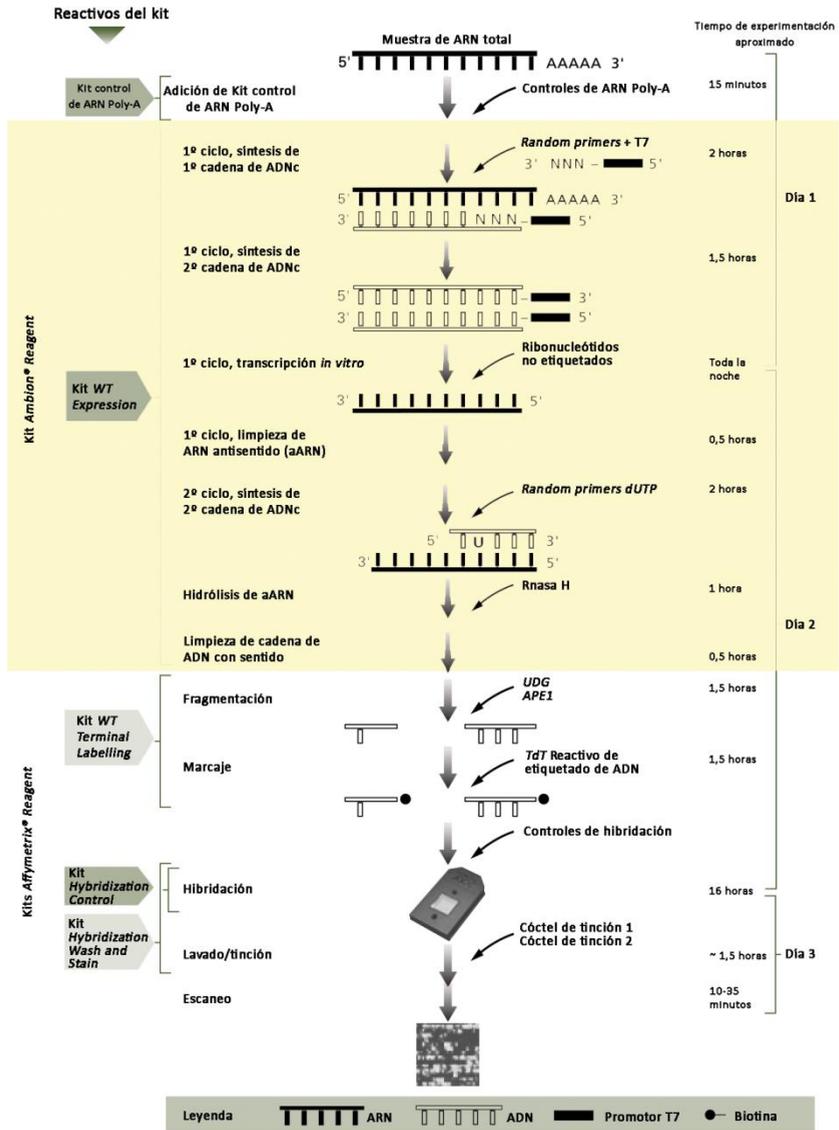
#### 3.5.4. Fragmentación y marcaje de ADNc

Para la fragmentación y marcaje del ADNc obtenido, debido a que éste contenía dUTP, este kit utilizó la uracil ADN glicosilasa y la endonucleasa apurínica/apirimidínica 1 para reconocer y fragmentar el ADNc en residuos de dUTP. El ADN después se unió por la transferasa terminal utilizando el reactivo proporcionado por el kit que se encuentra covalentemente unido a biotina (Figura 6).

#### 3.5.5. Hibridación en microarrays de Affymetrix

La hibridación se llevó a cabo mediante el kit *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit*. En primer lugar, se preparó el cóctel de hibridación y se agitó a máxima velocidad (25.000 g), posteriormente se calentó a 99°C durante 5 minutos. Después se enfrió a 45°C durante otros 5 minutos y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto.

Por otro lado, antes del uso del *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* se equilibró a temperatura ambiente. A continuación, se inyectó la cantidad apropiada de cada volumen de muestra en el microarray a través de uno de los septos. Por último, se colocó el microarray en el horno de hibridación *GeneChip® Hybridization Oven 640* a 45°C en agitación a 60 rpm durante 17 horas  $\pm$  1 hora, se realizaron lavados en la plataforma *GeneChip® Fluidics Station* y por último se llevó a cabo el escaneo utilizando *Gene Chip Scanner 7G System* (Figura 6).



**Figura 6.** Protocolo de síntesis y procesado de ADNC para su uso en microarrays de Affymetrix. (Modificada de GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization User Manual for use with the Ambion® WT Expression Kit).

### 3.5.6. Análisis computacional de los resultados

Para el procesamiento inicial de la imagen se utilizó el software *GeneChip® Command Console* (AGCC). El software *Affymetrix Expression Console™* proporcionó un control de calidad del proceso y realizó una normalización por el conjunto de sondas para conseguir datos de señal que expresaran los distintos niveles génicos (*Affymetrix*). El software *Partek® Genomics Suite™* (Partek Inc.) se utilizó para la corrección del fondo, normalización por sondas y comparación estadística (ANOVA) de los perfiles de expresión entre el grupo patológico y el grupo CNT usando el algoritmo de RMA. Los genes se consideraron significativamente diferentes con una  $p < 0,01$  y con un *fold change*  $\geq 1,3$ . Todos los resultados cuantitativos están disponibles en la base de datos del NIH *Gene Expression Omnibus* (GEO) con el número de acceso GEO #GSE42955 (156).

### 3.6. TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN DE ARN

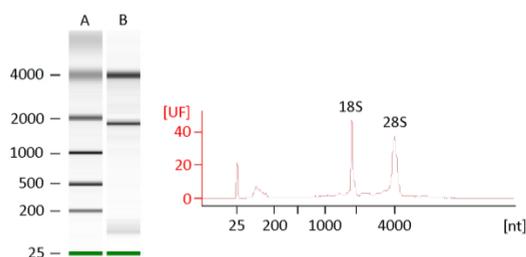
RNA-seq es una técnica de próxima generación (NGS) que permite reproducir la presencia y la cantidad de ARN de un genoma determinado en un momento concreto; incluyendo ARNm, ARNt, ARNr y otros ARN no codificantes. La evolución de NGS permite una mayor cobertura de bases de la secuencia de ADN, así como mayor rendimiento, proporcionando de decenas a cientos de millones de lecturas de secuencia e información sobre miles de millones de bases individuales. Al estudiarse únicamente las bases que se están transcribiendo, se proporciona una forma eficiente de medir simultáneamente los niveles de expresión génica, identificar eventos de *splicing* alternativo y de fusión génica, e identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Además, también permite la secuenciación de muestras de ARN de *novo*, sin requerimiento previo de un genoma de referencia (157).

Previo a la secuenciación, es necesaria la preparación de una librería del transcriptoma completo, donde la obtención de muestras de ARNm de alta calidad es la parte más crítica. La abundancia de algunos tipos de ARN, como el ARNr (abarca hasta un 80% del total), puede reducir la cobertura de secuencia, disminuyendo así la detección de especies de ARN menos abundantes. Por ello, para eliminar la abundancia de ARNr se usan kits comerciales específicos para captura de poli(A) (como se describe en el Apartado siguiente) u otros métodos de hibridación o degradación enzimática que enriquecen la muestra en ARNm.

### 3.6.1. Extracción de ARN poli(A)

Se obtuvieron muestras de ARN poli(A) para generar librerías del transcriptoma completo para ser utilizadas en la secuenciación mediante la plataforma *SOLiD 5500XL (Life Technologies)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La homogenización del tejido se llevó a cabo con el ensayo comercial *Tri<sup>®</sup> Reagent (Sigma-Aldrich)*. Se cortó una fracción de aproximadamente 25 mg de las muestras de VI, previamente almacenadas a -80°C, y se homogenizó en presencia del tampón *TRIzol<sup>®</sup>*, que contiene isotiocianato de guanidina y fenol, mediante el homogenizador *TissueLyser LT (Qiagen)* con bolas de carburo de tungsteno de 3 mm.

Las extracciones de ARN se realizaron con el kit *PureLink<sup>™</sup> RNA (Ambion by Life Technologies)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Inicialmente, se añadió el mismo volumen de etanol 70°, mezclando por inversión, y se pasó todo el volumen por tubos *spin Cartridge* que contienen una membrana de sílice a la cual se adhiere el ARN. La columna se lavó con 700 µl de tampón de lavado I y dos veces con 500 µl de tampón de lavado II para eliminar cualquier impureza. Finalmente, el ARN se eluyó con 35 µl de agua libre de RNasas y se evaluó su concentración mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)* y la integridad de las muestras se evaluó mediante una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*) con el kit *RNA 6000 Nano LabChip<sup>®</sup>*. Todas las muestras presentaron una proporción 260/280 mayor de 2,0 y alcanzaron un RIN  $\geq 9$  (Figura 7). Finalmente, el ARN extraído y cuantificado se conservó a -80°C.



**Figura 7.** Calidad del ARN de una muestra con un RIN de 9,1. El ejemplo muestra el gel del ARN (izquierda) con el marcador (A) y la muestra (B); y el electroferograma correspondiente (derecha), donde se observan los picos de las subunidades ribosómicas 18S y 28S. UF, unidades de fluorescencia; nt, nucleótidos.

El ARN poli(A) se aisló partiendo de 25  $\mu\text{g}$  de ARN extraído previamente, mediante el kit *MicroPoly(A) Purist™* (Ambion by Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se unió cada muestra de ARN a una celulosa de oligo(dT). Para ello se transfirió la muestra de ARN a un tubo que contenía la celulosa de oligo(dT) y se mezcló por inversión para resuspender completamente la resina. A continuación, se calentó la mezcla durante 5 minutos a 65°C, para desnaturalizar la estructura secundaria y maximizar la hibridación entre las secuencias poli(A) del ARN y las secuencias poli(T) de la resina. Esta unión se facilitó con la incubación en balanceo constante a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se precipitó la resina y se lavó para eliminar la muestra no unida específicamente y el ARNr.

Finalmente, se recuperó el ARN poli(A) con la solución de almacenamiento previamente calentada a 70°C. Este ARN se precipitó con acetato de amonio 5 M, glicógeno y etanol 100%; se lavó con etanol y se resuspendió en solución de almacenamiento. El ARN poli(A) se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

### 3.6.2. Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN

#### 3.6.2.1. Fragmentación del ARN poli(A) mediante la RNasa III

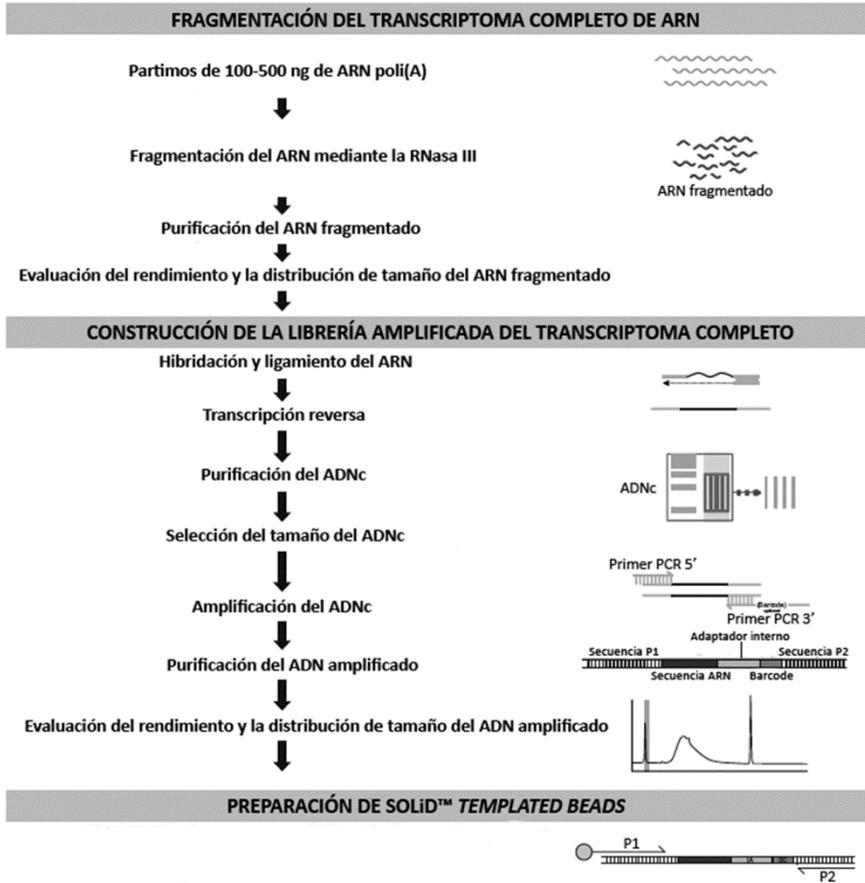
Para la construcción de la librería de ADNc con tamaños de inserción adecuados para la secuenciación en el equipo *SOLiD™*, es necesario la fragmentación del ARN poli(A) antes de proceder a la ligación.

Para ello se preparó, a 4°C, una reacción para cada muestra de ARN poli(A) (100-500 ng) con 1 µl de tampón *RNase III* 10X, 1 µl de *RNase III* y agua libre de nucleasas hasta completar los 10 µl. Esta reacción se incubó en un termociclador a 37°C durante 10 minutos. Inmediatamente después de la incubación, se añadieron 90 µl de agua libre de nucleasas. La digestión con *RNase III* deja grupos 5' fosfato y 3' hidroxilo en los fragmentos de ARN resultantes que pueden usarse directamente en las reacciones de hibridación y de ligación. Esta fragmentación proporciona comodidad y robustez para el análisis integral del transcriptoma utilizando el sistema *SOLiD™* (Figura 8).

#### 3.6.2.2. Purificación del ARN fragmentado

El ARN fragmentado se introdujo a 4°C y, seguidamente o antes de una hora, se purificó usando el *RiboMinus™ Concentration Module* (*Invitrogen*). Este producto enriquece todo el espectro de transcritos de ARN por eliminación de ARNr, llegando a eliminar hasta el 95-98% de las moléculas de ARNr humano.

Para purificar el ARN se añadieron 100 µl de tampón *Binding* y 250 µl de etanol 100°. A continuación la muestra se cargó en una columna de centrifugación y se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto. El ARN se une a la membrana de sílice presente en esta columna y las impurezas son lavadas exhaustivamente mediante tampón de lavado.



**Figura 8.** Esquema de la fragmentación y construcción de librería amplificada del transcriptoma completo. (Modificada de Applied Biosystems).

Se añadieron 500  $\mu$ l de tampón de lavado con etanol 100° (1:4), previamente preparado y almacenado a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12.000 g durante un minuto. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad (25.000 g) para eliminar cualquier residuo de tampón de lavado. Por último, se eluyó el ARN con agua libre de RNasas. Para ello se colocó la columna en un tubo de recuperación y se añadieron 12  $\mu$ l de agua libre de RNasas. La columna y el tubo se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto y se recuperó el ARN (Figura 8).

#### 3.6.2.3. Evaluación del rendimiento y la distribución de tamaño del ARN fragmentado

La evaluación del rendimiento del ARN fragmentado se llevó a cabo mediante el kit *Quant-iT™ RNA Assay* en el *Qubit® Fluorometer* (*Invitrogen*). Para evaluar la distribución de tamaño del ARN fragmentado se diluyó 1  $\mu$ l de la muestra (1:10) con agua libre de nucleasas y se analizó en el bioanalizador *Agilent 2100* con el kit *RNA 6000 Pico Chip*. Se utilizó el software *2100 expert* para examinar la distribución del tamaño. Se debe obtener, en 3  $\mu$ l, una concentración  $\geq 50$  ng de ARN poli(A) y  $\geq 100$  ng de ARN total empobrecido en ARNr o  $\geq 100$  ng de ARN control para poder proceder a la construcción de la librería, en el caso contrario la muestra se debe concentrar en una centrifuga de vacío (Figura 8).

### 3.6.3. Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo

#### 3.6.3.1. Hibridación y ligamiento del ARN

El primer paso para la construcción de la librería es la hibridación y el ligamiento del ARN. Se transfirieron 5  $\mu$ l de tampón de hibridación (2  $\mu$ l de *SOLiD™ Adaptor Mix* y 3  $\mu$ l de solución de hibridación) a 3  $\mu$ l de cada muestra de ARN fragmentado y se incubaron en un termociclador a 65°C durante 10 minutos y a 16°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron los reactivos de ligación de ARN (10  $\mu$ l de tampón de ligamiento 2X y 2  $\mu$ l de mezcla de enzima de ligamiento) y se incubó en un termociclador a 16°C durante 16 horas (Figura 8).

#### 3.6.3.2. Transcripción reversa

Para llevar a cabo la transcripción reversa se preparó la mezcla de todas las reacciones con 11  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 4  $\mu$ l de tampón RT 10X, 2  $\mu$ l de *dNTP Mix* y 2  $\mu$ l de *SOLiD™ RT Primer* para cada reacción. La reacción se incubó en un termociclador a 70°C durante 5 minutos y luego se enfrió en hielo. A continuación, se añadió 1  $\mu$ l de la transcriptasa reversa *ArrayScript™* a cada muestra y se incubó en un termociclador a 42°C durante 30 minutos (Figura 8).

#### 3.6.3.3. Purificación del ADNc

El ADNc obtenido se purificó mediante el kit *MinElute® PCR Purification (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfirió todo el ADNc a un tubo *ependorf* de 1,5 ml y se añadieron 60  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 500  $\mu$ l de tampón PB. Se cargó el ADNc en una columna *MinElute* y se centrifugó a 13.000 g durante 1

minuto. Después el ADNc se lavó con 750  $\mu\text{l}$  de tampón PE y se eluyó con 10  $\mu\text{l}$  de tampón EB (Figura 8).

#### 6.3.3.4. Selección del tamaño del ADNc

Para seleccionar el tamaño del ADNc se realizó una electroforesis con el sistema *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis (Invitrogen)*. En primer lugar, se mezclaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra de ADNc y 5  $\mu\text{l}$  de *50 pb DNA ladder*, previamente diluido a 40 ng/ $\mu\text{l}$ , con 5  $\mu\text{l}$  de *2X Novex TBE-Urea Sample Buffer*, y se calentaron en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*) a 95°C durante 3 minutos. Los geles *Novex® 6% TBE-Urea* se introdujeron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) que contenía tampón de electroforesis TBE 1X (*5X Novex® TBE Running Buffer, Invitrogen*), y a continuación se cargaron los 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra en los pocillos correspondientes del gel. Se utilizaron condiciones de voltaje constantes de 180 V durante 25 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se tiñó el gel durante 5-10 minutos con *SYBR® Gold* y se cortó la región que contenía el ADNc de 150-250 nucleótidos, fragmentándolo verticalmente en 4 piezas de 1 mm X 6 mm aproximadamente. *SYBR® Gold* es una tinción muy sensible para la detección de ADN o ARN de doble o simple cadena en geles electroforéticos, utilizando un transiluminador ultravioleta estándar (Figura 8).

### 3.6.3.5. Amplificación del ADNc

Antes de la amplificación del ADNc se preparó una mezcla para cada pieza de gel que contenía 10  $\mu$ l de tampón de PCR 10X, 8  $\mu$ l de *dNTP Mix*, 2  $\mu$ l de *SOLiD™ 5' PCR Primer*, 1,2  $\mu$ l de ADN polimerasa *AmpliTaq®* y 76,8  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Una vez transferida la mezcla a tubos de 0,2 ml con cada pieza de gel, se añadieron 2  $\mu$ l de *SOLiD™ 3' PCR Primer* (Figura 8). Se llevó a cabo la reacción de PCR en un termociclador según el programa siguiente (Tabla 4):

**Tabla 4.** Programa de amplificación de ADNc.

Etapa		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	5 minutos
15 ciclos	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	Hibridación	62°C	30 segundos
	Extensión	72°C	30 segundos
Extensión final		72°C	7 minutos

### 3.6.3.6. Purificación del ADN amplificado

Se añadieron 800  $\mu$ l de tampón de unión a cada tubo y se procedió a la purificación del ADN amplificado con el *PureLink™ PCR Micro kit (Invitrogen)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se cargó cada muestra en las columnas del kit y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto. A continuación se lavó el ADN con 600  $\mu$ l de tampón de lavado y, finalmente, se eluyó dos veces con 10  $\mu$ l de tampón de elución (Figura 8).

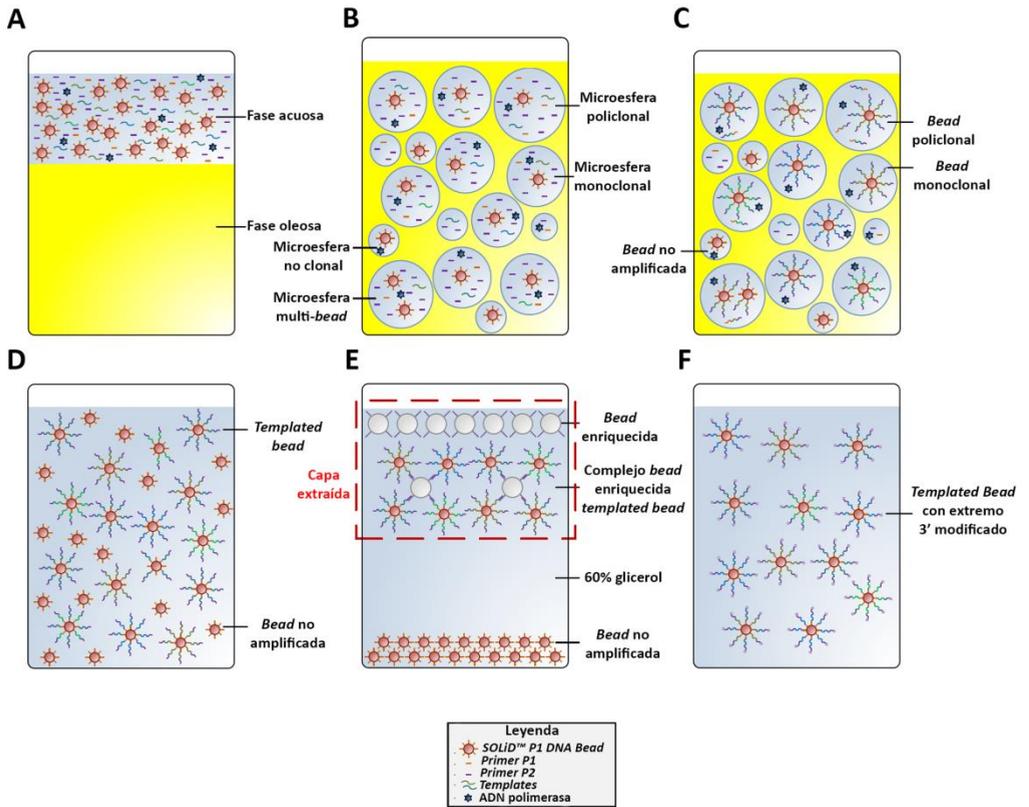
### 3.6.3.7. Evaluación del rendimiento y la distribución de tamaño del ADN amplificado

La concentración de ADN purificado se evaluó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*. En los casos necesarios se diluyó el ADN a  $<50$  ng/ $\mu$ l mediante el kit *DNA 1000 (Agilent)* para una cuantificación precisa. Se usó una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*) con el kit *DNA 1000 (Agilent)*, y, mediante el software *2100 expert*, se evaluó el rendimiento y la distribución de tamaño: se calculó el porcentaje de ADN de 25-200 pares de bases y se determinó el tamaño medio y la concentración molar de la librería de ADNc (Figura 8).

### 3.6.4. Preparación de *Templated Beads*

#### 3.6.4.1. Preparación de la reacción de PCR de emulsión

La PCR de emulsión (ePCR) se utiliza para generar muchas copias de la librería de ADNc y, por tanto, aumentar la sensibilidad de la secuenciación, ya que los métodos de secuenciación de una sola molécula no son lo suficientemente sensibles. Se trata de una amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADN en *SOLiD™ P1 DNA Beads* usando un método de emulsión. Las emulsiones se componen de una fase oleosa que contiene emulsionantes y una fase acuosa que contiene los componentes de la PCR (*template*, cebadores, ADN polimerasa y *SOLiD™ P1 DNA Beads*). La PCR recubre la microesfera con copias clonales (30.000 copias o más) de las moléculas aisladas de ADN y se inmovilizan para después secuenciarlas (Figura 9).



**Figura 9.** Amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADN en *SOLiD™ P1 DNA Beads* usando un método de emulsión. **A**, fase acuosa y fase oleosa previa a la emulsión. **B**, emulsión previa a la amplificación. **C**, emulsión después de la amplificación. **D**, *templated beads* y *beads* no amplificadas después de la rotura de la emulsión y el lavado de las *beads*. **E**, *beads* enriquecidas y *SOLiD™ P1 DNA beads* después de la centrifugación con 60% de glicerol. **F**, *templated beads* después de la modificación del extremo 3'. (Modificada de Applied Biosystems).

Para la ePCR se utilizó el kit *SOLiD™ ePCR (Life Technologies)*. En primer lugar se prepararon:

- **Fase oleosa:** se mezclaron 1,8 ml de estabilizador 1, 400 µl de estabilizador 2 y 37,8 ml de aceite de emulsión. Se agitó y se dejó que la mezcla se desgasificara durante al menos 20 minutos. (Figura 9A).

- Fase acuosa (para una concentración de la librería de 1.0 pM): se mezclaron 280 µl de tampón de PCR 10X, 392 µl de mezcla de dNTPs, 70 µl de cloruro de magnesio 1 M, 11,2 µl del cebador 1, 16,8 µl del cebador 2, 5,6 µl de *Template* 500 pM, 1.644,4 µl de agua libre de nucleasas y 300 µl de la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold*® 5 U/µl. (Figura 9A).
- SOLiD™ P1 DNA Beads: se agitó un tubo de *beads* enérgicamente, tras dejarlo reposar se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de solución de bloqueo. Las *beads* se sonicaron, se agitaron y se dejaron reposar para eliminar el sobrenadante y volver a resuspender en tampón TEX 1X.

A continuación, se creó la emulsión con un *ULTRA-TURRAX*® *Tube Drive* (IKA®) (Figura 9B), se repartieron 150 µl de esta emulsión en cada pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos y ésta se selló con una película adhesiva transparente. La reacción de ePCR se llevó a cabo en el sistema *GeneAmp*® *PCR 9700* con las siguientes condiciones (Tabla 5):

**Tabla 5.** Programa de amplificación de ePCR

Etapa		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	5 minutos
40 ciclos	Desnaturalización	93°C	15 segundos
	Hibridación	62°C	30 segundos
	Extensión	72°C	75 segundos
Extensión final		72°C	7 minutos
-		4°C	-

#### 3.6.4.2. Rotura de la emulsión y lavado de las *beads*

Cuando la ePCR está completa (Figura 9C), la emulsión se rompe con 2-butanol y las *templated beads* y las *beads* no amplificadas se lavan para eliminar el 2-butanol residual, la fase oleosa y la fase acuosa que contiene los reactivos de la PCR (Figura 9D). Para ello se recogió la emulsión en una bandeja de recogida (*SOLiD™ Emulsion Collection Tray*) y se añadieron 12 ml de 2-butanol pipeteando hasta su completa homogenización. A continuación, se transfirió la emulsión a un nuevo tubo de 50 ml y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. La fase 2-butanol-aceite se decantó y el tubo se dejó boca abajo 5 minutos sobre papel absorbente.

Para lavar las *beads* se añadieron 600 µl de tampón de lavado, después de 2 minutos se resuspendieron con una pipeta y se transfirieron a un tubo *LoBind* de 1,5 ml. A continuación, se agitó el tubo y se centrifugó a 21.000 g durante 1 minuto, se eliminaron la fase superior de aceite y el sobrenadante. Se realizó otro lavado con 300 µl de tampón de lavado y, por último, las *beads* se resuspendieron en 200 µl de tampón TEX 1X.

Finalmente, las *beads* se sonicaron y se cuantificó una dilución 1:10 con el *SOLiD™ Bead Concentration Chart* y el espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)*.

#### 3.6.4.3. Enriquecimiento de las *templated beads*

Es necesario un enriquecimiento para aislar las *templated beads* de las *beads* no amplificadas o mal amplificadas (Figura 9E). En una primera etapa se usan *beads* de poliestireno con un adaptador P2 de

cadena simple para capturar las *templated beads*. Se enriquecen las *beads* tanto monoclonales como policlonales, el proceso está diseñado para enriquecer las *templated beads* derivadas de una reacción ePCR produciendo desde 150 hasta 300 millones de *templated beads*.

En primer lugar, se eliminó el sobrenadante de las *beads* enriquecidas centrifugando a 21.000 g durante 2 minutos. Las *beads* se lavaron dos veces con 900 µl de tampón de unión y lavado. Seguidamente se resuspendieron con 350 µl de tampón de unión y lavado, se añadieron 3,5 µl de oligo de enriquecimiento 1 mM y se mantuvo el tubo en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las *beads* con 900 µl de tampón TEX 1X dos veces y se resuspendieron en 150 µl de tampón de unión 1X bajo en sal.

Las *templated beads* se lavaron con 300 µl de tampón desnaturalizante tres veces y con 300 µl de tampón TEX 1X tres veces más. Finalmente se resuspendieron en 150 µl de tampón TEX 1X y se transfirieron a un tubo *LoBind* para sonicarlas.

Se transfirieron las *beads* enriquecidas al tubo de las *templated beads* y se sonicaron. A continuación, la mezcla de *beads* se incubó a 61°C durante 15 minutos e inmediatamente después, se dejaron en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 600 µl de glicerol 60% recién preparado y se centrifugó a 21.000 g durante 3 minutos. El resultado es una capa superior formada por *beads* enriquecidas (con o sin *templated beads* unidas) y una capa inferior de *beads* no amplificadas (Figura 9E). La capa superior se recogió y se transfirió a un tubo *LoBind* que contenía 1 ml de tampón TEX 1X. Este tubo se agitó y se centrifugó a

21.000 g durante un minuto. Las *beads* se sedimentaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 400 µl de tampón TEX 1X.

Para aislar las *beads* P2 enriquecidas se centrifugaron a 21.000 g durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Después se lavaron dos veces con 400 µl de tampón desnaturizante y con 400 µl de tampón TEX 1X dos veces más. Las *beads* se resuspendieron con 200 µl de tampón TEX 1X y se sonicaron. Por último, se lavaron con 400 µl de tampón TEX 1X y se resuspendieron en 400 µl de este mismo tampón.

#### 3.6.4.4. Modificación de los extremos 3'

La adición de dUTP al extremo 3' de las *templated beads* P2 usando una reacción de la transferasa terminal facilita la unión covalente de las *beads* P2 enriquecidas a los portas de vidrio (Figura 9F). En primer lugar se preparó el tampón de la reacción de transferasa terminal (500 µl por reacción de ePCR) con 55 µl de tampón de transferasa terminal 10X, 55 µl de cloruro de cobalto 10X y 390 µl de agua libre de nucleasas. Las *beads* enriquecidas se lavaron dos veces con este tampón y finalmente se resuspendieron en 178 µl al que se añadieron 20 µl de solución de enlazado 1 mM para sonicarlas. A continuación se añadieron 2 µl de transferasa terminal (20 U/µl) y se mantuvo en rotación a 37°C durante 2 horas. Después, se lavaron las *beads* dos veces con 400 µl de tampón TEX 1X y se sonicaron. Por último, se cuantificaron las *beads* con el *SOLiD™ Bead Concentration Chart* y el espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)*.

### 3.6.5. Secuenciación

Las muestras se secuenciaron en la plataforma *SOLiD 5500XL*, utilizando el protocolo 50625 *paired-end* y generando secuencias de 75 nucleótidos en dirección directa y 35 nucleótidos en dirección reversa, más 5 nucleótidos del *barcode*.

La tecnología *SOLiD™* de *Applied Biosystems* utiliza un método enzimático para la secuenciación que emplea una ADN ligasa en vez de una polimerasa para identificar la secuencia. Se trata de la secuenciación por ligación. La ADN ligasa une los extremos de las moléculas de ADN, es sensible a la estructura del ADN y tiene muy baja eficiencia cuando no hay complementariedad entre las bases de dos cadenas. Por tanto, la secuenciación por ligación depende de la sensibilidad de la ADN ligasa. La molécula a secuenciar es una sola hebra de ADN desconocido flanqueado por, al menos, un extremo de secuencia conocida. En este sistema hay dieciséis combinaciones de dos nucleótidos con cuatro colorantes fluorescentes, cada colorante corresponde a un conjunto de sondas de cuatro dinucleótidos por grupo (Figura 10). El ligamiento preferente de la ADN ligasa por su secuencia específica produce una señal correspondiente a la secuencia complementaria en esa posición concreta.

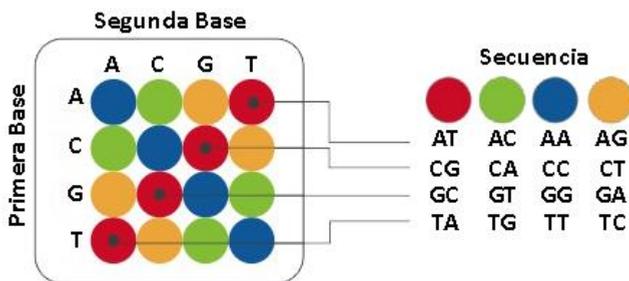


Figura 10. Codificación de dos bases. (Modificada de *Applied Biosystems*).

Después de la modificación de los extremos 3' de las *templated beads* se depositaron en portas de vidrio en disposición aleatoria (Figura 11). Los portas pueden estar segmentados en uno, cuatro u ocho secciones, de manera que se pueden cargar diferentes muestras en la misma carrera. En general los portas de uno, cuatro y ocho secciones pueden contener 165, 30 y 14 millones de *beads P2*, respectivamente.

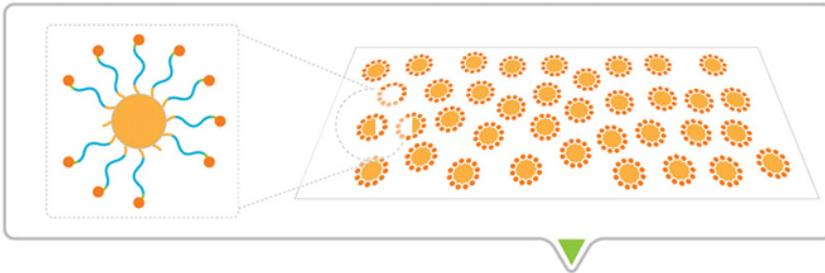


Figura 11. Depósito de *beads* en portas de vidrio. (Modificada de Applied Biosystems).

Una vez cargado el porta en la plataforma, los cebadores hibridaron con la secuencia P1 de las *templated beads* (Figura 12).

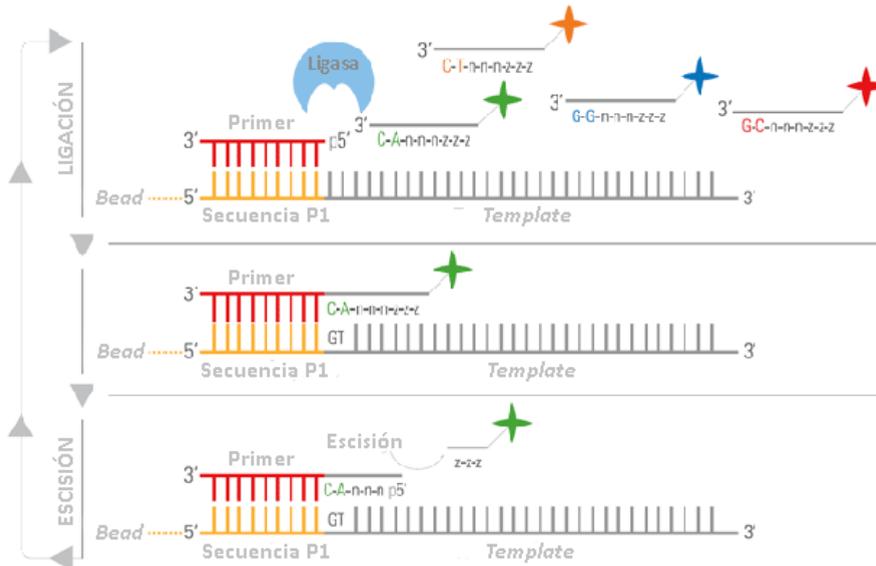


Figura 12. Secuenciación por ligación. (Modificada de Applied Biosystems).

El conjunto de sondas de dos bases marcadas con fluorescencia compiten para la ligación al cebador de la secuencia. La especificidad de la sonda se logra interrogando a todas las primera y segunda bases de cada reacción de ligación. Se realizan múltiples ciclos de ligación, detección y escisión, el número de ciclos determina la longitud de la lectura. Tras una serie de ciclos de ligación, se retira el producto de extensión y el *template* se restablece con un cebador complementario a la posición n-1 para una segunda ronda de ciclos de ligación. Se completan cinco rondas de restablecimiento de cebadores para cada secuencia (Figura 13).

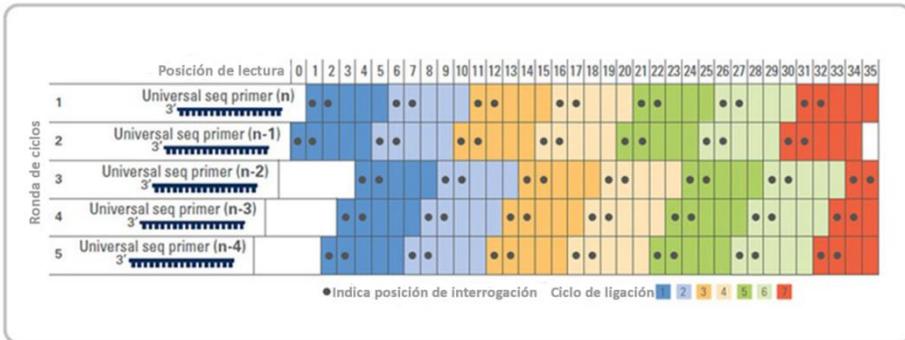


Figura 13. Rondas de ciclos de ligación. (Modificada de Applied Biosystems)

Mediante el proceso de restablecimiento de cebadores, prácticamente todas las bases son interrogadas en dos reacciones de ligación independientes por dos *templates* diferentes. Este doble interrogatorio es fundamental para la precisión que caracteriza al sistema SOLiD™. Por ejemplo, la base en la posición de lectura 5 se ensaya mediante el cebador número 2 en el ciclo de ligación 2 y por el cebador número 3 en el ciclo de ligación 1.

### 3.6.6. Análisis computacional de los resultados

Se mapearon las lecturas iniciales de todo el transcriptoma obtenidas por secuenciación contra la última versión del genoma humano (versión GRCh37/hg19) utilizando el algoritmo de mapeo de *Life Technologies* (<http://www.lifetechnologies.com/>; versión 1.3). Se utilizaron los parámetros estándar del software *BioScope™*, versión 1.3, en el análisis de extremos pareados y de todo el transcriptoma. Para ambas lecturas, directa y reversa, se establecieron los 25 primeros nucleótidos con un máximo de 2 errores permitidos. Los archivos alineados se presentaron en formato BAM/SAM (158). El software *Picard Tools* (versión 1.83 (<http://picard.sourceforge.net/command-line-overview.shtml>)) se utilizó para eliminar las lecturas de mala calidad (puntuación Phred <10).

Posteriormente, la predicción de genes se estimó usando el método de *Cufflinks* (159) y los niveles de expresión se calcularon usando el software *HTSeq*, versión 0.5.4p3 (160), este método elimina las lecturas multimapeadas, sólo las lecturas únicas se consideraron para la estimación de la expresión génica. El método *edgeR*, versión 3.2.4, se aplicó para el análisis de expresión diferencial entre las condiciones patológicas y normal (161). Este método se basa en diferentes procesos de normalización; profundidad de muestras globales, composición CG y longitud de los genes. En el proceso de la expresión diferencial, se usa un modelo de *Poisson* para estimar la varianza de los datos de RNA-seq y tener en cuenta tanto la variabilidad biológica como técnica. Se usan métodos de *Bayes* empíricos para moderar el grado de dispersión de los transcritos, mejorando la fiabilidad de la inferencia.

Los datos cuantitativos obtenidos a través de la técnica de RNA-seq fueron depositados en la base de datos del NIH GEO (GEO#GSE55296) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55296>) (156).

### 3.7. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

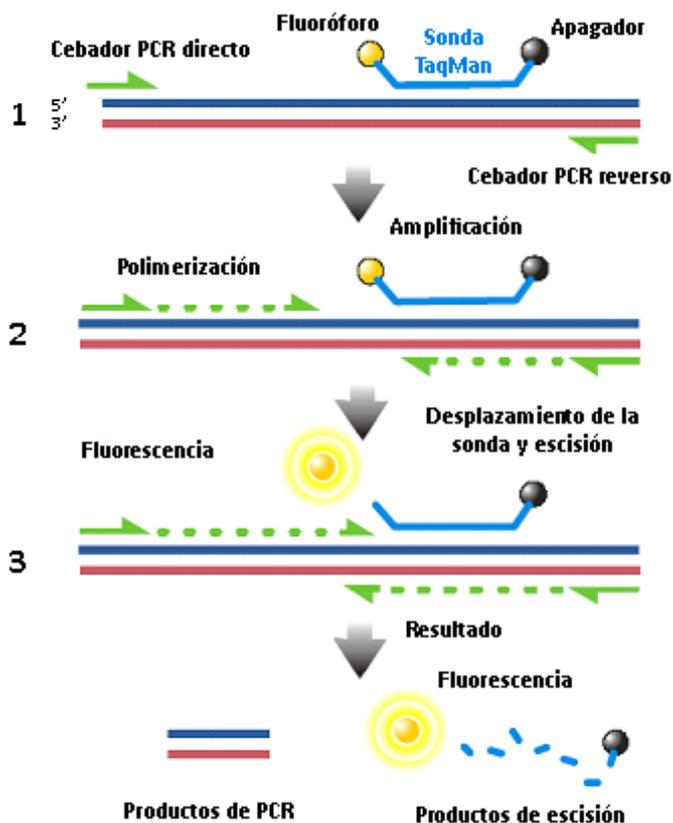
#### 3.7.1. Técnica de RT-qPCR

La RT-qPCR es una variante de la PCR convencional que se utiliza para la amplificación y cuantificación absoluta del producto de la amplificación. Estas características representan grandes ventajas de la RT-qPCR respecto a la convencional, ya que el producto de amplificación es monitorizado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa, para conocer si la reacción fue exitosa (162). Actualmente, la RT-qPCR es uno de los métodos más sensibles para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de *template*, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos.

Esta técnica utiliza la fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Las sondas *TaqMan*<sup>®</sup> constituyen un método específico de detección basado en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para generar la señal; este método es más costoso pero más eficiente y consiste en transferir la energía desde un donador o “reportero” fluorescente hacia un receptor o “apagador”. Estas sondas están formadas por oligonucleótidos marcados con un “reportero” fluorescente y un “apagador” que se encuentran unidos estrechamente cuando la sonda no

hibrida con su secuencia diana. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el “reportero” y el “apagador”, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el “reportero” sea liberada y capturada por el equipo, esta fluorescencia emitida está relacionada con la cantidad de amplicón producido (163, 164) (Figura 14).

El termociclador alberga sensores para medir la fluorescencia, lo que permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADNc en estudio (165). Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo (*Ct*, *cycle threshold*) deben ser determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del *background* en la fase exponencial de la reacción de la PCR, es decir, el valor *Ct* está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (166). La cuantificación se realiza mediante un software que puede determinar valores *Ct* realizando un análisis matemático de la curva de crecimiento, pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en la RT-qPCR.



**Figura 14.** RT-qPCR utilizando sondas *TaqMan*<sup>®</sup>. (1) Sonda *TaqMan*<sup>®</sup> intacta, no hay fluorescencia debido a la cercanía del fluoróforo y el "apagador". (2) La sonda y la cadena de ADNc se hibridan pero la fluorescencia todavía está "apagada". (3) Durante la PCR, la Taq polimerasa hidroliza la sonda por su actividad exonucleasa 5'-3', lo que provoca la separación del fluoróforo y el "apagador", y por tanto la emisión de fluorescencia. (Extraída de *epidemiologiamolecular.com*).

### 3.7.2. Extracción y precipitación de ARN y retrotranscripción a ADNc

La muestra utilizada para llevar a cabo la RT-qPCR fue ADNc obtenido tras la extracción y precipitación de ARN según los Apartados 3.5.1 y 3.5.2, respectivamente, y conservado a -20°C. Para la retrotranscripción de ADNc a partir de ARN total se siguió el siguiente protocolo:

Incubación a 65°C durante 5 minutos de una mezcla de cada muestra que contenía:

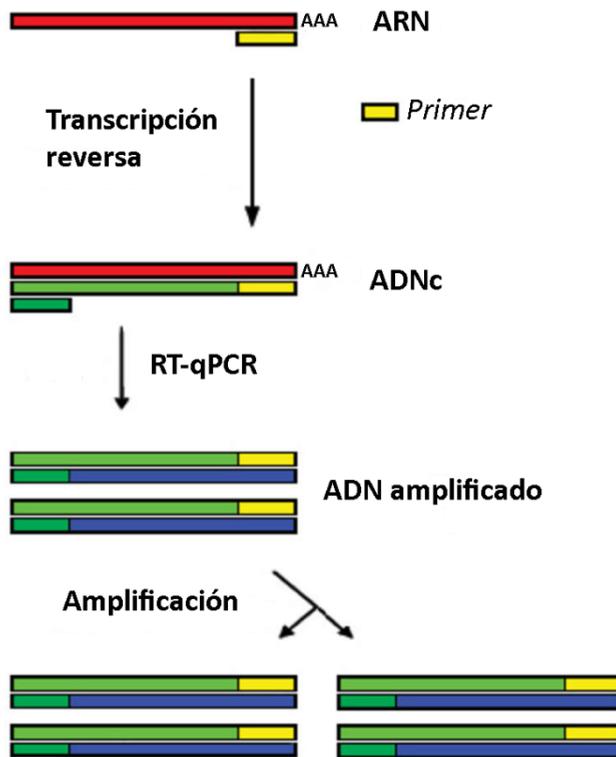
- 10 µl de ARN
- 1 µl de *random primers* (Invitrogen)
- 1 µl de *dNTPs Mix* 10 mM (Invitrogen)

Tras la primera incubación, se añadió a los tubos:

- 4 µl de tampón *FS 5X* (Invitrogen)
- 2 µl de *DTT* 0,1 M (Invitrogen)
- *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen)

Se incubaron las muestras a 37°C durante 2 minutos con la ribonucleasa e inmediatamente después se añadió 1 µl de la transcriptasa reversa (*M-MLV Reverse Transcriptase*, *Invitrogen*) a todas las muestras excepto para las que iban a servir de control negativo (revela la contaminación por ADN) que se incubaron en su lugar con 1 µl de agua libre de RNasas. Se realizaron dos incubaciones con el enzima MMLV, una a 25°C durante 10 minutos y otra a 37°C durante 90 minutos. Trascurrido este tiempo el ADNc obtenido se almacenó a -20°C inmediatamente.

La retrotranscripción, como hemos mencionado anteriormente, permite obtener ADNc a partir de moléculas de ARN, que son utilizadas como molde por la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN y es amplificado por la *Taq* polimerasa (ADN polimerasa termoestable), ya que el ARN no le sirve como sustrato para iniciar la amplificación por PCR (Figura 15).



**Figura 15.** Retrotranscripción e inicio de amplificación por RT-qPCR.

### 3.7.3. Reacción de RT-qPCR

Previo a la cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR, es necesario averiguar la concentración de ADNc imprescindible para la correcta amplificación del transcrito con las diferentes sondas. Para ello, se realizó una primera placa en la que el ADNc se diluyó a diferentes concentraciones: 1/5, 1/10, 1/20 y no diluido; y se usaron las diferentes sondas de estudio (Tabla 6) y de referencia (*GAPDH*, *PGK1* y *TFRC*).

**Tabla 6.** Sondas utilizadas para la validación por RT-qPCR.

<b>GEN</b>	<b>SONDA</b>
<b>CACNA1C</b>	Hs00167681_m1
<b>CACNB2</b>	Hs00167861_m1
<b>CLCN3</b>	Hs00923161_m1
<b>CLIC2</b>	Hs01574555_m1
<b>KCNJ5</b>	Hs00942581_m1
<b>KCNJ8</b>	Hs00958961_m1
<b>SCN2B</b>	Hs00394952_m1
<b>CACNG8</b>	Hs01100182_m1
<b>KCNN3</b>	Hs01546821_m1
<b>KCNJ2</b>	Hs00265315_m1
<b>TRPM7</b>	Hs00918956_m1
<b>GAPDH</b>	Hs99999905_m1
<b>PGK1</b>	Hs99999906_m1
<b>TFRC</b>	Hs00951083_m1

La prueba de diluciones se hizo con dos muestras representativas del total de muestras que se incluyeron en el estudio. Se preparó una mezcla para cada muestra con los reactivos necesarios para que se produzca la reacción (Tabla 7). Se utilizó el termociclador *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

**Tabla 7.** Reactivos de la para la reacción de RT-qPCR.

REACTIVO	CANTIDAD
ADNc	3 $\mu$ l
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>	10 $\mu$ l
Sonda <i>TaqMan®</i> correspondiente	1 $\mu$ l
Agua libre de RNasas	6 $\mu$ l
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Después de realizar la placa de prueba de diluciones, se eligió la dilución de ADNc que más se ajustaba a los ciclos de amplificación adecuados para una correcta cuantificación de la expresión génica. Una vez determinada dicha dilución de ADNc, se procedió a realizar las distintas placas de RT-qPCR con las sondas de referencia y las sondas correspondientes para determinar la expresión génica diferencial entre las muestras de pacientes comparadas con el grupo CNT.

#### 3.7.4. Cuantificación relativa de la expresión génica

Para llevar a cabo la cuantificación relativa de la expresión génica utilizamos el método matemático  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (167). Este método calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre un gen de estudio y uno o más genes de referencia (en nuestro caso *GAPDH*, *PGK1* y *TFRC*). Las sondas de referencia (*housekeeping*) tienen que elegirse en base a que la expresión génica sea constante en las muestras estudiadas. Con la utilización de este método no es necesaria la elaboración de una curva estándar, lo que resulta muy útil para el análisis de una gran cantidad de muestras. Las eficiencias de amplificación del gen estudio y de referencia

deben ser aproximadamente iguales, esto requiere una rigurosa optimización, los fragmentos de amplificación deben ser menores de 150 pb para que la eficiencia sea aproximadamente 1.

La ecuación que describe la amplificación exponencial de la PCR es:

$$X_n = X_0 x (1 + E_x)^n \quad (1)$$

Donde  $X_n$  es el número de copias del gen X en el ciclo n;  $X_0$  es el número inicial de copias del gen X;  $E_x$  es la eficiencia de la amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la PCR.

$$X_T = X_0 x (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_X \quad (2)$$

El  $C_T$  es el ciclo de fraccionario en el cual la fluorescencia del gen alcanza el umbral fijado.  $X_T$  es el número de copias del gen X en el ciclo  $C_T$ ;  $C_{T,X}$  es el ciclo  $C_T$  del gen X y  $K_X$  es una constante. Ecuación similar para el gen de referencia:

$$R_T = R_0 x (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (3)$$

Donde  $R_T$  es el número de copias del gen de referencia;  $R_0$  es el número inicial de copias del gen de referencia;  $E_R$  es la eficiencia de amplificación del gen de referencia;  $C_{T,R}$  es el ciclo  $C_T$  del gen de referencia y  $K_R$  es una constante del gen de referencia.

Dividiendo la ecuación 2 y 3, y asumiendo que la eficiencia del gen de referencia es igual a la eficiencia del gen X, tenemos:

$$\frac{X_0}{R_0} x (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (4)$$

$$X_N x (1 + E)^{\Delta C_T} = K \quad (5)$$

Donde  $X_N$  es la cantidad normalizada del gen X ( $X_0/R_0$ ) y el  $\Delta C_T$  es la diferencia de los  $C_{Ts}$  del gen de estudio y del gen de referencia. Ordenando la ecuación y dividiendo el  $X_N$  de cualquier muestra q entre el  $X_N$  de la muestra calibrador (cb) tenemos:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K x (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K x (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad (6)$$

$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}) \quad (7)$$

Para fragmentos de un tamaño menor de 150 pb, en el cual las concentraciones de cebadores y  $Mg^{2+}$  han sido adecuadamente optimizadas, la eficiencia de amplificación es cercana a 1, entonces, la cantidad del gen de estudio, normalizada a una referencia, y relativa a una muestra calibrador es:

$$\text{cantidad de gen diana} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad (8)$$

#### 4. CARACTERIZACIÓN EN CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES

Después de realizar un análisis del transcriptoma, resulta interesante ir más allá e identificar las categorías funcionales en las que se engloban los genes determinados por el análisis como diferencialmente expresados. Es por ello, que se utilizan herramientas bioinformáticas que clasifican los genes en categorías funcionales y establecen redes funcionales entre dichos genes. Estos programas permiten proporcionar información acerca de los mecanismos que influyen en una determinada enfermedad, también identificar genes y proteínas asociados con diferentes etiologías o enfermedades, así como predecir potenciales dianas terapéuticas.

Para el estudio de microarrays, se utilizaron las herramientas de software bioinformático DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) e IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*; Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). El programa DAVID permite el análisis de ontología y enriquecimiento, de esta forma, se exploraron las principales funciones biológicas y se utilizó para clasificar los genes funcionalmente asociados con el objetivo de explorar alteraciones en estas categorías funcionales siguiendo el protocolo publicado para DAVID (168). El programa IPA se utilizó para detectar las redes biológicas de los genes diferencialmente expresados codificantes de CI, utilizando el identificador Refseq IDs. Mediante este programa se pudieron identificar los grupos biológicos significativamente asociados con los genes de interés ( $p < 0,05$ ).

Para el análisis de RNA-seq se establecieron categorías funcionales entre el total de genes alterados significativamente. El enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados se basó en la aplicación

de una prueba hipergeométrica mediante el uso de la herramienta *ToppGene suite* (169) que constituye un portal para el análisis de enriquecimiento y priorización de genes candidatos de una lista de genes, basado en anotaciones funcionales y redes de interacciones proteicas. Mediante *ToppFun* seleccionamos el conjunto de genes a clasificar en base a que tuvieran un *fold change*  $\geq 1,3$  y una  $p < 0,05$ , aplicando la corrección de Bonferroni. Después, se representaron las categorías funcionales más significativas.

A continuación, se representaron las categorías de interés en un *Heat map* y *Hierarchical clustering* mediante el uso del programa *TIGR Multiexperiment Viewer* (MeV) versión 4.9. MeV es una herramienta de análisis de datos que incorpora algoritmos de *clustering*, visualización, clasificación, análisis estadístico y descubrimiento de rutas biológicas (<http://www.tm4.org/mev.html>).

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los valores se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) para las variables continuas y como porcentaje para las discretas. El test de *Kolmogorov-Smirnov* se utilizó para analizar la distribución de las variables. La comparación de las características clínicas se llevó a cabo mediante el test *t-Student* para las variables continuas y el test exacto de *Fisher* para las variables discretas. Los niveles de proteína en tejido medidos por Western blot y los de ARNm obtenidos de la cuantificación de la expresión génica se compararon entre grupos mediante el test *t-Student* para las variables con una distribución normal y para variables con una distribución no normal se utilizó el test no paramétrico *U* de *Mann-Whitney*. Para estudiar la relación simple entre los niveles de proteínas y con los parámetros de función ventricular se realizó un análisis de regresión simple utilizando el coeficiente de correlación (*r*) de *Pearson*. Los valores que presentaron una distribución no normal fueron transformados logarítmicamente y normalizados previo a la realización de la correlación simple paramétrica. El nivel de significación estadística se asumió con  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software SPSS para Windows (versión 20; *IBM SPSS Inc*).

## 6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación de este estudio es la inherente variabilidad de las muestras cardíacas, dado su origen humano y el tratamiento farmacológico al que los pacientes estaban sometidos. Los pacientes de este estudio estaban recibiendo tratamiento convencional, y algunas terapias pueden afectar a los niveles proteicos y de ARNm. Para asegurarnos de que nuestra población era etiológicamente homogénea, elegimos pacientes con MCD que no tenían antecedentes familiares de la enfermedad y pacientes con etiología isquémica. También queremos enfatizar la importancia de haber llevado a cabo este estudio en un número significativo de muestras patológicas y CNT haciendo que nuestros resultados sean aplicables a las poblaciones con MCD y MCI. Además, el hecho de trabajar con corazones explantados y nuestra presencia en quirófano en el momento del trasplante, nos permiten extraer la región de tejido que queremos analizar, lo cual no sería posible si el estudio se hiciera usando tejido biopsiado.



# IV. RESULTADOS



---

---

## 1. ESTUDIO SOBRE LAS ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

### 1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

En el estudio de proteínas del RE analizamos 52 muestras en total de corazones explantados, 42 muestras de pacientes diagnosticados de IC (n=21 MCD, n=21 MCI) sometidos a trasplante cardíaco, y 10 muestras de corazones sanos como grupo CNT. La mayoría de pacientes eran varones (79%) con una media de edades de  $53 \pm 11$  años, tenían una clasificación funcional de la NYHA de III-IV y habían sido diagnosticados previamente con comorbilidades asociadas a la IC como hipertensión (32%), hipercolesterolemia (14%) y diabetes mellitus (20%). La Tabla 1 muestra las características clínicas y los parámetros ecocardiográficos de los pacientes con IC separados por etiologías. En cuanto a las características clínicas, observamos que el grupo de pacientes con MCD era significativamente más joven ( $p < 0,05$ ) y tenía unos niveles de colesterol total menores ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo de pacientes con MCI. También encontramos diferencias significativas en el diámetro tele-sistólico del VI (DTSVI) ( $p < 0,05$ ) y DTDVI ( $p < 0,05$ ) con unos valores superiores en pacientes con MCD. El grupo CNT estuvo formado principalmente por varones (70%) con una media de edad de  $46 \pm 18$  años.

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes utilizados para el análisis proteico del RE.

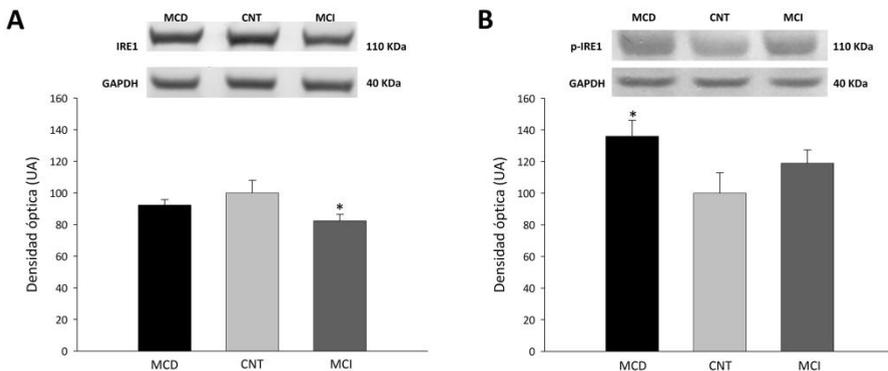
	MCD (n=21)	MCI (n=21)
Edad (años)	49 ± 13	57 ± 7*
Género masculino (%)	79	79
Clase NYHA	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,5
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 6	25 ± 3
Hemoglobina (mg/dL)	14 ± 2	13 ± 2
Hematocrito (%)	41 ± 6	37 ± 7
Colesterol total (mg/dL)	142 ± 42	185 ± 40**
Hipertensión previa (%)	25	46
Exfumadores (%)	63	75
Diabetes mellitus (%)	15	29
FE (%)	22 ± 8	22 ± 8
FA (%)	12 ± 4	13 ± 6
DTSVI (mm)	65 ± 11	56 ± 9*
DTDVI (mm)	74 ± 11	64 ± 8*
Duración enfermedad (meses)	79 ± 57	92 ± 76

MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; Duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

## 1.2. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

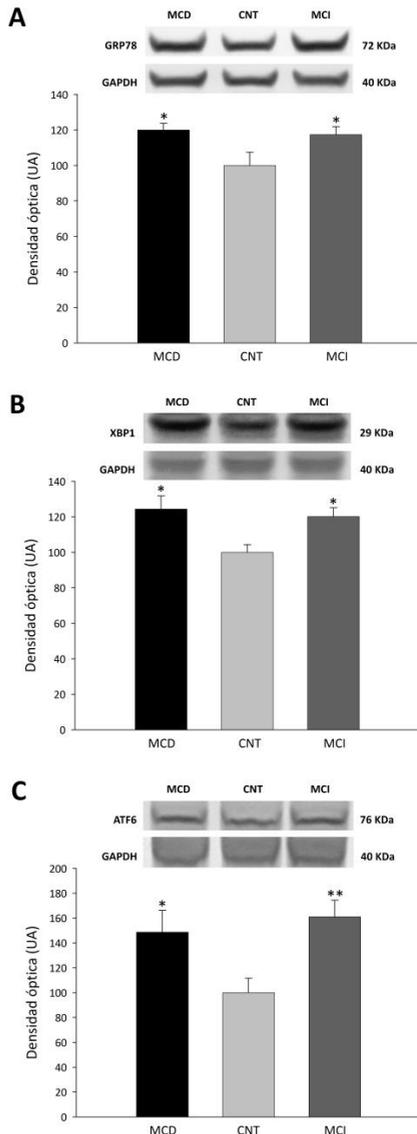
Centramos nuestro estudio en las proteínas de estrés del RE: IRE1, p-IRE1, GRP78, XBP1, ATF6, ATF4 y p-eIF2 $\alpha$ , la cuales son altamente representativas en la activación de la respuesta UPR durante el proceso de estrés de dicho orgánulo.

Cuando comparamos los niveles proteicos entre muestras de corazones patológicos (n=21 MCD, n=21 MCI) frente a 10 muestras de sujetos CNT, encontramos que p-IRE1 estaba aumentada en la MCD ( $136 \pm 29$  vs.  $100 \pm 34$  unidades arbitrarias (UA),  $p < 0,05$ ), mientras que IRE1 estaba significativamente reducida en las muestras de pacientes con MCI ( $82 \pm 19$  vs.  $100 \pm 23$  UA,  $p < 0,05$ ) (Figura 1).



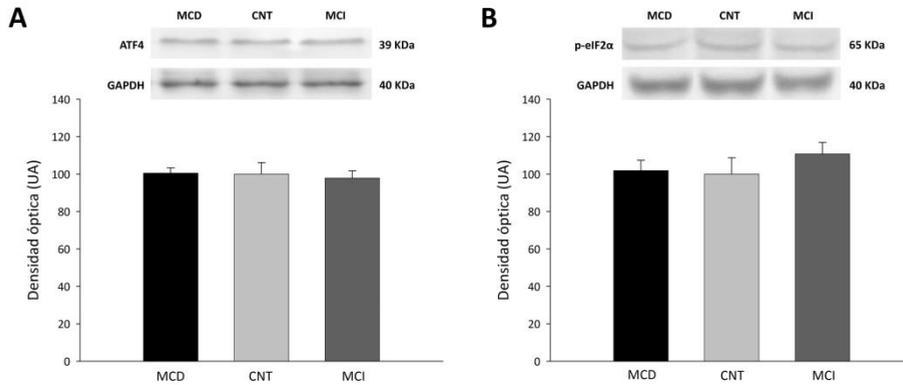
**Figura 1.** Niveles proteicos de IRE1 (**A**) y p-IRE1 (**B**) en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente relativizado al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica \* $p < 0,05$  vs. grupo CNT. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; IRE1, *inositol-requiring protein-1*; p-IRE1, *phosphorylated IRE1*; UA, unidades arbitrarias.

Las proteínas GRP78, XBP1 y ATF6 estuvieron incrementadas tanto en la MCD ( $120 \pm 19$  vs.  $100 \pm 23$  UA,  $p < 0,05$ ;  $124 \pm 33$  vs.  $100 \pm 14$  UA,  $p < 0,05$ ;  $149 \pm 53$  vs.  $100 \pm 31$  UA,  $p < 0,05$ , respectivamente), como en la MCI ( $117 \pm 21$  vs.  $100 \pm 23$  UA,  $p < 0,05$ ;  $120 \pm 22$  vs.  $100 \pm 14$  UA,  $p < 0,05$ ;  $161 \pm 40$  vs.  $100 \pm 31$  UA,  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura 2).



**Figura 2.** Niveles proteicos de GRP78 (**A**), XBP1 (**B**) y ATF6 (**C**) en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente relativizados al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs. grupo CNT. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; GRP78, *glucose-related protein 78*; XBP1, *X-box binding protein*; ATF6, *activating transcription factor 6*; UA, unidades arbitrarias.

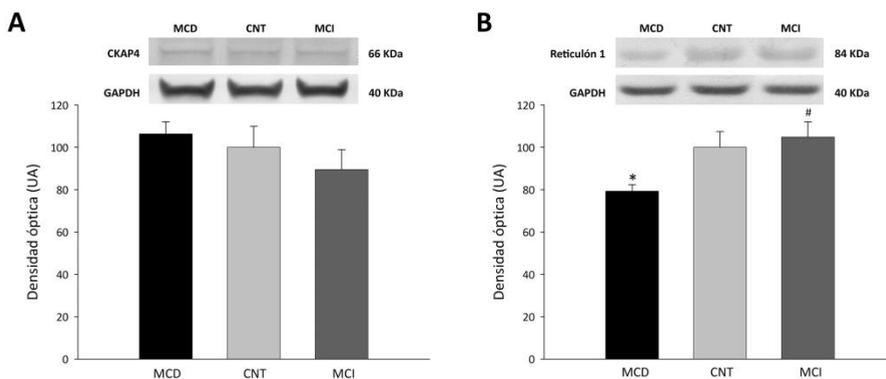
Sin embargo, los niveles de ATF4 y p-eIF2 $\alpha$  no variaron en ninguna patología (Figura 3).



**Figura 3.** Niveles proteicos de ATF4 (A) y p-eIF2 $\alpha$  (B) en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente relativizados al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; ATF4, *activating transcription factor 4*; p-eIF2 $\alpha$ , *phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 alpha*; UA, unidades arbitrarias.

### 1.3. NIVELES DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Analizamos los niveles de las proteínas estructurales del RE CKAP4, Reticulón 1, RRBP1, kinectina, y dos isoformas (A y B) de Nogo (Reticulón 4), las cuales tienen un papel relevante en la morfología de este orgánulo. Los experimentos de Western blot revelaron la existencia de alteraciones significativas en los niveles de varias proteínas estructurales del RE. Sin embargo, no observamos cambios en los niveles de CKAP4 en ninguna de las patologías estudiadas en comparación con el grupo CNT (Figura 4A).

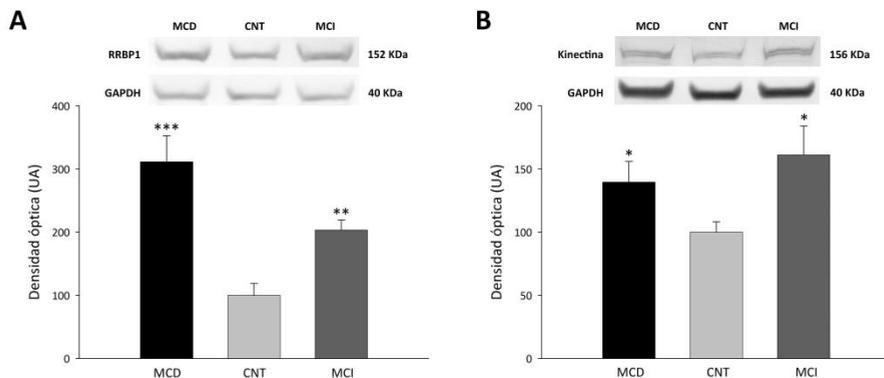


**Figura 4.** Niveles proteicos de CKAP4 **(A)** y Reticulón 1 **(B)** en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente relativizados al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. \* $p < 0,01$  vs. grupo CNT; # $p < 0,01$  MCD vs. MCI. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; CKAP4, *cytoskeleton-associated protein 4*; UA, unidades arbitrarias.

Reticulón 1 mostró diferentes cambios según la etiología. Mientras que esta proteína presentó unos niveles reducidos de forma significativa en el grupo de MCD ( $79 \pm 13$  vs.  $100 \pm 17$  UA,  $p < 0,01$ ), no observamos

alteraciones significativas en el grupo de MCI. Por otro lado, encontramos diferencias significativas al comparar ambas etiologías entre sí ( $79 \pm 13$  vs.  $105 \pm 31$  UA,  $p < 0,01$ ) (Figura 4B).

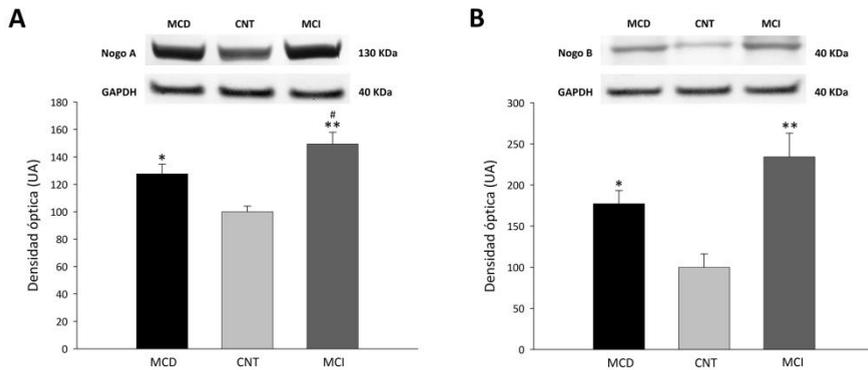
Asimismo, los niveles de la proteína RRBP1 estuvieron incrementados en ambas patologías, MCD y MCI, al compararlos con el grupo CNT ( $311 \pm 208$  vs.  $100 \pm 54$  UA,  $p < 0,001$ ;  $203 \pm 75$  vs.  $100 \pm 54$  UA,  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura 5A), de igual manera ocurrió con los niveles de kinectina ( $140 \pm 76$  vs.  $100 \pm 25$  UA,  $p < 0,05$ ;  $161 \pm 94$  vs.  $100 \pm 25$  UA,  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 5B).



**Figura 5.** Niveles proteicos de RRBP1 (A) y Kinectina (B) en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente relativizados al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo CNT. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; RRBP1, *receptor-binding protein 1*; UA, unidades arbitrarias.

Además de encontrar niveles aumentados de Nogo A ( $128 \pm 33$  vs.  $100 \pm 13$  UA,  $p < 0,01$ ;  $149 \pm 38$  vs.  $100 \pm 13$  UA,  $p < 0,001$ , respectivamente) y Nogo B ( $177 \pm 76$  vs.  $100 \pm 52$  UA,  $p < 0,01$ ;  $234 \pm 125$  vs.  $100 \pm 52$  UA,

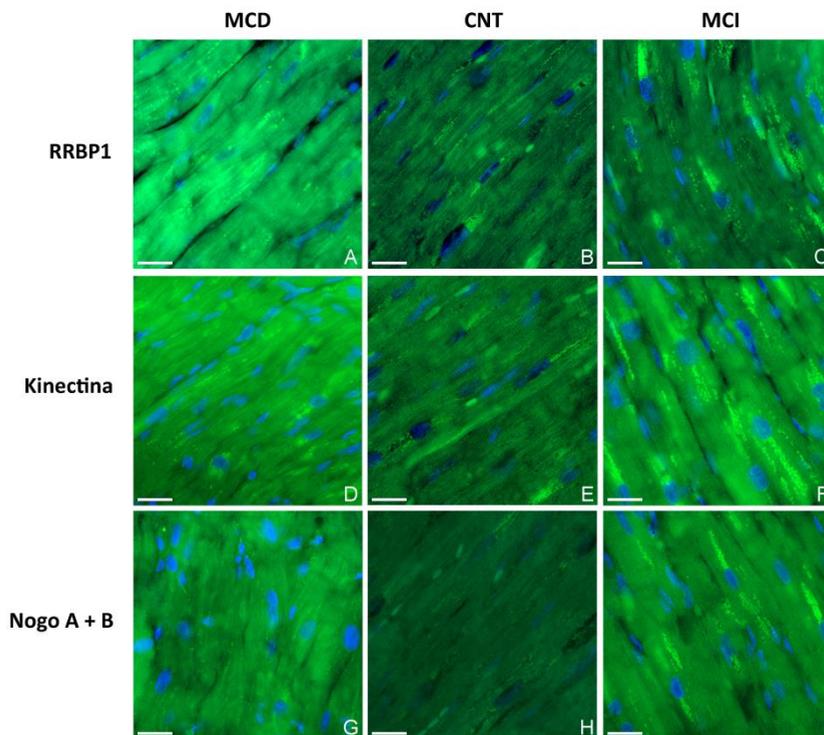
$p < 0,001$ , respectivamente) (Figura 6A y B, respectivamente) en ambas cardiopatías, observamos también diferencias significativas en los niveles de la proteína Nogo A entre los dos grupos patológicos ( $128 \pm 33$  vs.  $149 \pm 38$  UA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Niveles proteicos de Nogo A (**A**) y Nogo B (**B**) en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente relativizados al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$  vs. grupo CNT; # $p < 0,05$  MCD vs. MCI. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; UA, unidades arbitrarias.

#### 1.4. DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Adicionalmente, estudiamos la distribución de diversas proteínas estructurales del RE mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos fueron consistentes con respecto a los obtenidos previamente en el análisis de Western blot. Observamos que los niveles de RRBP1, kinectina y Nogo A+B estaban incrementados y que su distribución seguía el mismo patrón difuso en el citoplasma de los cardiomiocitos, tanto en corazones de pacientes con MCD y MCI como en las muestras CNT (Figura 7).

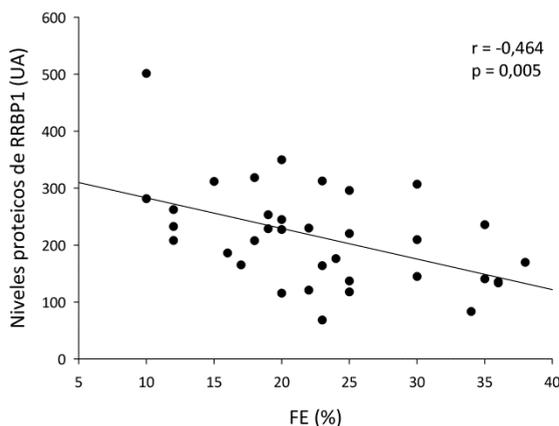


**Figura 7.** Análisis por inmunofluorescencia de la distribución celular de proteínas estructurales del retículo endoplásmico en pacientes con MCD y MCI comparados con el grupo CNT. **(A-C)** RRBP1 **(D-F)** Kinectina y **(G-I)** Nogo A+B. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; RRBP1, *receptor-binding protein 1*. La barra representa 10  $\mu$ m.

### 1.5. CORRELACIONES ENTRE PROTEÍNAS DE ESTRÉS Y ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA

Analizamos las posibles correlaciones existentes entre las proteínas del RE y encontramos que kinectina se correlacionaba con las proteínas Nogo A ( $r=0,404$ ,  $p=0,016$ ), Nogo B ( $r=-0,390$ ,  $p=0,017$ ) y Reticulón 1 ( $r=0,362$ ,  $p=0,042$ ) en los pacientes con IC de etiologías dilatada e isquémica. También observamos correlaciones entre las proteínas de estrés del RE GRP78 y XBP1 ( $r=-0,685$ ,  $p=0,001$ ) en el grupo con MCD. Además, la proteína estructural RRBP1 y la proteína de estrés XBP1 estuvieron relacionadas entre ellas ( $r=0,536$ ,  $p=0,022$ ).

Finalmente, quisimos estudiar las relaciones entre estas proteínas y los parámetros de función ventricular. Del total de 42 pacientes, tuvimos a nuestra disposición los datos ecocardiográficos de 35 pacientes. En este análisis de correlación encontramos que la proteína RRBP1 estuvo inversamente correlacionada con la FE ( $r=-0,464$ ,  $p=0,005$ ) (Figura 8) y la FA ( $r=-0,463$ ,  $p=0,005$ ) en los pacientes con IC (MCD y MCI).



**Figura 8.** Relación entre la proteína RRBP1 y la FE del ventrículo izquierdo en pacientes con MCD y MCI. MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica; RRBP1, *receptor-binding protein 1*; UA, unidades arbitrarias; FE, fracción de eyección.

---

---

## 2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA MEDIANTE MICROARRAYS

### 2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Para llevar a cabo el estudio de microarrays en el cual encontramos genes codificantes de CI de membrana diferencialmente expresados, utilizamos 12 muestras de corazones de pacientes con MCD y 5 muestras pertenecientes a donantes CNT. La Tabla 2 muestra las características clínicas de los pacientes. Todos fueron varones con una media de edad de  $48 \pm 9$  años, una clasificación funcional según la NYHA de III-IV de media y presentaban comorbilidades como hipertensión (25%), e hipercolesterolemia (17%).

Para la validación de los resultados obtenidos del análisis de microarrays por RT-qPCR y Western blot, aumentamos el tamaño muestral a 21 pacientes con MCD y 8 sujetos del grupo CNT. Las características clínicas de estos pacientes se muestran también en la Tabla 2.

El grupo CNT utilizado en este estudio estuvo formado principalmente por varones (80%) con una media de edad de  $55 \pm 3$  años. Para el proceso de validación en el cual se incrementó el número de muestras, el 60% eran varones con una media de edad de  $45 \pm 14$  años.

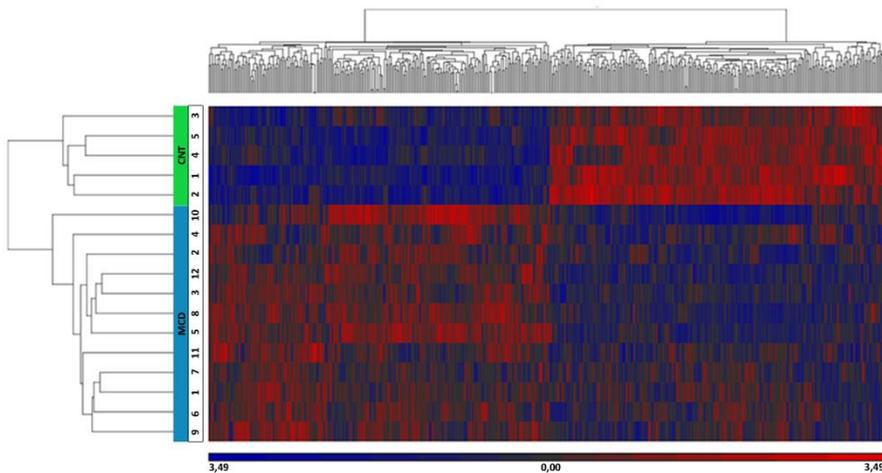
**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes utilizados en el análisis de microarrays, RT-qPCR y Western blot.

	MCD (n=12) Microarrays	MCD (n=21) RT-qPCR/Western blot
Edad (años)	48 ± 9	49 ± 14
Género varón (%)	100	96
Clase NYHA	3,5 ± 0,4	3,2 ± 0,4
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 4	27 ± 7
Hemoglobina (mg/mL)	13 ± 2	13 ± 2
Hematocrito (%)	40 ± 6	39 ± 6
Colesterol total (mg/dL)	158 ± 45	136 ± 41
Hipertensión previa (%)	25	37
Exfumadores (%)	67	67
Diabetes mellitus (%)	0	15
FE (%)	20 ± 6	22 ± 7
FA (%)	10 ± 3	12 ± 4
DTSVI (mm)	71 ± 10	62 ± 10
DTDVI (mm)	79 ± 9	71 ± 10
Duración enfermedad (meses)	64 ± 47	69 ± 51

MCD, miocardiopatía dilatada; RT-qPCR, PCR cuantitativa a tiempo real; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; Duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón.

## 2.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA

Mediante la tecnología de microarrays, analizamos el perfil de expresión génica de un conjunto de pacientes con MCD en comparación con el grupo CNT. Previo al análisis estadístico, se llevó a cabo un control de calidad del proceso de hibridación mediante el *software Partek Genomics Suite*. Para realizar la comparación del perfil de expresión entre los grupos muestrales obtuvimos un *Heat map* con *Hierarchical clustering* en dos dimensiones (genes y muestras) que claramente diferenció entre el grupo patológico y el grupo CNT sin ningún grado de solapamiento entre ambos grupos (*fold change*  $\geq 1,3$  y  $p < 0,01$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** *Heat map* con *Hierarchical clustering* (*fold change*  $\geq 1,3$  y  $p < 0,01$ ) que revela la existencia de dos grupos, MCD y CNT, claramente separados. El nivel de expresión relativa de cada gen se indica mediante la barra de color, azul significa menor expresión y rojo mayor expresión. CNT, control; MCD, miocardiopatía dilatada.

Al comparar el grupo de pacientes con MCD con el grupo CNT, 503 genes estuvieron diferencialmente expresados (*fold change*  $\geq 1,3$  y  $p < 0,01$ ),

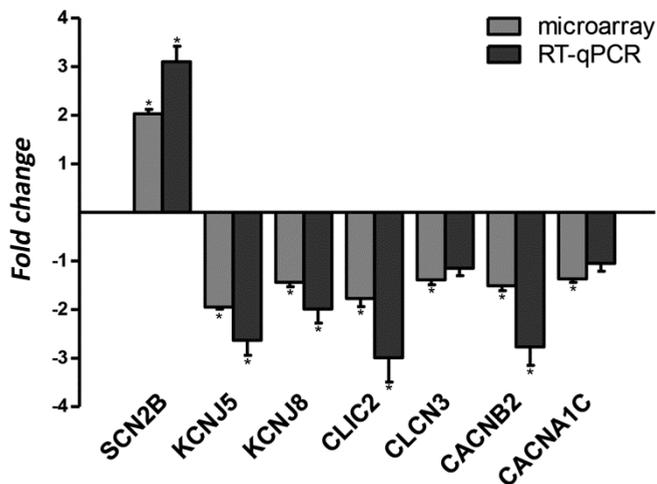
de los cuales 201 genes estaban sobre-expresados y 302 infra-expresados en el grupo patológico. Entre estos genes, al hacer un análisis por categorías funcionales mediante el programa DAVID, encontramos que 13 de ellos se englobaban en la categoría de CI. Estos genes son responsables del flujo de iones implicados en la contracción cardíaca, proceso altamente importante que se encuentra alterado en la MCD (como hemos descrito previamente en el Apartado 2.5 de la Introducción). Debido a la relevancia de estos canales y que no habían sido estudiados previamente en la MCD, nos centramos en el estudio de siete CI que tienen un papel clave en este proceso de contracción del corazón (*SCN2B*, *KCNJ5*, *KCNJ8*, *CLIC2*, *CLCN3*, *CACNB2* y *CACNA1C*) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Genes codificantes de canales iónicos cardíacos diferencialmente expresados en el análisis por microarrays y seleccionados para validación.

Gen	Descripción	Fold Change	p-valor
<i>SCN2B</i>	Canal de sodio, subunidad beta	2,03	$5,20 \times 10^{-6}$
<i>KCNJ5</i>	Canal rectificador de entrada de potasio 4 activado por proteínas G	-1,95	$6,44 \times 10^{-4}$
<i>KCNJ8</i>	Canal rectificador de entrada de potasio 8 sensible a ATP	-1,44	$6,72 \times 10^{-3}$
<i>CLIC2</i>	Canal de cloro intracelular 2	-1,77	$4,87 \times 10^{-4}$
<i>CLCN3</i>	Transportador de intercambio 3 de H/Cl	-1,39	$7,82 \times 10^{-3}$
<i>CACNB2</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, subunidad beta 2	-1,51	$1,92 \times 10^{-3}$
<i>CACNA1C</i>	Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L, subunidad alfa-1C	-1,37	$9,95 \times 10^{-3}$

### 2.3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS POR RT-qPCR

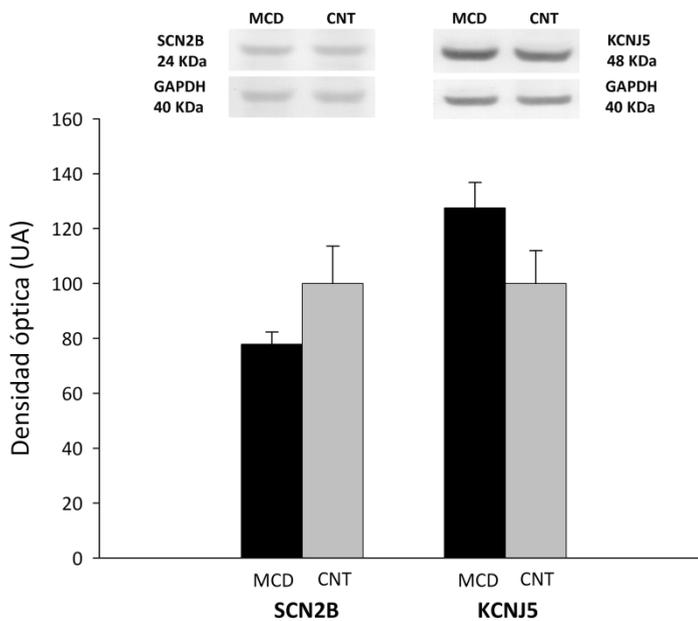
Posteriormente a la obtención del perfil de expresión de genes codificantes de CI de membrana, pasamos a validar dichos resultados mediante la realización de una RT-qPCR. Concluimos que el gen del canal de sodio *SCN2B* estaba sobre-expresado en el grupo de pacientes mientras que los genes *KCNJ5*, *KCNJ8*, *CLIC2* y *CACNB2* mostraban una expresión génica reducida en el grupo con MCD respecto al grupo CNT (Figura 10), lo que confirmó los resultados obtenidos en el estudio previo de microarrays. Sin embargo, la alteración de la expresión de *CACNA1C* y *CLCN3* no fue significativa en la RT-qPCR aunque sí tuvo la misma tendencia que la observada en el análisis por microarrays.



**Figura 10.** Comparación de los resultados de microarrays con la validación por RT-qPCR. El gráfico representa los valores obtenidos en microarrays y los niveles relativos de ARNm obtenidos mediante RT-qPCR normalizados a la expresión de 3 genes *housekeeping* (GAPDH, PGK1 y TFRC), respectivamente. La barra de error representa el error estándar de la media (SEM). \* $p < 0,05$  vs. CNT.

## 2.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA

Analizamos la expresión proteica de los dos canales que mostraron una alteración mayor en el estudio mediante microarrays, SCN2B y KCNJ5. Los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre el grupo con MCD y el grupo CNT en cuanto a los niveles de la proteína SCN2B ( $78 \pm 19$  vs.  $100 \pm 31$  UA,  $p > 0,05$ ), obtuvimos los mismos resultados al comparar los niveles proteicos de KCNJ5 en ambos grupos ( $128 \pm 34$  vs.  $100 \pm 27$  UA,  $p > 0,05$ ). La Figura 11 ilustra los resultados obtenidos de los niveles proteicos de SCN2B y KCNJ5 en pacientes con MCD.

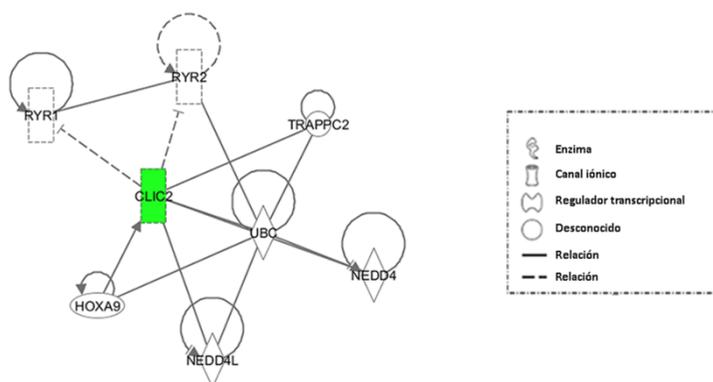


**Figura 11.** Niveles proteicos de SCN2B y KCNJ5 en pacientes con MCD comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; UA, unidades arbitrarias.

## 2.5. CARACTERIZACIÓN DE RUTAS FUNCIONALES

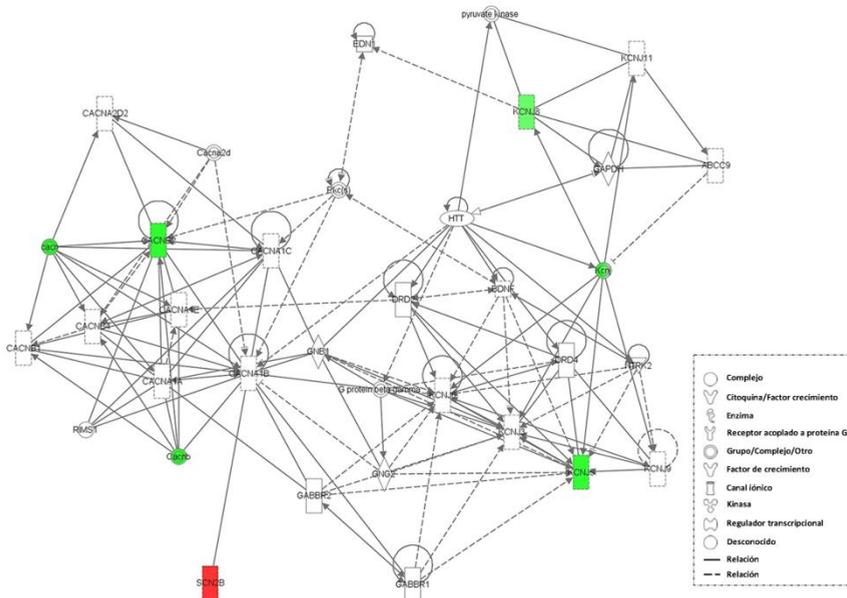
Comprobamos si los genes diferencialmente expresados se englobaban en grupos basados en sus procesos biológicos, o estaban relacionados entre ellos, para lo que utilizamos el software IPA (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Mediante la aplicación de diversos parámetros recomendados, obtuvimos una red que englobaba al gen *CLIC2* y otra red adicional en la cual se incluían los genes *SCN2B*, *KCNJ5*, *KCNJ8*, *CACNA1C* y *CACNB2*.

En la primera red que engloba a *CLIC2* (Figura 12), se observó que este gen ejercía una inhibición sobre los *RYR1* y *RYR2*. Además, *CLIC2* mostró una relación con *TRAPPC2* (*trafficking protein particle complex subunit 2*) y *HOXA9* (*Homeobox protein Hox-A9*). Finalmente, *CLIC2* se relacionó con el sistema de ubiquitinación mediante *NEDD4* (*E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4*), *NEDD4L* (*E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like*) y *UBC* (ubiquitina C).



**Figura 12.** Red de análisis funcional que engloba a *CLIC2*. El color explica el *fold change* de cada gen, verde significa infra-expresión y rojo sobre-expresión. Las líneas continuas indican interacción directa gen a gen, y las discontinuas indican interacciones indirectas.

En la segunda red (Figura 13), *CACNB2* mostró interacciones directas con familias génicas relacionadas con canales de calcio, como las familias *CACN* (en la que se incluye *CACNA1C*) y *CACNB*. *RIM1*, gen que regula a los genes codificantes de canales de calcio, también mostró una asociación con *CACNB2*. Finalmente, el canal de sodio *SCN2B* mostró una íntima asociación con *CACNB2* a través de la interacción con *CACNA1B*. Los genes de CI de potasio *KCNJ5* y *KCNJ8* mostraron diversas interacciones con 17 miembros de su familia génica *KCNJ*.



**Figura 13.** Red de análisis funcional que engloba a los genes *SCN2B*, *KCNJ5*, *KCNJ8*, *CACNA1C* y *CACNB2*. El color explica el *fold change* de cada gen, verde significa infra-expresión y rojo sobre-expresión. Las líneas continuas indican interacción directa gen a gen, y las discontinuas indican interacciones indirectas.

---

---

### **3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN**

Posteriormente al análisis mediante microarrays en la MCD, quisimos profundizar más en el estudio de los CI cardíacos, de forma que llevamos a cabo un estudio mediante la técnica RNA-seq. Esta técnica proporcionó una mayor sensibilidad y precisión en la detección de genes diferencialmente expresados que la técnica previa.

#### **3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

En el análisis de RNA-seq utilizamos 13 muestras de VI de corazones procedentes de pacientes diagnosticados con MCD, 13 muestras pertenecientes a pacientes con MCI y 10 corazones no patológicos procedentes de donantes CNT. En cuanto al grupo de pacientes con MCD, en la validación por RT-qPCR y el análisis proteico, incrementamos el tamaño muestral hasta 19 muestras de pacientes con MCD, con el mismo número de CNT. Los pacientes con MCD en ambos análisis fueron la mayoría varones (92% y 84%, respectivamente), con una media de edad de  $51 \pm 11$  y  $47 \pm 12$  años, respectivamente. Fueron clasificados funcionalmente según la NYHA con una clase de III-IV y diagnosticados previamente de diversas comorbilidades asociadas, como hipertensión (17 y 29%, respectivamente), hipercolesterolemia (8 y 21%, respectivamente) y diabetes mellitus (17 y 13%, respectivamente). La Tabla 4 muestra las características clínicas de los pacientes con MCD.

**Tabla 4.** Características clínicas de los pacientes con MCD utilizados para el análisis de RNA-seq, RT-qPCR y Western blot.

	MCD (n=13) RNA-seq	MCD (n=19) RT-qPCR/Western blot
Edad (años)	51 ± 11	47 ± 12
Sexo varón (%)	92	84
Clase NYHA	3,4 ± 0,4	3,5 ± 0,4
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 ± 5	25 ± 5
Hemoglobina (mg/dL)	13 ± 3	13 ± 3
Hematocrito (%)	39 ± 8	40 ± 6
Colesterol total (mg/dL)	147 ± 37	145 ± 44
Hipertensión previa (%)	17	29
Exfumadores (%)	50	67
Diabetes mellitus (%)	17	13
FE (%)	20 ± 7	22 ± 8
FA (%)	11 ± 4	12 ± 4
DTSVI (mm)	71 ± 12	66 ± 12
DTDVI (mm)	80 ± 11	75 ± 12
Duración enfermedad (meses)	75 ± 68	80 ± 69

MCD, miocardiopatía dilatada; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; Duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón.

El grupo de pacientes con MCI de los cuales obtuvimos muestras de VI lo compusieron todo varones, con una media de edad de 55 ± 8 años. Para la validación por RT-qPCR y Western blot, incrementamos el tamaño muestral a 14 muestras de VI, en este grupo había un 93% de varones, con la misma media de edad que el grupo anterior (55 ± 8 años). No encontramos diferencias significativas entre ambos grupos, que

presentaban también comorbilidades como hipertensión (33 y 31%, respectivamente) y diabetes mellitus (42 y 39%, respectivamente) (Tabla 5). El grupo CNT (n=10) lo compusieron un 80% de varones con una media de edad de  $47 \pm 16$  años.

**Tabla 5.** Características clínicas de los pacientes con MCI utilizados para el análisis de RNA-seq, validación por RT-qPCR y Western blot.

	MCI (n=13) RNA-seq	MCI (n=14) RT-qPCR/Western blot
Edad (años)	55 ± 8	55 ± 8
Sexo varón (%)	100	93
Clase NYHA	3,6 ± 0,4	3,3 ± 0,9
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 ± 5	27 ± 4
Hemoglobina (mg/dL)	14 ± 3	13 ± 3
Hematocrito (%)	41 ± 6	40 ± 8
Colesterol total (mg/dL)	162 ± 41	160 ± 40
Hipertensión previa (%)	33	31
Exfumadores (%)	92	85
Diabetes mellitus (%)	42	39
FE (%)	24 ± 4	24 ± 6
FA (%)	13 ± 2	13 ± 2
DTSVI (mm)	56 ± 8	56 ± 8
DTDVI (mm)	64 ± 8	64 ± 8
Duración enfermedad (meses)	45 ± 40	48 ± 40

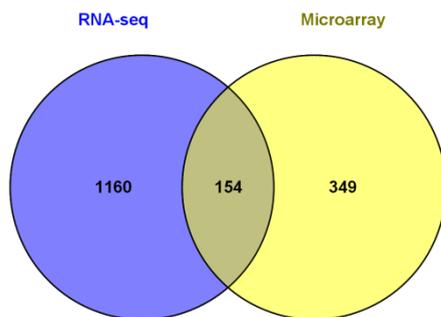
MCI, miocardiopatía isquémica; RT-qPCR, PCR cuantitativa a tiempo real; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; Duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón.

Obtuvimos también muestras de aurícula izquierda de pacientes con MCI (n=14) para realizar la validación por RT-qPCR, que eran la mayoría varones (86%). El grupo CNT (n=10) estuvo formado también principalmente por hombres (80%), con una edad media de  $62 \pm 12$  años.

### 3.2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

Llevamos a cabo un análisis transcriptómico a gran escala de RNA-seq con el fin de determinar el perfil de expresión génica diferencial entre grupos, de forma que pudiéramos averiguar si existían nuevos genes implicados en el desarrollo y progresión de la MCD.

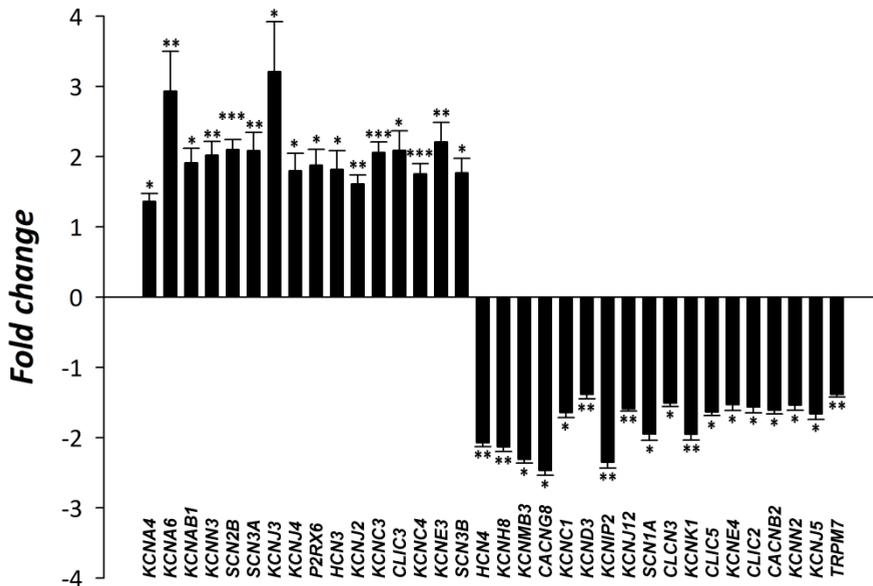
Comparamos los resultados obtenidos en este análisis con los obtenidos en el estudio basado en la tecnología de microarrays basándonos en los mismos criterios de corte para la comparación (valor mínimo de *fold change* de 1,3 con un p valor <0,01). Con estos criterios en la técnica de RNA-seq identificamos 1.314 genes diferencialmente expresados y encontramos que 154 genes alterados fueron identificados mediante ambas técnicas y 1.160 genes se encontraron diferencialmente expresados exclusivamente mediante la técnica de RNA-seq (Figura 14).



**Figura 14.** Diagrama de Venn representando el número de genes diferencialmente expresados hallados mediante las técnicas de RNA-seq y microarrays, y los genes alterados comunes a ambos análisis (valor mínimo de *fold change* de 1,3 con un p valor <0,01).

El análisis identificó un total de 2.398 genes diferencialmente expresados entre el grupo con MCD y el grupo CNT (valor mínimo de *fold change* de 1,3 con un p valor <0,05), de los cuales 935 estaban sobre-

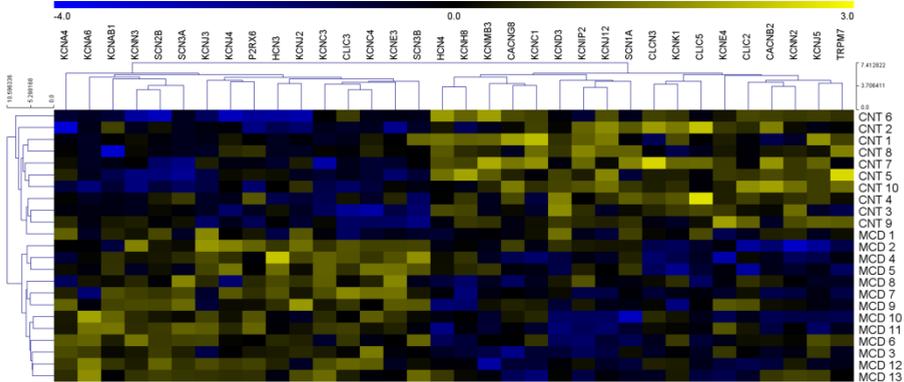
expresados y 1.463 tenían unos valores de expresión reducidos respecto al grupo CNT. Entre estos genes alterados, algunos de ellos pertenecían a la categoría de CI. En total, encontramos que 34 genes codificantes de CI de membrana presentaban variaciones en la expresión génica en pacientes con MCD al compararlos con el grupo CNT. De estos 34 genes, 16 presentaron niveles de ARNm aumentados y 18 niveles reducidos (Figura 15).



**Figura 15.** Genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría de canales iónicos en la MCD comparados con el grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 1. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de valores de expresión relativa del ARNm. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . vs. grupo CNT. CNT, control; MCD, miocardiopatía dilatada.

De estos genes, identificados como alterados y posteriormente validados, encontramos los mismos genes que en el estudio previo de microarrays (*CACNB2*, *SCN2B*, *KCNJ5*, *CLIC2* y *CLCN3*). Con el fin de visualizar las alteraciones a nivel de expresión génica, elaboramos un *Heat map* y un

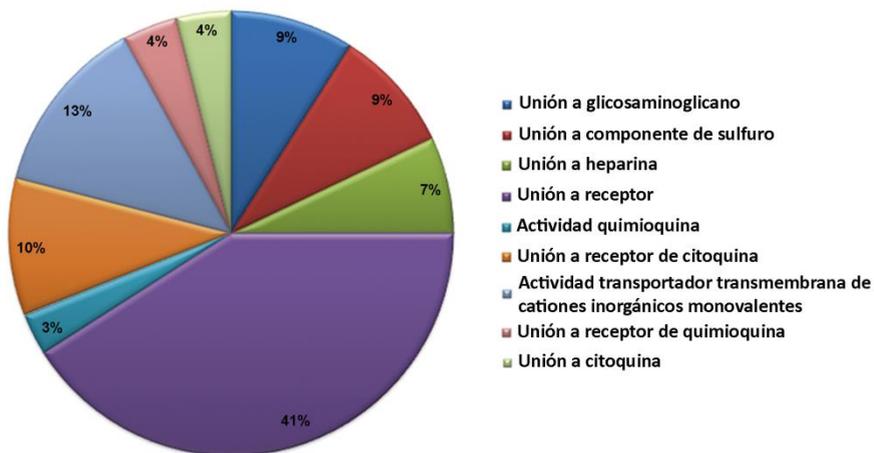
*Hierarchical clustering* que claramente identificó y separó los dos grupos de estudio, MCD y CNT, en dos perfiles de expresión génica diferentes (Figura 16).



**Figura 16.** Heat map con *Hierarchical clustering* representando el perfil de expresión génica de canales iónicos en la MCD. 34 genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría de canales iónicos en pacientes con MCD comparados con el grupo CNT. La barra de colores representa el nivel de expresión relativa de cada gen, azul indica menor expresión y amarillo mayor expresión. CNT, control; MCD, miocardiopatía dilatada.

### 3.3. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE GENES ALTERADOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

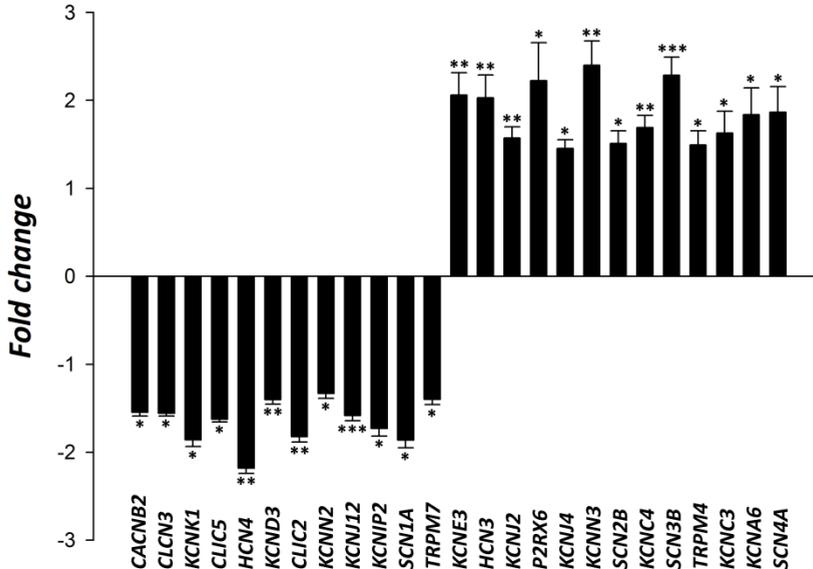
Utilizamos la herramienta *ToppGene suite* para determinar las categorías de ontología génica (términos GO) que abarcan los genes diferencialmente expresados en los pacientes con MCD. Analizamos los términos GO en la categoría de Función Molecular para averiguar las principales funciones biológicas en las que se encuentran clasificados los genes alterados. Este análisis mostró que había genes alterados implicados en la actividad de CI. En concreto, la segunda categoría funcional más relevante estuvo relacionada con la función de los CI, representando el 13% del total de categorías (Figura 17).



**Figura 17.** Representación esquemática de los resultados de *ToppGene suite* de las principales categorías en las que se engloban los genes diferencialmente expresados en la miocardiopatía dilatada.

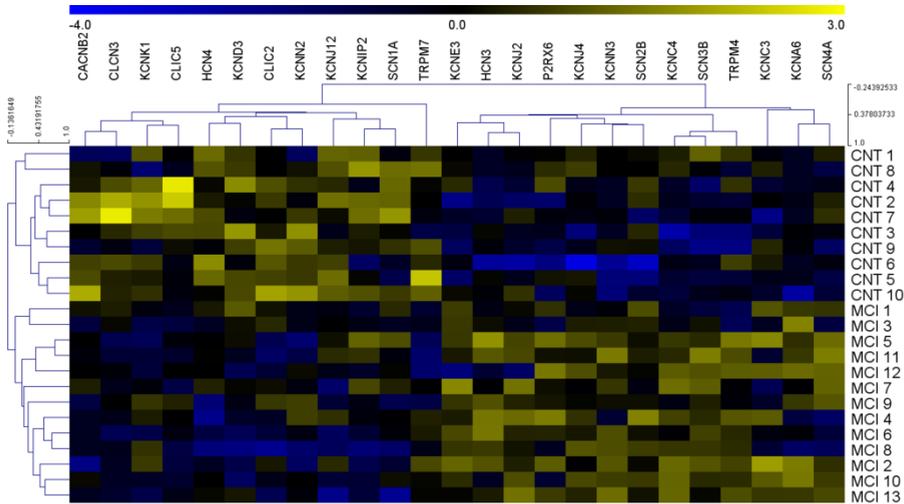
### 3.4. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DE ARN EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Realizamos un análisis transcriptómico a gran escala mediante RNA-seq en el cual identificamos un total de 1.712 genes diferencialmente expresados, de los cuales 815 estaban sobre-expresados y 897 mostraron una expresión reducida, en pacientes con MCI comparados con el grupo CNT (valor mínimo de *fold change* de 1,3 con un p valor <0,05). De entre estos genes, nos centramos en el análisis del perfil de expresión génica de CI cardíacos, y encontramos que 25 genes estaban diferencialmente expresados, de los cuales 13 presentaban una expresión aumentada y 12 una expresión reducida, en pacientes con MCI comparados con el grupo CNT (Figura 18).



**Figura 18.** Genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría de canales iónicos en la MCI comparados con el grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 1. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de valores de expresión relativa del ARNm. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001. vs. grupo CNT. CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica.

Para visualizar los perfiles de expresión génica de pacientes con MCI y el grupo CNT, elaboramos un *Heat map* y *Hierarchical clustering* en el cual se diferenció claramente entre ambos grupos. (Figura 19).



**Figura 19.** *Heat map* con *Hierarchical clustering* representando el perfil de expresión génica de canales iónicos en la MCI. 25 genes diferencialmente expresados correspondientes a la categoría de canales iónicos en pacientes con MCI comparados con el grupo CNT. La barra de colores representa el nivel de expresión relativa de cada gen, azul indica menor expresión y amarillo mayor expresión. CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica.

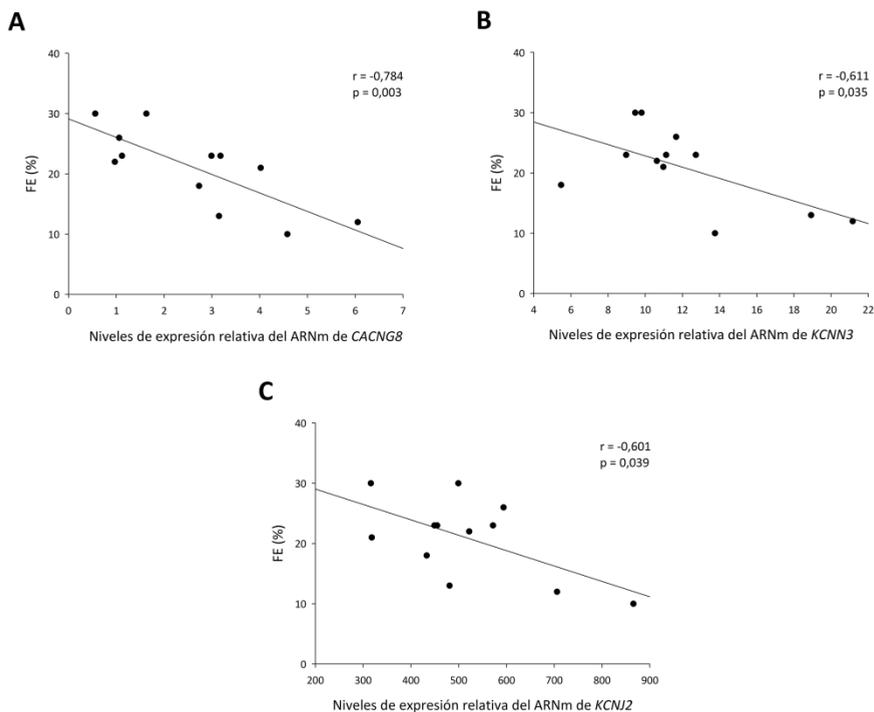
De los 25 genes alterados, 23 estuvieron diferencialmente expresados en ambas cardiopatías, MCD y MCI, mientras que 11 presentaban expresión génica diferencial respecto al grupo CNT sólo en la MCD, y 2 estaban alterados únicamente en la MCI.

### 3.5. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL DE GENES ALTERADOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA

De la misma forma que hicimos con los genes diferencialmente expresados en la MCD, también utilizamos la herramienta *TopGene suite* para determinar las categorías funcionales en las que se englobaban los genes diferencialmente expresados en los pacientes con MCI. En este análisis, no obtuvimos una categoría funcional que abarcara al conjunto de genes codificantes de CI, lo que podría deberse a que el número de genes alterados de CI es reducido respecto al total de genes diferencialmente expresados en esta miocardiopatía.

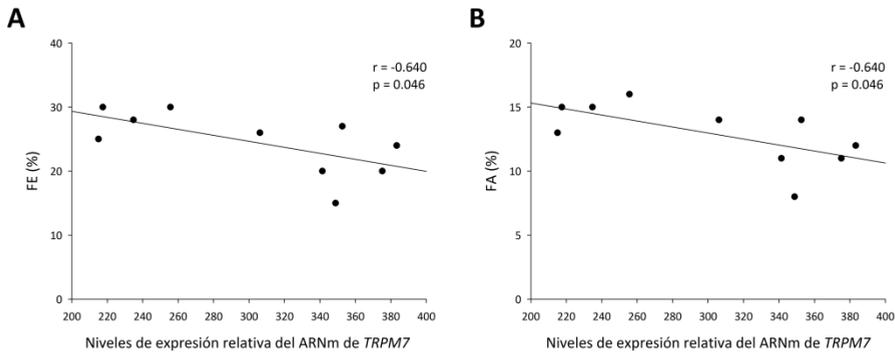
### 3.6. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS CANALES IÓNICOS CARDÍACOS Y LOS PARÁMETROS DE FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO

Quisimos determinar si existía alguna relación lineal entre los genes de CI diferencialmente expresados y los parámetros ecocardiográficos de los pacientes estudiados. De los 13 pacientes con MCD, disponíamos de datos de parámetros ecocardiográficos de 12 pacientes. Encontramos que el gen de calcio *CACNG8* y los genes de potasio *KCNN3* y *KCNJ2* presentaban una buena e inversa relación con la FE del VI ( $r=-0,784$ ,  $p=0,003$ ;  $r=-0,611$ ,  $p=0,035$ ;  $r=-0,601$ ,  $p=0,039$ , respectivamente) (Figura 20).



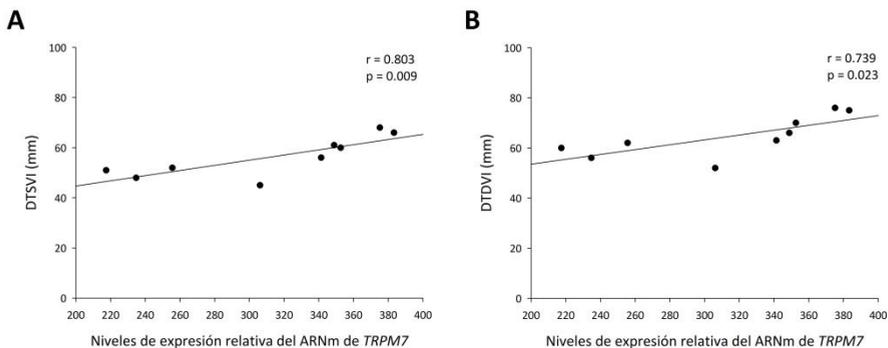
**Figura 20.** Relación entre los genes *CACNG8* (A), *KCNN3* (B) y *KCNJ2* (C) y la FE del ventrículo izquierdo en pacientes con MCD. FE, fracción de eyección; MCD, miocardiopatía dilatada.

Por otro lado, analizamos las posibles relaciones entre los genes alterados en la MCI con los diferentes parámetros de función ventricular. De los 13 pacientes, disponíamos de datos ecocardiográficos de 10 pacientes. De los 25 genes diferencialmente expresados, el gen *TRPM7* mostró una relación inversa con la FE ( $r=-0,640$ ,  $p=0,046$ ) y la FA ( $r=-0,640$ ,  $p=0,046$ ) (Figura 21).



**Figura 21.** Relación entre el gen *TRPM7* y la FE (A) y FA (B) del ventrículo izquierdo en pacientes con MCI. FA, fracción de acortamiento; FE, fracción de eyección; MCI, miocardiopatía isquémica.

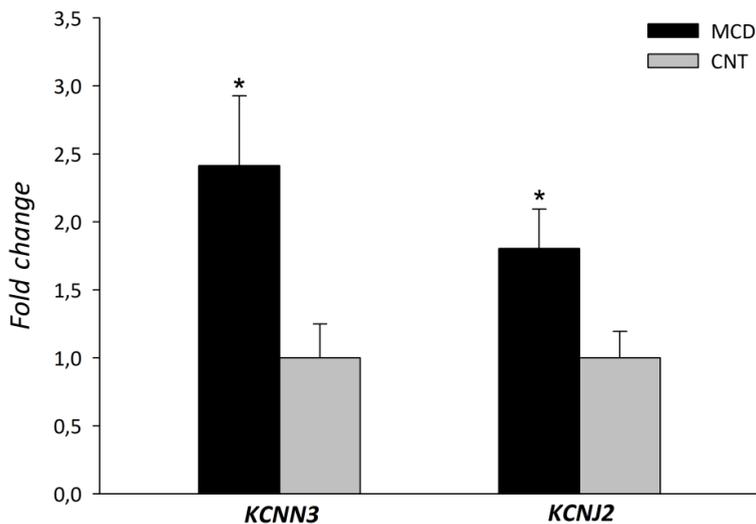
Además, *TRPM7* mostró también relaciones directas y significativas con el DTSVI ( $r=0,803$ ,  $p=0,009$ ) y el DTDVI ( $r=0,739$ ,  $p=0,023$ ) (Figura 22).



**Figura 22.** Relación entre el gen *TRPM7* y el DTSVI (A) y DTDVI (B) en pacientes con MCI. DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; MCI, miocardiopatía isquémica.

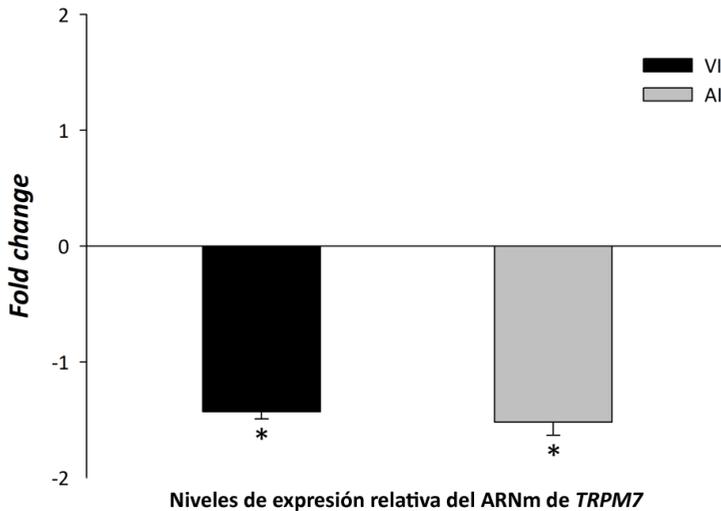
### 3.7. VALIDACIÓN POR RT-qPCR DE LOS GENES RELACIONADOS CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR

Llevamos a cabo la validación por RT-qPCR de la expresión génica de los canales *CACNG8*, *KCNN3* y *KCNJ2* en muestras de VI de pacientes con MCD. Observamos un aumento significativo del ARNm de *KCNN3* y *KCNJ2* (*fold change* 2,41,  $p < 0,05$ ; *fold change* 1,81,  $p < 0,05$ , respectivamente), lo que validó los resultados obtenidos previamente mediante RNA-seq (Figura 23). Sin embargo, no pudimos analizar los resultados de los experimentos de validación del gen codificante del canal de calcio *CACNG8* a causa de la reducida expresión basal que mostró este gen.



**Figura 23.** RT-qPCR de los genes *KCNN3* y *KCNJ2* en muestras de VI de pacientes con MCD; los valores del grupo CNT se han establecido en 1. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de valores de expresión relativa del ARNm. \* $p < 0,05$  vs. grupo CNT. VI, ventrículo izquierdo; MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control.

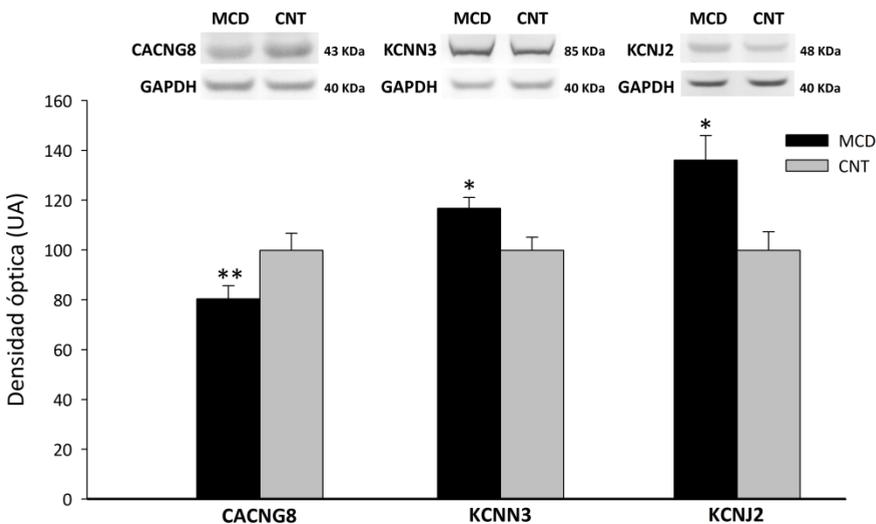
Validamos también la expresión génica de *TRPM7* en muestras de ventrículo (n=14) y aurícula (n=14) izquierdos de pacientes con MCI, con el fin de observar si existe una expresión diferencial en ambas cámaras cardíacas. Los resultados mostraron que existe una disminución de la expresión de este gen tanto en aurícula (*fold change* -1,52,  $p < 0,05$ ) como en ventrículo (*fold change* -1,43,  $p < 0,05$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** RT-qPCR del gen *TRPM7* en muestras de VI y AI de pacientes con MCI; los valores del grupo CNT se han establecido en 1. Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de valores de expresión relativa del ARNm. \* $p < 0,05$ , vs. grupo CNT. VI, ventrículo izquierdo; AI, aurícula izquierda; MCI, miocardiopatía isquémica; CNT, control.

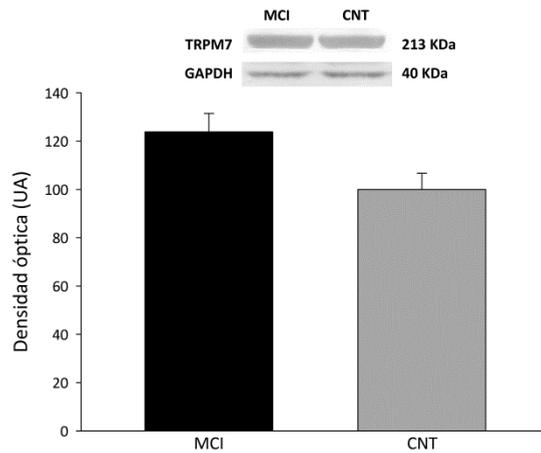
3.8. ANÁLISIS PROTEICO DE LOS CANALES IÓNICOS RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO

Debido a la relación encontrada entre los genes *CACNG8*, *KCNN3* y *KCNJ2* con la función del VI, analizamos estos canales a nivel proteico y encontramos que la expresión de *CACNG8* se encuentra reducida en los pacientes con MCD respecto al grupo CNT ( $80 \pm 23$  vs.  $100 \pm 21$  UA,  $p < 0,01$ ). Respecto a los canales de potasio *KCNN3* y *KCNJ2*, observamos que su expresión es mayor en los pacientes con MCD comparándola con el grupo CNT ( $117 \pm 17$  vs.  $100 \pm 16$  UA,  $p < 0,05$ ;  $136 \pm 44$  vs.  $100 \pm 20$  UA,  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 25). Todos estos resultados de Western blot tuvieron la misma tendencia de expresión proteica que la hallada en las alteraciones de expresión génica.

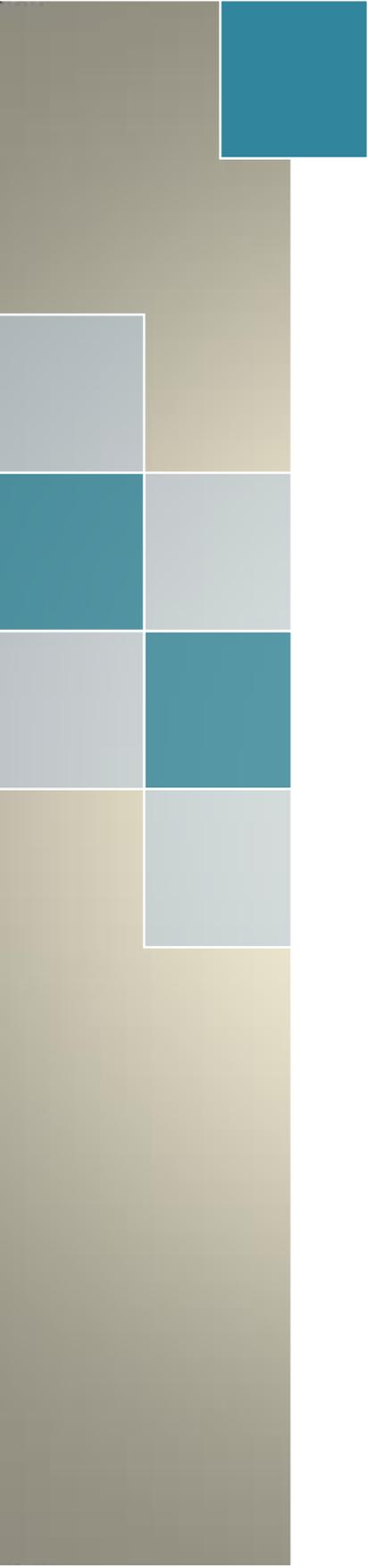


**Figura 25.** Niveles proteicos de *CACNG8*, *KCNN3* y *KCNJ2* en pacientes con MCD comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. grupo CNT. CNT, control; MCD, miocardiopatía dilatada; UA, unidades arbitrarias.

A causa de la relación de *TRPM7* con la función del VI en la MCI, analizamos su expresión proteica mediante Western blot y encontramos que esta proteína no estaba diferencialmente expresada en los pacientes con MCI respecto al grupo CNT ( $123 \pm 32$  vs.  $100 \pm 19$  UA,  $p > 0,05$ ) (Figura 26).



**Figura 26.** Niveles proteicos de TRPM7 en pacientes con MCI comparados con el grupo CNT. Los valores se han normalizado a GAPDH y finalmente al grupo CNT; los valores del grupo CNT se han establecido en 100. Los datos están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) en UA de densidad óptica. CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica; UA, unidades arbitrarias.



# V. DISCUSIÓN



## **1. ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE RESPUESTA A ESTRÉS Y ESTRUCTURALES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA**

El presente estudio proporciona nuevos datos sobre el proceso de estrés del RE que ocurre en pacientes con IC (82, 85), englobando no sólo las alteraciones que se producen en las proteínas implicadas en la respuesta a estrés, sino también las producidas en las proteínas que conforman la estructura de este orgánulo.

Hemos determinado los niveles de las principales proteínas implicadas en estas funciones en muestras de tejido cardíaco de pacientes con IC de origen dilatado e isquémico. Nuestros resultados muestran que existe un incremento general de estas proteínas en ambos grupos patológicos con algunas diferencias entre etiologías. Por otro lado, las imágenes de inmunofluorescencia mostraron una mayor intensidad en las muestras de pacientes con MCD y MCI comparadas con el grupo CNT, coincidiendo con lo observado en la cuantificación de los niveles proteicos.

En el proceso de estrés del RE se produce una activación de la ruta UPR con el fin de restablecer su homeostasis. Esta respuesta adaptativa desencadena la activación de 3 rutas de señalización que incluyen la inducción transcripcional de chaperonas del RE y de enzimas encargados del plegamiento, la activación transcripcional de genes que codifican los componentes asociados a la degradación del RE y la atenuación de la transcripción general. Sin embargo, si el estrés del RE se prolonga o aumenta, se induce la apoptosis para eliminar las células dañadas (170).

En estas rutas, tres sensores transmembrana del RE (IRE1, PERK y ATF6) inician la respuesta para dirigir a las proteínas mal plegadas, mediante la activación de los factores de transcripción XBP1, ATF6, ATF4 y eIF2 $\alpha$ , los cuales median la inducción de respuesta a estrés (171). GRP78 es una chaperona del RE que se considera un marcador de estrés del RE (79, 86). En ausencia de estrés, esta chaperona se encuentra unida a IRE1, PERK y ATF6 manteniéndolas en un estado inactivo. Sin embargo, cuando se da una situación de estrés, GRP78 se disocia de estas proteínas permitiendo su oligomerización para constituir la forma activa y desencadenando la cascada de señalización UPR (65, 68).

Nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de esta chaperona tanto en los pacientes con MCD como en los pacientes con MCI en comparación con el grupo CNT, en presencia de una disminución en la proteína IRE1, especialmente en los pacientes con MCI, como se discute más adelante. Numerosos estudios muestran una sobre-expresión GRP78 en modelos animales de IC (79, 80, 172). Estudios sobre MCD humana demuestran también aumentos en los niveles de esta proteína (62). Además, se ha propuesto como diana terapéutica para la reducción de los efectos del estrés del RE (173). Por lo tanto, podemos inferir que en la IC, el aumento proteico de esta proteína puede ser una consecuencia de la activación de la respuesta UPR en presencia del estrés del RE.

IRE1 es una proteína transmembrana serina/treonina kinasa activada por disociación de GRP78 y fosforilación. Es el sensor fundamental de estrés del RE que inhibe la síntesis proteica. Su actividad endonucleasa se encarga de escindir de forma específica una isoforma alternativa de *splicing* que codifica el ARNm de *XBP1* (174, 175). Este factor de transcripción activa a

genes implicados en la respuesta a estrés del RE. IRE1 ha mostrado niveles reducidos en los pacientes con MCI, y hemos observado la misma tendencia en el grupo con MCD. También analizamos los niveles de la forma activa de IRE1, p-IRE1, y encontramos que esta proteína se encontraba aumentada en los pacientes con MCD, observándose la misma tendencia en los pacientes con MCI. Además, la proteína XBP1 mostró un aumento significativo en ambos grupos patológicos. Los niveles reducidos observados en IRE1 y los niveles incrementados de p-IRE1 son concordantes con la activación de esta respuesta a estrés, ya que ello no implica necesariamente un aumento de los niveles proteicos sino que la activación es posible mediante la dimerización y autofosforilación de esta proteína (70). El aumento de XBP1 ha sido observado en otros estudios en los cuales se analizan los efectos hipóxicos en cultivos de cardiomiocitos de ratón (85). Todos estos resultados son consistentes con la activación de XBP1 en la respuesta UPR para lograr el aumento de la transcripción de genes de respuesta a estrés del RE.

ATF6 es una proteína de señalización transmembrana del RE que junto a IRE1 y PERK constituyen los principales sensores de proteínas mal plegadas del RE. Se activa por disociación de GRP78 y por su translocación al aparato de Golgi y al núcleo (171). Es responsable de la regulación transcripcional de genes que estimulan la supervivencia después de un proceso de estrés del RE, mediante la inducción de la expresión de genes de respuesta a estrés (176, 177). Encontramos que ATF6 presentaba niveles aumentados en ambas patologías, demostrando que esta ruta es altamente importante para la activación de la respuesta a estrés en la IC. Todos estos resultados evidencian la fuerte activación del mecanismo UPR en los

---

pacientes con IC que implica alteraciones en los niveles de la mayoría de proteínas de estrés del RE.

A causa del proceso de estrés del RE, es probable que se produzcan modificaciones en la estructura y forma del RE en pacientes con IC. Los reticulones son una familia de proteínas cuya principal función es la estabilización de la curvatura de los túbulos del RE (178). En este trabajo hemos analizado tres miembros de esta familia, Reticulón 1 y dos isoformas de Reticulón 4 (Nogo A y Nogo B). Encontramos niveles reducidos de la proteína Reticulón 1 en pacientes con MCD, mientras que ambas isoformas de Reticulón 4 tenían niveles aumentados. Voeltz *et al.* estudiaron el efecto de la modificación de la expresión de los reticulones *in vitro* y encontraron que la reducción de niveles proteicos de Reticulón 1 bajo condiciones de estrés produce cambios en el RE periférico a través de la formación de láminas membranosas. Además, cuando los reticulones presentan niveles proteicos aumentados, se produce un incremento de la formación de túbulos (43). Estos cambios en los niveles proteicos de los reticulones pueden alterar la estabilización de la curvatura del RE, confiriéndole una estructura diferente. Sin embargo, en ningún estudio se ha examinado esta relación en enfermedades cardíacas. En este trabajo, los resultados obtenidos sugieren que las funciones vitales que ejerce el RE podrían estar afectadas por su integridad estructural.

Otras proteínas estructurales analizadas fueron RRBP1 (también conocida como p180), kinectina y CKAP4. Una característica común a todas ellas es que poseen dominios *coiled-coil* que forman puentes en el espacio luminal (es el caso de CKAP4) y dan forma a la estructura externa del RE (como RRBP1 y kinectina). Estas proteínas están implicadas en mantener la

morfología y apilar las cisternas, además de participar en las interacciones con el citoesqueleto (179). RRBP1 y kinectina son proteínas integrales de membrana del RE. La primera tiene un papel relevante en el ensamblaje de polisomas y, por tanto, en la biosíntesis de proteínas, así como en la expansión del complejo de Golgi (180); también se la considera un inductor de la biogénesis de membranas (181, 182). La kinectina es un receptor para la kinesina, proteína implicada en el transporte de componentes celulares a través de los microtúbulos (183).

Ambas proteínas, RRBP1 y kinectina, mostraron niveles aumentados en los dos grupos patológicos de estudio. Estos resultados podrían indicar que ocurre un modelado de la estructura del RE como consecuencia de la activación de la respuesta UPR bajo condiciones de estrés. Asimismo, los mayores niveles de RRBP1 pueden estar influyendo sobre la síntesis proteica necesaria en algunas rutas de la respuesta UPR. Además, encontramos una relación directa entre esta proteína y la proteína de respuesta a estrés XBP1 en el grupo con MCD, lo que apunta a la existencia de una relación específica entre estructura y estrés del RE. Igualmente, encontramos una sólida e inversa relación entre RRBP1 y los parámetros de función ventricular FE y FA, relacionados íntimamente con el remodelado ventricular que ocurre en los pacientes con IC. Este remodelado ventricular implica la activación de diferentes rutas, incluyendo la inflamación y la fibrosis, lo que requiere de la síntesis de sus respectivas proteínas implicadas. RRBP1, además de su función en la síntesis proteica antes mencionada, se ha relacionado con el remodelado cardíaco a través del aumento de la síntesis de procolágeno (184), necesaria para el desarrollo

del proceso de fibrosis del remodelado cardíaco que acaba siendo deletéreo.

Por otro lado, hay evidencias que apoyan la hipótesis de que existen modificaciones estructurales bajo condiciones de estrés. Collins *et al.* mostraron la dilatación de las cisternas del RE al inducir estrés en cardiomiocitos aislados (185). Teniendo en cuenta estos hallazgos, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos decir que las alteraciones que se producen en varias moléculas de la respuesta UPR como consecuencia de la respuesta a estrés, pueden influir en la arquitectura del RE y alterar su estructura; vistos los cambios observados en algunas de las proteínas implicadas en la morfología y organización del RE.

En resumen, en este estudio revelamos la existencia de nuevas alteraciones en proteínas relacionadas con la estructura y la respuesta a estrés del RE en la IC. Los pacientes que mostraron mayores niveles de RRBP1, relacionado con la producción de procolágeno, tenían una peor función ventricular. Nuestros resultados muestran una novedosa relación entre estrés y estructura del RE que puede ser útil en la búsqueda de dianas terapéuticas específicas.

---

---

## 2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA. ESTUDIO DE MICROARRAYS

En el presente estudio analizamos el perfil de expresión génica diferencial de genes codificantes de CI mediante microarrays de ADN en tejido de VI de pacientes con MCD comparados con un grupo CNT. Ordog *et al.* estudiaron la expresión génica de algunas subunidades de CI en cardiomiocitos humanos sanos, comparando la aurícula con el ventrículo (186). Sin embargo, no existían estudios que analizaran el nivel de expresión génica de estos CI en un grupo adecuado de pacientes con MCD. Como consecuencia, nos centramos en examinar la expresión a nivel génico de los canales más relevantes para el proceso de contracción del cardiomiocito.

La tecnología de microarrays proporciona un método apropiado para el análisis de la expresión global de genes implicados en enfermedades humanas como la IC, mostrando las alteraciones presentes en los perfiles de expresión génica (187-190). Además, existen numerosos estudios que utilizan este método para examinar los niveles de expresión de genes relacionados con el proceso de contracción de las células musculares (191-193), así como estudios que analizan, en corazones patológicos y sanos, las diferencias entre géneros en cuanto a la expresión génica de moléculas implicadas en electrofisiología (138, 194). La herramienta de clasificación funcional de genes DAVID, resume la principal implicación biológica de estos grupos de genes y permite ordenar amplias listas de genes en grupos funcionalmente relacionados adjudicando una puntuación de enriquecimiento.

Una alteración a nivel génico de los CI cardíacos puede producir un desequilibrio entre los flujos de los diferentes iones implicados en el proceso de contracción del cardiomiocito. Debido a que en la MCD se produce un deterioro de la capacidad de contracción cardíaca (134, 195), nos propusimos estudiar las alteraciones en el perfil de expresión génica de los principales CI cardíacos. Los resultados mostraron que siete de estos canales estaban alterados en estos pacientes. El canal de sodio *SCN2B* estaba sobre-expresado, mientras que los canales de potasio *KCNJ5* y *KCNJ8*, los canales de cloro *CLIC2* y *CLCN3* y los canales de calcio *CACNA1C* y *CACNB2* mostraron una expresión reducida. Estos resultados fueron posteriormente validados por RT-qPCR, excepto los genes *CACNA1C* y *CLCN3* que, aunque disminuyeron su expresión, no fueron estadísticamente significativos. El hecho de que estos dos genes no se hayan validado podría ser a causa de la alta variabilidad que existe en la MCD (23, 196), o bien podría deberse a la sensibilidad de la técnica.

El gen *SCN2B* fue el único gen sobreexpresado en este análisis en la MCD. Este canal de sodio constituye la subunidad  $\beta$  del canal dependiente de voltaje específico de corazón *SCN5A*, el cual es responsable del inicio del potencial de acción en el cardiomiocito (197). La subunidad  $\alpha$  codificada por *SCN5A* forma el poro del canal, mientras que dos subunidades auxiliares  $\beta$  ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) modulan la apertura del canal y los niveles de expresión en la superficie celular, además interactúan con la matriz extracelular y con las moléculas de adhesión. Estas subunidades accesorias juegan un papel clave en la regulación del potencial de acción (198, 199). Por lo tanto, la expresión diferencial en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  puede estar contribuyendo a las alteraciones en los flujos de iones de sodio en la IC. No existe un

consenso acerca de si se produce un incremento o una disminución en la corriente de sodio en este síndrome. Algunos estudios muestran una reducción de la corriente de sodio producida por la subunidad que constituye el poro SCN5A (139, 200, 201), mientras que otros autores evidencian un aumento de dicha corriente (202, 203) en modelos de IC. Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión génica del canal *SCN2B* pero una tendencia decreciente a nivel proteico, no significativa. Esta tendencia hacia niveles reducidos de la proteína se ha observado también en otros estudios, aunque no se evaluó la expresión génica de este canal (139). Posiblemente, las diferencias entre estas expresiones podrían explicarse por la existencia de mecanismos de control como las modificaciones post-traduccionales o por sistemas de degradación proteica que actúan en la MCD.

Los canales de potasio *KCNJ5* y *KCNJ8* mostraron una expresión reducida en los pacientes con MCD, mientras que la proteína Kir 3.4 (codificada por el gen *KCNJ5*) no mostró variaciones. Esta observación podría explicarse por mecanismos de regulación de esta proteína que podrían ser necesarios para la correcta homeostasis de los niveles de *KCNJ5* y controlar su efecto y actividad en las células, incluyendo posibles modificaciones post-transcripcionales. La proteína Kir 3.4 puede formar tanto homodímeros como heterodímeros, y se activa a través de varios receptores acoplados a proteínas G que modulan la apertura del complejo del canal (204). Existen estudios que confirman la importancia de Kir 3.4 para la formación de un canal de potasio funcional (205). La proteína Kir 8.1, codificada por el gen *KCNJ8*, forma un heterodímero con la subunidad Kir 6.2, estableciendo un complejo de canal completo (206). En ratones

---

*knockout* para el gen *KCNJ8*, se observó un deterioro progresivo del gasto cardíaco (207). Teniendo en cuenta las funciones de estos canales, parece que una disminución de uno o ambos en los pacientes con MCD, podría estar afectando a la corriente de  $K^+$  rectificadora de entrada a través de la membrana plasmática del cardiomiocito, provocando una alteración en el proceso de excitación-contracción, y, como consecuencia, disminuyendo la capacidad del corazón para contraerse adecuadamente.

El gen *CLIC2* codifica una proteína que pertenece a la familia estructural de glutatión transferasas ubicuas. Estas proteínas son capaces de transportarse desde la fase acuosa hacia la membrana de fosfolípidos, donde ejercen su función como CI (208). Hay estudios que proponen la existencia de una función regulatoria de este canal sobre el canal receptor de rianodina cardíaco RYR2 (209, 210). *RYR2* codifica para un canal de  $Ca^{2+}$  anclado en la membrana del RE de los cardiomiocitos que desencadena la liberación de  $Ca^{2+}$  al citoplasma durante el proceso de contracción. *CLIC2* actúa como un inhibidor de RYR2 mediante su unión directa, impidiendo así la liberación de  $Ca^{2+}$  cuando la célula está en reposo, con lo que favorece la presencia de bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$  durante la diástole (209, 211). Takano *et al.* identificaron una mutación en *CLIC2* que provocaba defectos en la función cardíaca dependientes de la actividad del canal RYR2 (212). Este fallo al inhibir RYR2, y el consecuente aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplásmico a causa de la reducción de la expresión de *CLIC2*, podrían alterar el proceso de relajación del cardiomiocito y, como consecuencia, explicar este desacople en el proceso contráctil que se produce en la MCD.

Nuestros resultados mostraron una expresión reducida del canal de calcio *CACNB2*, mientras que la expresión de *CACNA1C* no estuvo alterada.

---

El canal de calcio codificado por el gen *CACNB2* es una proteína guanilato kinasa asociada a membrana (MAGUK) que forma la subunidad  $\beta$  del canal tipo L de calcio *CACNA1C*. Los canales tipo L de calcio permiten el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma y son muy relevantes para el control de la excitabilidad cardíaca y el acoplamiento entre excitación-contracción (197). La subunidad que forma el poro contiene el sensor dependiente de voltaje y está codificada por el gen *CACNA1C*, aunque su expresión y propiedades funcionales están reguladas por subunidades auxiliares como  $\beta_2$  (213, 214). De hecho, Yamaguchi *et al.* demostraron que la subunidad  $\beta_2$  aumenta la densidad de canales y facilita su apertura (214). Este papel tan importante de las subunidades  $\beta_2$  en el canal de calcio se ha hecho evidente por su implicación en enfermedades cardiovasculares severas, como el síndrome QT corto o el síndrome de Brugada (136, 215). Diversos grupos han mostrado que la presencia de mutaciones en genes que codifican para subunidades auxiliares  $\beta_2$  y subunidades que forman el poro del canal están relacionadas con esta patología. La expresión reducida observada en el gen *CACNB2* podría no estar inactivando de manera adecuada la corriente a través del poro formado por la subunidad que codifica *CACNA1C*, alterando de este modo la concentración óptima de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma para permitir el acoplamiento entre excitación-contracción del músculo cardíaco.

El perfil de expresión génica de los canales cardíacos analizados en este trabajo muestra una expresión reducida general de todos los tipos de canales estudiados, a excepción del gen de canal de sodio *SCN2B* que se encuentra sobre-expresado. Esta observación podría explicar el proceso patológico que ocurre en los pacientes con MCD, donde existe un deterioro

de la capacidad contráctil del corazón. Como se ha mencionado anteriormente, aunque no encontramos diferencias significativas en la proteína de *SCN2B*, la alteración a nivel génico podría estar afectando a la corriente de sodio. Por lo tanto, sería de interés llevar a cabo futuros análisis de expresión proteica para discernir si existe algún mecanismo de regulación en estas proteínas de CI relacionado con las implicaciones clínicas de los pacientes con MCD.

La presencia de una expresión génica disminuida en los canales de potasio *KCNJ5* y *KCNJ8* provoca la alteración de la corriente de potasio; así como la reducción del ARNm de *CACNB2* y *CLIC2* llevaría a un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma, sugiriendo que existe una alteración en el acortamiento de las fibras del cardiomiocito y en la relajación en la MCD lo que compromete la contractilidad global del corazón.

Además, el canal de sodio *SCN2B* se encuentra funcionalmente acoplado a *CACNB2*. Se ha visto que una mutación en *CACNB2b*, otra subunidad auxiliar  $\beta$  del canal de calcio, junto con una mutación en *SCN5A*, lleva a enfermedad de conducción cardíaca (216). De igual manera, hay otros estudios que establecen relaciones entre CI mediante la observación de complejos de interacción entre las subunidades cardíacas de los canales de sodio y de potasio transitorios mediante experimentos de coinmunoprecipitación (217).

En el análisis de redes funcionales realizado mediante la herramienta IPA, encontramos dos redes que conectan diferentes familias de CI. En la red que englobó más genes alterados, *CACNB2* mostró interacciones con la

familia génica *CACN* que comprende a *CACNA1A*, *CACNA1C*, *CACNA1F*, *CACNA1S* y *CACNB4*, que se encargan de formar CI funcionales (218, 219). *CACNB2* también interacciona con otros miembros de su familia génica (genes *CACNB1-4*) que codifican proteínas MAGUK y que funcionan como subunidades auxiliares  $\beta$  para el ensamblaje y regulación de la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (220). Finalmente, *CACNB2* también se encuentra asociado con el regulador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  *RIM1* (221), y con el canal de sodio *SCN2B*, a través de su interacción con *CACNA1B*, ya que se ha descrito que una mutación en *CACNB2b*, y una mutación en *SCN5A*, lleva a un defecto en la conducción cardíaca, como se ha mencionado previamente (216). Los genes de canales de potasio *KCNJ5* y *KCNJ8* interaccionan con algunos de los 17 miembros de la familia *KCNJ* de canales de potasio rectificadores de entrada, incluyendo a *KCNJ3*, *KCNJ6*, *KCNJ9* y *KCNJ11*.

Otra red mostrada por el análisis de IPA evidenció el papel de *CLIC2* como inhibidor de *RYR1* y *RYR2*, que funcionan como canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE (222). Además, *CLIC2* está relacionado con *TRAPCC2*, que está implicado en el transporte de vesículas desde el RE hacia el aparato de Golgi (223). Finalmente, el sistema de ubiquitinación está relacionado con *CLIC2* mediante *NEDD4*, *NEDD4L* y *UBC* (ubiquitina C), los cuales regulan la interacción entre las neuronas motoras y el músculo (224) o la corriente producida por los CI (225-227).

Todos estos datos en los que se relacionan los diferentes CI revelan la existencia de una comunicación entre ellos, donde una mínima alteración puede provocar un daño general en el funcionamiento del corazón, afectando al proceso de acoplamiento entre excitación-contracción. Nuestros resultados muestran la presencia de alteraciones a nivel génico en

canales implicados en las corrientes de sodio, potasio, cloro y calcio en el corazón, en pacientes con MCD. Estos cambios en la expresión podrían estar modificando las corrientes iónicas, alterando así la función contráctil cardíaca.

---

---

### 3. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DE ARN

Hemos llevado a cabo un análisis global del transcriptoma mediante la técnica de RNA-seq para determinar el número de genes diferencialmente expresados en un grupo de pacientes con IC y sujetos CNT y compararlos entre sí. Entre el total de genes analizados, identificamos algunos pertenecientes a la categoría de CI, implicados en la contracción cardíaca. Esta técnica, frente a la técnica de microarrays, nos permitió identificar un gran número de genes diferencialmente expresados a nivel global (2.189 genes adicionales) y también genes alterados codificantes de CI (21 genes adicionales) en comparación con los que se obtuvieron en el análisis previo mediante microarrays llevado a cabo en la MCD. El análisis por RNA-seq proporciona un mayor nivel de profundidad y sensibilidad (228), además nos ha revelado la presencia de resultados consistentes entre los conjuntos de datos de ambas técnicas.

Algunos de los genes alterados podrían tener una mayor importancia en la disfunción cardíaca. En el análisis por microarrays previo determinamos la existencia de una expresión alterada del ARNm de los genes *CACNA1C* y *CACNB2* en la MCD. En este nuevo análisis, más exhaustivo, hemos visto que el gen *CACNB2* se encuentra también alterado en la MCI. Además, observamos que el gen *CACNG8* y la proteína que codifica se encuentran reducidos en la MCD, y en la MCI se observa la misma tendencia estadística. *CACNG8* es también una subunidad de los canales de calcio tipo L que se encuentran directamente implicados en la contracción cardíaca. Está implicado en la regulación de la apertura y cierre

---

del canal, participando en mantener un estado inactivo (cerrado) del poro del canal (229). Esta función podría verse reducida cuando se produce una disminución de la expresión de este canal, provocando una apertura prolongada del canal de calcio. Además, nuestros resultados sugieren la presencia de una fuerte relación inversa de este gen con la función ventricular, por lo que la expresión reducida de *CACNG8* podría deberse a un mecanismo de regulación puesto en marcha para restaurar la función de contracción y relajación en la MCD.

Los canales de cloro *CLCN3*, *CLIC2*, *CLIC3* y *CLIC5* son responsables de la repolarización de la célula para dejar paso a la relajación. *CLCN3* y *CLIC2* mostraron una expresión reducida en los pacientes con MCD (ya observada previamente en nuestro análisis por microarrays) y MCI, como se ha observado anteriormente en un *knockout* para *CLCN3* de ratón (230), así como se mostró que tenía un papel protector cuando se provoca su sobre-expresión (231). El papel de *CLIC2* en la modificación de la actividad de *RYR2*, (209) refuerza las implicaciones que tienen las alteraciones de estos canales en el desarrollo de la IC. A la inversa, *CLIC3* mostró niveles de ARNm aumentados en los pacientes con MCD y la misma tendencia, aunque no estadísticamente significativa, observamos en los pacientes con MCI. No existen apenas estudios en corazón sobre el canal de cloro *CLIC3*, aunque su sobre-expresión se ha asociado a desórdenes patológicos (232). Concretamente, respecto al análisis en corazón, hay un estudio en pacientes con MCD en el cual se muestra una sobre-expresión de este gen en pacientes con MCD y taquicardias ventriculares (233), sugiriendo que este gen podría ser un determinante de estas alteraciones en el ritmo cardíaco. Por otro lado, hemos encontrado que el gen *CLIC5* presenta una

---

expresión reducida en ambas patologías. Aunque no existen estudios llevados a cabo en muestras cardíacas, se ha establecido como posible marcador genético de respuesta a fármacos antihipertensivos en estudios de asociación genómica a gran escala (234), además se ha visto que se requiere para el mantenimiento del metabolismo energético (235). Estos canales de cloro participan en funciones esenciales para la correcta repolarización cardíaca, de manera que los niveles reducidos de *CLCN3* y *CLIC2* podrían estar intentando compensar el aumento en la expresión de genes menos estudiados de canales de cloro como *CLIC3* y *CLIC5*, con el fin de restablecer el proceso de contracción-relajación en la IC.

*HCN3* y *HCN4* pertenecen a una clase de canales de cationes unidos a nucleótidos cíclicos y activados por hiperpolarización ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) que son responsables de las corrientes  $I_f$  con baja activación y altamente estimuladas por AMPc. Se han relacionado con el inicio del ritmo cardíaco y con la progresión de arritmias ventriculares en la hipertrofia e IC, contribuyendo a la despolarización diastólica (236). *HCN4* está sobre-expresado en la IC (237, 238). Menos se sabe acerca de la expresión de *HCN3* en la IC, aunque diversos estudios apuntan a un papel de este canal, junto con el resto de canales HCN, en la regulación del potencial de acción ventricular (239, 240). Por otro lado, se ha observado que el aumento de la corriente  $I_f$  contribuye a la formación de un ritmo ectópico, a la actividad celular espontánea y a un marcado aumento de la duración del potencial de acción (237). En nuestro análisis mediante RNA-seq, hemos detectado niveles reducidos del ARNm de *HCN4* en corazones con MCD y MCI, así como la sobre-expresión de *HCN3* en ambas cardiopatías. Estos resultados podrían proporcionar más evidencias sobre la alteración de la corriente  $I_f$  en

---

pacientes con IC, que depende de la familia HCN y cuyos cambios influyen directamente en la onda del potencial de acción.

Los canales de potasio constituyen la clase más abundante entre el conjunto de CI y son responsables de un gran número de corrientes iónicas que actúan en la contracción cardíaca. Además, en este estudio han sido la categoría con mayor número de genes diferencialmente expresados, evidenciando la importancia de estos canales en la fisiopatología de la IC. Se han descrito numerosas asociaciones entre ellos basadas en la regulación que ejercen las subunidades accesorias sobre la modificación de funciones tales como la expresión en superficie y vida media, la selectividad iónica, las propiedades de apertura y cierre o la regulación química y la mediada por mensajeros secundarios (241). Un ejemplo sería el de la familia MirP (codificada por los genes *KCNE2-5*) que regula estas propiedades de varias subunidades  $\alpha$  (que forman el poro del canal) implicadas en la conducción de diferentes corrientes de potasio (242-244). Encontramos que el gen *KCNE3* está aumentado en los pacientes con MCD y MCI. En el estudio de Radicke *et al.* en 5 pacientes con IC no encontraron diferencias significativas en la expresión de este gen, lo que podría deberse al reducido tamaño muestral usado en el análisis (245). A su vez, el producto de *KCNE3* (MiRP2) se asocia también con el canal codificado por *KCNC4*, aumentado en ambas patologías en nuestro análisis, cuya función conjunta es establecer el potencial en reposo en las células musculares (244).

Las subunidades auxiliares codificadas por *KCNE3*, *KCNE4*, *KCNIP2* y *KCNAB1* regulan la corriente  $I_{to}$ , de la cual son responsables los productos de *KCND3*, *KCNC4* y *KCNA4*. (246-252). Estos canales son determinantes importantes en la repolarización ventricular (109). Muchos estudios han

descrito la existencia de una prolongación del potencial de acción en la IC como consecuencia de una reducción en la corriente  $I_{to}$  (253, 254). Kaab *et al.* (148) y Walmsley *et al.* (194) observaron que el gen *KCND3* mostraba una expresión reducida en pacientes con IC, asociando este hecho a una reducción en la densidad del pico de la corriente  $I_{to}$ . Se encontraron resultados similares en ratones deficientes para *KCNIP2*, que mostraron una inactivación de esta corriente (255).

Otro determinante importante de la corriente iónica  $I_{to}$  es *KCNA4* que codifica para una subunidad que está regulada por *KCNAB1* y puede asociarse con *KCNA6* para modular sus propiedades biofísicas (256). *KCNE4*, *KCNIP2* y *KCND3* presentan una expresión reducida en la IC, como han demostrado diversos autores en modelos animales y en humanos (148, 194, 245, 257, 258) y *KCNA4* está sobre-expresado (259), siendo nuestros hallazgos coincidentes con estudios previos. Hemos encontrado expresiones diferenciales en la mayoría de los canales que forman la subunidad principal responsable de la corriente  $I_{to}$  y en sus subunidades accesorias, algunos de ellos no analizados previamente en la IC. Las diferentes tendencias en la expresión que hemos observado en estos genes sugieren la existencia de una modulación transcripcional de la expresión de las diferentes subunidades que podrían estar compensando su función entre ellas con el fin de mantener la corriente  $I_{to}$  de potasio en los pacientes con IC.

Previamente, en el análisis por microarrays, hemos estudiado los miembros de la familia *KCNJ*, responsables de la corriente rectificadora de entrada  $I_{K1}$ , encargada de la despolarización inicial y repolarización final del cardiomiocito. La corriente  $I_{K1}$  está reducida en la IC humana, lo que

contribuye a la prolongación del potencial de acción (253). Los genes *KCNJ2* y *KCNJ4* se han encontrado con expresión aumentada en pacientes con IC, y *KCNJ12* con expresión reducida (238, 260), como hemos visto también en nuestro análisis. Estas diferencias en las alteraciones probablemente ocurren para restablecer la reducción de la corriente  $I_{K1}$ . Sin embargo, el gen *KCNJ8* no se encontró significativamente alterado en este último análisis, lo que puede ser a consecuencia de la diferencia en las muestras utilizadas, y de la variabilidad genética que existe en humanos. En este estudio, hemos hallado una relación inversa y significativa entre el gen *KCNJ2*, responsable de esta corriente, y la FE del VI en los pacientes con MCD. Se ha visto que cuando se induce un aumento en la expresión de *KCNJ2*, se produce un incremento de la corriente  $I_{K1}$  (261). Szuts *et al.* vieron que este gen estaba incrementado en pacientes con MCD (260), lo que es consistente con nuestros resultados. Por otro lado, también mutaciones de ganancia de función en este gen se han implicado en diversas enfermedades con alteraciones del ritmo cardíaco, como en la fibrilación auricular y en el síndrome QT corto (262-264). Los datos previos y la presencia de una sobre-expresión del gen *KCNJ2* en pacientes con MCD y su relación con los parámetros de función ventricular de los pacientes, además de este incremento en la MCI, no observado previamente, evidencian la importancia de este canal para el correcto funcionamiento de la corriente de potasio y sugieren que los niveles elevados del ARNm de *KCNJ2* promueven el aumento de la corriente  $I_{K1}$  que lleva a trastornos en la contractilidad y en la función mecánica del corazón.

Los genes de la familia KCNN codifican para canales de potasio activados por iones de  $Ca^{2+}$  intracelular, son responsables de la corriente

$I_{KCa}$ , y regulan la repolarización cardíaca. En este estudio encontramos niveles alterados de *KCNN2* y *KCNN3* en ambas cardiopatías. Las alteraciones a nivel génico de *KCNN3* están implicadas en enfermedades cardíacas y la presencia de taquicardias a causa de su influencia en la prolongación del potencial de acción (265-267). Sin embargo, existen controversias acerca de su función específica en las alteraciones del ritmo cardíaco, mientras algunos autores afirman un papel protector cuando se bloquea la corriente  $I_{KCa}$  (267, 268) o una inducción arrítmica cuando el gen *KCNN3* se sobre-expresa (265), evidenciando un efecto negativo de este gen en la corriente; otros autores han mostrado que el bloqueo de esta corriente promueve el desarrollo de arritmias ventriculares (269, 270). En este análisis, mostramos una sobre-expresión del gen *KCNN3* en ambas patologías, lo que contribuye a un aumento de la corriente  $I_{KCa}$ , y una relación inversa y significativa con la FE del VI en los pacientes con MCD. Estos hallazgos sugieren que en la IC humana de origen dilatado la sobre-expresión de *KCNN3* podría estar contribuyendo a un empeoramiento de la función ventricular de los pacientes, tal vez por la relación que tiene con las alteraciones del ritmo cardíaco.

Curiosamente el gen *TRPM7*, responsable del flujo de iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  en los fibroblastos, ha sido el único gen relacionado con la disfunción ventricular en los pacientes con MCI. *TRPM7* se ha descrito como un importante modulador de la fibrosis cardíaca (271, 272), proceso considerado como una respuesta patológica en la IC (273). La excesiva remodelación del miocardio provoca la disrupción de la estructura del tejido y aumenta su rigidez, lo que produce una disfunción ventricular. Se ha mostrado que los iones  $Ca^{2+}$  están asociados con este proceso

perjudicial, siendo esenciales para la proliferación y diferenciación de fibroblastos (274).

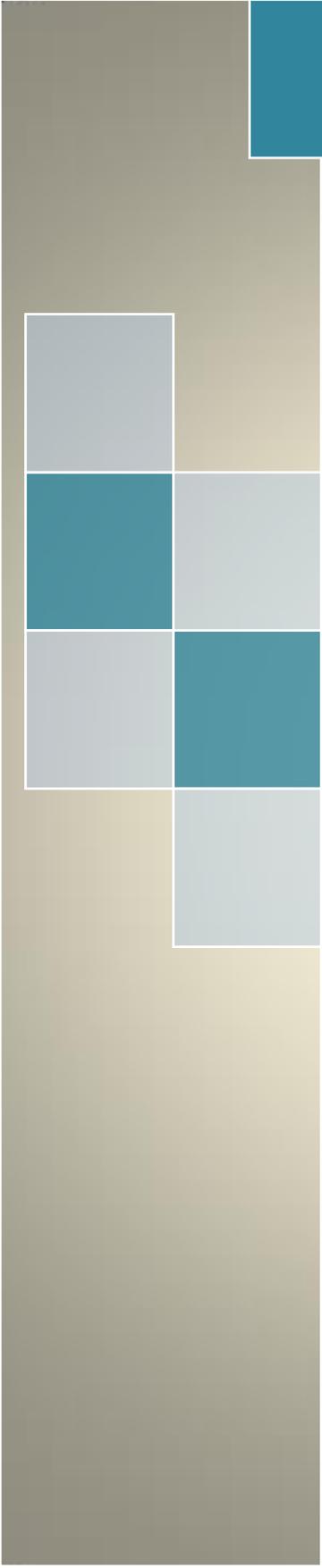
Estudios previos han mostrado una sobre-expresión de *TRPM7* en modelos de IC (275) y también un aumento de la corriente iónica mediada por *TRPM7* en pacientes con fibrilación auricular (276). Además, experimentos de silenciamiento génico de *TRPM7* (*shTRPM7*) han demostrado una disminución en la progresión de la fibrosis cardíaca (276, 277). En este análisis hemos observado niveles reducidos del ARNm de *TRPM7* en ambas cardiopatías, dilatada e isquémica, siendo en esta última donde hemos visto que existe una relación con los parámetros de función ventricular. Analizamos también los niveles proteicos de este canal, sin embargo, no se alcanzó significación estadística. Esto podría explicarse, como otros autores han mostrado previamente (278-280), a un mecanismo de reducción en la degradación proteica que podría estar provocando que la proteína *TRPM7* permaneciera a niveles invariables a pesar de estar reducida su expresión.

En controversia con lo que se ha publicado previamente, hemos hallado una expresión reducida de *TRPM7* en muestras de tejido cardíaco en ambas cavidades izquierdas en pacientes con MCI. Además, encontramos una relación inversa de los niveles de ARNm del VI con los cambios en la función del VI, mostrando que los niveles reducidos de *TRPM7* se relacionan con una mejor función ventricular, lo cual apoya las hipótesis previas que adjudican un papel profibrótico de este CI. Estos hallazgos sugieren un papel relevante de *TRPM7* en la depresión del VI presente en esta miocardiopatía.

Los canales de sodio dependientes de voltaje responsables de la corriente  $I_{Na}$  participan en la despolarización del cardiomiocito. Su presencia en los túbulos-T hace que tengan un papel relevante en la propagación del potencial de acción y en la iniciación del acoplamiento entre excitación-contracción (281). En este estudio encontramos alteraciones en genes codificantes de canales sodio que forman el poro (*SCN1A*, *SCN3A*, *SCN4A*), así como de subunidades que regulan su apertura y cierre, y modulan su expresión (*SCN2B*, *SCN3B*). Se ha descrito previamente un incremento de la corriente  $I_{Na}$  en la IC (202, 203), aunque, como hemos mencionado anteriormente, también se ha reportado una disminución de la misma (139, 200, 201). En el análisis previo mediante micorarrays, observamos una sobre-expresión génica de la subunidad auxiliar *SCN2B* en la MCD, al igual que hemos mostrado en este estudio mediante RNA-seq, ampliándose este aumento también a la MCI. En este trabajo, hemos encontrado 4 genes sobre-expresados no descritos previamente como diferencialmente expresados en la IC (*SCN3A*, *SCN4A*, *SCN2B*, *SCN3B*) que podrían estar contribuyendo al incremento de la corriente de sodio descrita por algunos autores en la IC. Todas estas alteraciones aportan nuevos datos sobre la expresión diferencial de canales de sodio en pacientes con IC de etiologías dilatada e isquémica, que serían una base para el desarrollo de futuros estudios para determinar su papel concreto en este síndrome.

En resumen, en este estudio aportamos un análisis exhaustivo de perfiles de expresión génica de CI de membrana en pacientes con IC avanzada de etiologías dilatada e isquémica. Mediante la técnica de RNA-seq, más sensible (228), hemos hallado un mayor número de genes diferencialmente expresados respecto al estudio que realizamos

previamente mediante la técnica de microarrays, ampliando el estudio a pacientes con MCI. Mostramos la presencia de alteraciones significativas en un gran número de genes responsables de la homeostasis iónica e implicados en el proceso de contracción-relajación cardíaca en ambas patologías. Hemos encontrado relaciones significativas entre CI con expresión alterada y la disfunción sistólica de pacientes con MCD y MCI. Nuestros hallazgos pueden proporcionar nuevas bases para el estudio y regulación de los CI como diana de posibles tratamientos para la mejora de la alteración en la contractilidad cardíaca en pacientes con IC.



# VI. CONCLUSIONES



1. Los niveles proteicos de las moléculas de respuesta a estrés y estructurales del retículo endoplásmico, se encuentran mayoritariamente aumentados en la insuficiencia cardíaca. El incremento de la proteína estructural RRBP1 se relaciona con una depresión de la función ventricular. También hallamos una relación entre esta proteína estructural y la de estrés XBP1, lo que evidencia la existencia de una dependencia específica entre estructura y estrés, además de una influencia de estas alteraciones estructurales sobre la función ventricular de los pacientes.
2. Hemos identificado un gran número de genes diferencialmente expresados, codificantes de canales iónicos y relacionados con el proceso contráctil en ambas miocardiopatías, mediante secuenciación masiva de ARN, hallando alteraciones en un mayor número de genes que los previamente identificados con microarrays.
3. En la miocardiopatía isquémica una reducción de los niveles de ARNm de *TRPM7* se asocia con un mejor desempeño funcional del ventrículo izquierdo. Por otro lado, en la miocardiopatía de origen dilatado, la reducción de *CACNG8* se relaciona con una mejora en la función, mientras que los niveles aumentados de *KCNJ2* y *KCNN3* implican grados mayores de disfunción ventricular izquierda.



# VII. REFERENCIAS



1. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 2008;29(19):2388-442.
2. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012;33(14):1787-847.
3. Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, *et al.* Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26(4):384-416.
4. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26(11):1115-40.
5. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart

---

Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(16):e147-239.

6. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007;93(9):1137-46.

7. Oudejans I, Mosterd A, Bloemen JA, Valk MJ, van Velzen E, Wielders JP, *et al.* Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *Eur J Heart Fail* 2011;13(5):518-27.

8. Kelder JC, Cramer MJ, van Wijngaarden J, van Tooren R, Mosterd A, Moons KG, *et al.* The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation* 2011;124(25):2865-73.

9. Davie AP, Francis CM, Caruana L, Sutherland GR, McMurray JJ. Assessing diagnosis in heart failure: which features are any use? *QJM* 1997;90(5):335-9.

10. Rutten FH, Moons KG, Cramer MJ, Grobbee DE, Zuithoff NP, Lammers JW, *et al.* Recognising heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease in primary care: cross sectional diagnostic study. *BMJ* 2005;331(7529):1379.

11. Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Chalmers GW, Dunn FG, McMurray JJ. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic pitfalls and epidemiology. *Eur J Heart Fail* 2009;11(2):130-9.

12. Daniels LB, Clopton P, Bhalla V, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, *et al.* How obesity affects the cut-points for B-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am Heart J* 2006;151(5):999-1005.

13. Stewart S, Jenkins A, Buchan S, McGuire A, Capewell S, McMurray JJ. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *Eur J Heart Fail* 2002;4(3):361-71.
14. Masson S, Latini R, Anand IS, Barlera S, Angelici L, Vago T, *et al.* Prognostic value of changes in N-terminal pro-brain natriuretic peptide in Val-HeFT (Valsartan Heart Failure Trial). *J Am Coll Cardiol* 2008;52(12):997-1003.
15. Wong M, Staszewsky L, Latini R, Barlera S, Volpi A, Chiang YT, *et al.* Valsartan benefits left ventricular structure and function in heart failure: Val-HeFT echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(5):970-5.
16. Braunwald E, Zipes DP. Braunwald tratado de cardiología : texto de medicina cardiovascular. Versión española de la 7\* ed. Elsevier; 2005.
17. Mendez GF, Cowie MR. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. *Int J Cardiol* 2001;80(2-3):213-9.
18. Stewart S, Ekman I, Ekman T, Oden A, Rosengren A. Population impact of heart failure and the most common forms of cancer: a study of 1 162 309 hospital cases in Sweden (1988 to 2004). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2010;3(6):573-80.
19. Schaufelberger M, Swedberg K, Koster M, Rosen M, Rosengren A. Decreasing one-year mortality and hospitalization rates for heart failure in Sweden; Data from the Swedish Hospital Discharge Registry 1988 to 2000. *Eur Heart J* 2004;25(4):300-7.
20. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3(3):315-22.

- 
- 
21. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, *et al.* Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93(5):841-2.
22. Galve Basilio E, Alfonso Manterola F, Ballester Rodes M, Castro Beiras A, Fernandez de Soria Pantoja R, Penas Lado M, *et al.* [The clinical practice guidelines of the Sociedad Espanola de Cardiologia on cardiomyopathies and myocarditis]. *Rev Esp Cardiol* 2000;53(3):360-93.
23. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, *et al.* Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113(14):1807-16.
24. Fuster V, Gersh BJ, Giuliani ER, Tajik AJ, Brandenburg RO, Frye RL. The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1981;47(3):525-31.
25. Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, Reeder GS, Gersh BJ, Edwards WD, *et al.* Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995;26(1):80-4.
26. Martín Jadraque L. Cardiopatía isquémica : angina de pecho - infarto de miocardio. 2\* ed. Norma; 1988.

27. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385(9963):117-71.
28. Guindo Soldevila J. Apuntes de cardiología. J. Guindo; 2004.
29. Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992;20(1):248-54.
30. Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M, *et al.* Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2002;106(1):92-9.
31. Klabunde RE. Cardiovascular physiology concepts. 2nd ed ed. Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
32. Westerhof N, O'Rourke MF. Haemodynamic basis for the development of left ventricular failure in systolic hypertension and for its logical therapy. *J Hypertens* 1995;13(9):943-52.
33. Kemp CD, Conte JV. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* 2012;21(5):365-71.
34. Bonow RO. Tratado de cardiología texto de medicina cardiovascular. 9a ed ed. Elsevier; 2012.
35. Parikh KS, Ahmad T, Fiuzat M. Potential applications of pharmacogenomics to heart failure therapies. *Heart Fail Clin* 2014;10(4):599-606.
36. Abbate A, Van Tassell BW, Canada JM, Dixon DL, Arena RA, Biondi-Zoccai G. Pharmacologic and surgical interventions to improve functional capacity in heart failure. *Heart Fail Clin* 2015;11(1):117-24.

- 
37. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 11th ed ed. Elsevier Saunders; 2005.
  38. Fawcett DW, Bloom W. Tratado de histología. 2\* ed. Interamericana/McGraw-Hill; 2004.
  39. Cooper GM, Hausman RE. La célula. 5 ed ed. Marbán; 2011.
  40. Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 1954;173(4412):971-3.
  41. Sheetz MP, Spudich JA. Movement of myosin-coated structures on actin cables. *Cell Motil* 1983;3(5-6):485-9.
  42. Rayment I. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J Biol Chem* 1996;271(27):15850-3.
  43. Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 2006;124(3):573-86.
  44. Senden NH, van de Velde HJ, Broers JL, Timmer ED, Roebroek AJ, van de Ven WJ, *et al.* Cluster-10 lung-cancer antibodies recognize NSPs, novel neuro-endocrine proteins associated with membranes of the endoplasmic reticulum. *Int J Cancer Suppl* 1994;8:84-8.
  45. Roebroek AJ, Contreras B, Pauli IG, Van de Ven WJ. cDNA cloning, genomic organization, and expression of the human RTN2 gene, a member of a gene family encoding reticulons. *Genomics* 1998;51(1):98-106.
  46. Moreira EF, Jaworski CJ, Rodriguez IR. Cloning of a novel member of the reticulon gene family (RTN3): gene structure and chromosomal localization to 11q13. *Genomics* 1999;58(1):73-81.

- 
- 
47. GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403(6768):439-44.
  48. Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, Takeda M, Tsujimoto Y. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* 2000;19(50):5736-46.
  49. Iwahashi J, Hamada N. Human reticulon 1-A and 1-B interact with a medium chain of the AP-2 adaptor complex. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003;49 Online Pub:OL467-71.
  50. Steiner P, Kulangara K, Sarria JC, Glauser L, Regazzi R, Hirling H. Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J Neurochem* 2004;89(3):569-80.
  51. Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA, Palazzo AF, Kozlov MM, Rapoport TA. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* 2010;143(5):774-88.
  52. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983;245(1):C1-14.
  53. Wagenknecht T, Samsó M. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front Biosci* 2002;7:d1464-74.
  54. Franzini-Armstrong C, Jorgensen AO. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol* 1994;56:509-34.
  55. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 2004;85(1):33-69.

- 
- 
56. Lytton J, Zarain-Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 1989;264(12):7059-65.
57. MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The mechanism of Ca<sup>2+</sup> transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *J Biol Chem* 1997;272(46):28815-8.
58. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415(6868):198-205.
59. Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez AM, *et al.* 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90(1-3):118-35.
60. Liu XH, Zhang ZY, Sun S, Wu XD. Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress. *Shock* 2008;30(4):422-7.
61. Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, *et al.* Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol* 2004;24(18):8007-17.
62. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, *et al.* Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004;110(6):705-12.
63. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(6):1105-10.

- 
64. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007;274(3):630-58.
  65. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 2011;108(12):2777-93.
  66. Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 1993;73(6):1197-206.
  67. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 1993;74(4):743-56.
  68. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000;2(6):326-32.
  69. Ma K, Vattem KM, Wek RC. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2002;277(21):18728-35.
  70. Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* 1996;15(12):3028-39.
  71. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1997;90(6):1031-9.
  72. Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol* 2005;25(3):921-32.

- 
73. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397(6716):271-4.
74. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;415(6867):92-6.
75. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 2002;3(1):99-111.
76. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000;6(6):1355-64.
77. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110(10):1389-98.
78. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA, *et al.* Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res* 2006;98(9):1186-93.
79. Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Nakamura T, Arozal W, Sari FR, *et al.* Beneficial effects of edaravone, a novel antioxidant, in rats with dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 2012;16(9):2176-85.
80. Sun Y, Liu G, Song T, Liu F, Kang W, Zhang Y, *et al.* Upregulation of GRP78 and caspase-12 in diastolic failing heart. *Acta Biochim Pol* 2008;55(3):511-6.
81. Dally S, Monceau V, Corvazier E, Bredoux R, Raies A, Bobe R, *et al.* Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum

---

Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium* 2009;45(2):144-54.

82. Doroudgar S, Thuerlauf DJ, Marcinko MC, Belmont PJ, Glembotski CC. Ischemia activates the ATF6 branch of the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* 2009;284(43):29735-45.

83. Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(3):H1411-20.

84. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, *et al.* ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349(4):1406-11.

85. Thuerlauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 2006;99(3):275-82.

86. Xin W, Lu X, Li X, Niu K, Cai J. Attenuation of endoplasmic reticulum stress-related myocardial apoptosis by SERCA2a gene delivery in ischemic heart disease. *Mol Med* 2011;17(3-4):201-10.

87. Gao G, Xie A, Zhang J, Herman AM, Jeong EM, Gu L, *et al.* Unfolded protein response regulates cardiac sodium current in systolic human heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6(5):1018-24.

88. Kessler M, Just S, Rottbauer W. Ion flux dependent and independent functions of ion channels in the vertebrate heart: lessons learned from zebrafish. *Stem Cells Int* 2012;2012:462161.

- 
89. Catterall WA. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 1988;242(4875):50-61.
  90. Balse E, Steele DF, Abriel H, Coulombe A, Fedida D, Hatem SN. Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiol Rev* 2012;92(3):1317-58.
  91. Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;2(2):185-94.
  92. Tamargo Menéndez JL. Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. Real Academia Nacional de Farmacia; 2004.
  93. Jespersen T. The Cardiac Ion Channels. INTECH Open Access Publisher; 2012.
  94. Noda M, Ikeda T, Kayano T, Suzuki H, Takeshima H, Kurasaki M, *et al.* Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 1986;320(6058):188-92.
  95. Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2005;67(3):448-58.
  96. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, *et al.* Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;582(Pt 2):675-93.
  97. Petitprez S, Jespersen T, Pruvot E, Keller DI, Corbaz C, Schlapfer J, *et al.* Analyses of a novel SCN5A mutation (C1850S): conduction vs. repolarization disorder hypotheses in the Brugada syndrome. *Cardiovasc Res* 2008;78(3):494-504.
  98. Ono K, Iijima T. Cardiac T-type Ca(2+) channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(1):65-70.

- 
99. Hille B. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect* 1986;82:47-69.
100. Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;115(12):3306-17.
101. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 1985;86(1):1-30.
102. Ivanov SV, Ward JM, Tessarollo L, McAreavey D, Sachdev V, Fananapazir L, *et al.* Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the *Cacna2d2* gene. *Am J Pathol* 2004;165(3):1007-18.
103. Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, *et al.* The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 2000;25(1):177-90.
104. Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, *et al.* Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 2004;429(6992):675-80.
105. Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL, Jr. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 2004;429(6992):671-5.
106. Colecraft HM, Alseikhan B, Takahashi SX, Chaudhuri D, Mittman S, Yegnasubramanian V, *et al.* Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol* 2002;541(Pt 2):435-52.

- 
107. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, *et al.* Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;868:233-85.
  108. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):557-94.
  109. Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;525 Pt 2:285-98.
  110. Jan LY, Jan YN. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Neurosci* 1997;20:91-123.
  111. Amin AS, Tan HL, Wilde AA. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm* 2010;7(1):117-26.
  112. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993;362(6416):127-33.
  113. Jan LY, Jan YN. Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol* 1997;505 ( Pt 2):267-82.
  114. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 2010;90(2):559-605.
  115. Hume JR, Duan D, Collier ML, Yamazaki J, Horowitz B. Anion transport in heart. *Physiol Rev* 2000;80(1):31-81.
  116. Yamamoto S, Ehara T. Acidic extracellular pH-activated outwardly rectifying chloride current in mammalian cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(5):H1905-14.
  117. Gadsby DC, Nagel G, Hwang TC. The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Annu Rev Physiol* 1995;57:387-416.

- 
118. Zhang K, Barrington PL, Martin RL, Ten Eick RE. Protein kinase-dependent Cl<sup>-</sup> currents in feline ventricular myocytes. *Circ Res* 1994;75(1):133-43.
119. Duan D, Ye L, Britton F, Miller LJ, Yamazaki J, Horowitz B, *et al.* Purinoceptor-coupled Cl<sup>-</sup> channels in mouse heart: a novel, alternative pathway for CFTR regulation. *J Physiol* 1999;521 Pt 1:43-56.
120. Levesque PC, Hart PJ, Hume JR, Kenyon JL, Horowitz B. Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl<sup>-</sup> channels in heart. *Circ Res* 1992;71(4):1002-7.
121. Horowitz B, Tsung SS, Hart P, Levesque PC, Hume JR. Alternative splicing of CFTR Cl<sup>-</sup> channels in heart. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 2):H2214-20.
122. Harvey RD, Hume JR. Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science* 1989;244(4907):983-5.
123. Hart P, Warth JD, Levesque PC, Collier ML, Geary Y, Horowitz B, *et al.* Cystic fibrosis gene encodes a cAMP-dependent chloride channel in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(13):6343-8.
124. Gandhi R, Elble RC, Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM, *et al.* Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J Biol Chem* 1998;273(48):32096-101.
125. Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989;410:187-212.
126. Guo D, Young L, Patel C, Jiao Z, Wu Y, Liu T, *et al.* Calcium-activated chloride current contributes to action potential alternations in left ventricular hypertrophy rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295(1):H97-H104.

- 
127. Harvey RD, Clark CD, Hume JR. Chloride current in mammalian cardiac myocytes. Novel mechanism for autonomic regulation of action potential duration and resting membrane potential. *J Gen Physiol* 1990;95(6):1077-102.
128. Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, Horowitz B. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 1997;390(6658):417-21.
129. Duan D, Hume JR, Nattel S. Evidence that outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels underlie volume-regulated Cl<sup>-</sup> currents in heart. *Circ Res* 1997;80(1):103-13.
130. Britton FC, Wang GL, Huang ZM, Ye L, Horowitz B, Hume JR, *et al.* Functional characterization of novel alternatively spliced CLC-2 chloride channel variants in the heart. *J Biol Chem* 2005;280(27):25871-80.
131. Huang ZM, Prasad C, Britton FC, Ye LL, Hatton WJ, Duan D. Functional role of CLC-2 chloride inward rectifier channels in cardiac sinoatrial nodal pacemaker cells. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47(1):121-32.
132. Duan D, Ye L, Britton F, Horowitz B, Hume JR. A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. *Circ Res* 2000;86(4):E63-71.
133. Perreault CL, Meuse AJ, Bentivegna LA, Morgan JP. Abnormal intracellular calcium handling in acute and chronic heart failure: role in systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 1990;11 Suppl C:8-21.
134. Zhang SS, Shaw RM. Multilayered regulation of cardiac ion channels. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(4):876-85.
135. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;392(6673):293-6.

136. Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, *et al.* Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007;115(4):442-9.
137. Gao M, Wang J, Wang Z, Zhang Y, Sun H, Xie X, *et al.* An altered expression of genes involved in the regulation of ion channels in atrial myocytes is correlated with the risk of atrial fibrillation in patients with heart failure. *Exp Ther Med* 2013;5(4):1239-43.
138. Ambrosi CM, Yamada KA, Nerbonne JM, Efimov IR. Gender differences in electrophysiological gene expression in failing and non-failing human hearts. *PLoS One* 2013;8(1):e54635.
139. Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, *et al.* Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 2004;561(Pt 3):735-48.
140. Mishra S, Sabbah HN, Rastogi S, Imai M, Gupta RC. Reduced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger expression in left ventricle myocardium of dogs with progression of heart failure. *Heart Vessels* 2005;20(1):23-32.
141. Wong KR, Trezise AE, Crozatier B, Vandenberg JI. Loss of the normal epicardial to endocardial gradient of cftr mRNA expression in the hypertrophied rabbit left ventricle. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278(1):144-9.
142. Li X, Huang CX, Jiang H, Cao F, Wang T. The beta-adrenergic blocker carvedilol restores L-type calcium current in a myocardial infarction model of rabbit. *Chin Med J (Engl)* 2005;118(5):377-82.

143. Hullin R, Matthes J, von Vietinghoff S, Bodi I, Rubio M, D'Souza K, *et al.* Increased expression of the auxiliary beta(2)-subunit of ventricular L-type Ca(2)+ channels leads to single-channel activity characteristic of heart failure. *PLoS One* 2007;2(3):e292.
144. Yang Y, Chen X, Margulies K, Jeevanandam V, Pollack P, Bailey BA, *et al.* L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1c subunit isoform switching in failing human ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32(6):973-84.
145. Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, *et al.* Expression of dihydropyridine receptor (Ca<sup>2+</sup> channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1992;90(3):927-35.
146. Brillantes AM, Allen P, Takahashi T, Izumo S, Marks AR. Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1992;71(1):18-26.
147. Munch G, Bolck B, Sugaru A, Brixius K, Bloch W, Schwinger RH. Increased expression of isoform 1 of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel in failing human heart. *Circulation* 2001;103(22):2739-44.
148. Kaab S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Nabauer M, Beuckelmann DJ, *et al.* Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998;98(14):1383-93.
149. Rose J, Armoundas AA, Tian Y, DiSilvestre D, Burysek M, Halperin V, *et al.* Molecular correlates of altered expression of potassium currents in failing rabbit myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(5):H2077-87.

- 
150. Macrae DJ. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(2):176-8, discussion 8-9.
151. Winters AL, Minchin FR. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem* 2005;346(1):43-8.
152. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
153. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4.
154. Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT, Freisler J. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem* 1966;9(3):447.
155. Azorin I, Portoles M, Marin P, Lazaro-Dieguez F, Megias L, Egea G, *et al.* Prenatal ethanol exposure alters the cytoskeleton and induces glycoprotein microheterogeneity in rat newborn hepatocytes. *Alcohol Alcohol* 2004;39(3):203-12.
156. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30(1):207-10.
157. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10(1):57-63.
158. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25(16):2078-9.

- 
159. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010;28(5):511-5.
160. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015;31(2):166-9.
161. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;26(1):139-40.
162. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(9):1026-30.
163. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.
164. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4(6):357-62.
165. Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002;296(5567):557-9.
166. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34(3):597-601.
167. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.

- 
168. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4(1):44-57.
169. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Web Server issue):W305-11.
170. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:186-94.
171. Doroudgar S, Glembotski CC. New concepts of endoplasmic reticulum function in the heart: programmed to conserve. *J Mol Cell Cardiol* 2013;55:85-91.
172. Xin W, Li X, Lu X, Niu K, Cai J. Involvement of endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in a heart failure model induced by chronic myocardial ischemia. *Int J Mol Med* 2011;27(4):503-9.
173. Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, *et al.* Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res* 2008;79(4):600-10.
174. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, *et al.* IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 2002;16(4):452-66.
175. Oikawa D, Kimata Y, Kohno K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 9):1681-8.

- 
176. Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001;276(12):9199-205.
177. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998;273(50):33741-9.
178. Hu J, Shibata Y, Voss C, Shemesh T, Li Z, Coughlin M, *et al.* Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* 2008;319(5867):1247-50.
179. Goyal U, Blackstone C. Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(11):2492-8.
180. Ueno T, Kaneko K, Sata T, Hattori S, Ogawa-Goto K. Regulation of polysome assembly on the endoplasmic reticulum by a coiled-coil protein, p180. *Nucleic Acids Res* 2012;40(7):3006-17.
181. Becker F, Block-Alper L, Nakamura G, Harada J, Wittrup KD, Meyer DI. Expression of the 180-kD ribosome receptor induces membrane proliferation and increased secretory activity in yeast. *J Cell Biol* 1999;146(2):273-84.
182. Benyamini P, Webster P, Meyer DI. Knockdown of p180 eliminates the terminal differentiation of a secretory cell line. *Mol Biol Cell* 2009;20(2):732-44.
183. Toyoshima I, Yu H, Steuer ER, Sheetz MP. Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J Cell Biol* 1992;118(5):1121-31.

- 
184. Ueno T, Tanaka K, Kaneko K, Taga Y, Sata T, Irie S, *et al.* Enhancement of procollagen biosynthesis by p180 through augmented ribosome association on the endoplasmic reticulum in response to stimulated secretion. *J Biol Chem* 2010;285(39):29941-50.
185. Collins HE, He L, Zou L, Qu J, Zhou L, Litovsky SH, *et al.* Stromal interaction molecule 1 is essential for normal cardiac homeostasis through modulation of ER and mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;306(8):H1231-9.
186. Ordog B, Brutyo E, Puskas LG, Papp JG, Varro A, Szabad J, *et al.* Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *Int J Cardiol* 2006;111(3):386-93.
187. Szmít S, Jank M, Maciejewski H, Grabowski M, Glowczynska R, Majewska A, *et al.* Gene expression profiling in peripheral blood nuclear cells in patients with refractory ischaemic end-stage heart failure. *J Appl Genet* 2010;51(3):353-68.
188. Barth AS, Kumordzie A, Frangakis C, Margulies KB, Cappola TP, Tomaselli GF. Reciprocal transcriptional regulation of metabolic and signaling pathways correlates with disease severity in heart failure. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4(5):475-83.
189. Ivandic BT, Mastitsky SE, Schonsiegel F, Bekeredjian R, Eils R, Frey N, *et al.* Whole-genome analysis of gene expression associates the ubiquitin-proteasome system with the cardiomyopathy phenotype in disease-sensitized congenic mouse strains. *Cardiovasc Res* 2012;94(1):87-95.
190. Prat-Vidal C, Galvez-Monton C, Nonell L, Puigdecenet E, Astier L, Sole F, *et al.* Identification of temporal and region-specific myocardial gene

---

---

expression patterns in response to infarction in swine. *PLoS One* 2013;8(1):e54785.

191. Kim JI, Kim IK. Probing regulatory proteins for vascular contraction by deoxyribonucleic Acid microarray. *Korean Circ J* 2012;42(7):479-86.

192. Zhou Y, Gong B, Kaminski HJ. Genomic profiling reveals Pitx2 controls expression of mature extraocular muscle contraction-related genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(4):1821-9.

193. Dasgupta T, Stillwagon SJ, Ladd AN. Gene expression analyses implicate an alternative splicing program in regulating contractile gene expression and serum response factor activity in mice. *PLoS One* 2013;8(2):e56590.

194. Walmsley J, Rodriguez JF, Mirams GR, Burrage K, Efimov IR, Rodriguez B. mRNA expression levels in failing human hearts predict cellular electrophysiological remodeling: a population-based simulation study. *PLoS One* 2013;8(2):e56359.

195. Morgan JP, Erny RE, Allen PD, Grossman W, Gwathmey JK. Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* 1990;81(2 Suppl):III21-32.

196. Fatkin D, members of the CCGDCWG. Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy. *Heart Lung Circ* 2011;20(11):691-3.

197. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26(1):13-25.

- 
198. Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 2001;7(1):42-54.
199. Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN, *et al.* Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* 2001;103(9):1303-10.
200. Ufret-Vincenty CA, Baro DJ, Lederer WJ, Rockman HA, Quinones LE, Santana LF. Role of sodium channel deglycosylation in the genesis of cardiac arrhythmias in heart failure. *J Biol Chem* 2001;276(30):28197-203.
201. Hesse M, Kondo CS, Clark RB, Su L, Allen FL, Geary-Joo CT, *et al.* Dilated cardiomyopathy is associated with reduced expression of the cardiac sodium channel Scn5a. *Cardiovasc Res* 2007;75(3):498-509.
202. Huang B, El-Sherif T, Gidh-Jain M, Qin D, El-Sherif N. Alterations of sodium channel kinetics and gene expression in the postinfarction remodeled myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12(2):218-25.
203. Undrovinas AI, Maltsev VA, Sabbah HN. Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(3):494-505.
204. Nobles M, Sebastian S, Tinker A. HL-1 cells express an inwardly rectifying K<sup>+</sup> current activated via muscarinic receptors comparable to that in mouse atrial myocytes. *Pflugers Arch* 2010;460(1):99-108.
205. Hedin KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permits GIRK1 expression of IK<sub>ACh</sub> currents in oocytes. *Neuron* 1996;16(2):423-9.
206. Cui Y, Glibin JP, Clapp LH, Tinker A. A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(2):729-34.

207. Kane GC, Lam CF, O'Coilain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, *et al.* Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. *FASEB J* 2006;20(13):2271-80.
208. Cromer BA, Gorman MA, Hansen G, Adams JJ, Coggan M, Littler DR, *et al.* Structure of the Janus protein human CLIC2. *J Mol Biol* 2007;374(3):719-31.
209. Dulhunty AF, Pouliquin P, Coggan M, Gage PW, Board PG. A recently identified member of the glutathione transferase structural family modifies cardiac RyR2 substate activity, coupled gating and activation by Ca<sup>2+</sup> and ATP. *Biochem J* 2005;390(Pt 1):333-43.
210. Dulhunty AF, Hewawasam R, Liu D, Casarotto MG, Board PG. Regulation of the cardiac muscle ryanodine receptor by glutathione transferases. *Drug Metab Rev* 2011;43(2):236-52.
211. Jalilian C, Gallant EM, Board PG, Dulhunty AF. Redox potential and the response of cardiac ryanodine receptors to CLIC-2, a member of the glutathione S-transferase structural family. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(10):1675-86.
212. Takano K, Liu D, Tarpey P, Gallant E, Lam A, Witham S, *et al.* An X-linked channelopathy with cardiomegaly due to a CLIC2 mutation enhancing ryanodine receptor channel activity. *Hum Mol Genet* 2012;21(20):4497-507.
213. Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM. Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem* 1996;271(43):26465-8.
214. Yamaguchi H, Okuda M, Mikala G, Fukasawa K, Varadi G. Cloning of the beta(2a) subunit of the voltage-dependent calcium channel from human heart: cooperative effect of alpha(2)/delta and beta(2a) on the

- 
- membrane expression of the alpha(1C) subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267(1):156-63.
215. Cordeiro JM, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46(5):695-703.
216. Hu D, Barajas-Martinez H, Nesterenko VV, Pfeiffer R, Guerchicoff A, Cordeiro JM, *et al.* Dual variation in SCN5A and CACNB2b underlies the development of cardiac conduction disease without Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2010;33(3):274-85.
217. Deschenes I, Armoundas AA, Jones SP, Tomaselli GF. Post-transcriptional gene silencing of KCHIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(3):336-46.
218. Bidaud I, Mezghrani A, Swayne LA, Monteil A, Lory P. Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763(11):1169-74.
219. Arikath J, Campbell KP. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13(3):298-307.
220. Ebert AM, McAnelly CA, Handschy AV, Mueller RL, Horne WA, Garrity DM. Genomic organization, expression, and phylogenetic analysis of Ca<sup>2+</sup> channel beta4 genes in 13 vertebrate species. *Physiol Genomics* 2008;35(2):133-44.

221. Weiss N, Sandoval A, Kyonaka S, Felix R, Mori Y, De Waard M. Rim1 modulates direct G-protein regulation of Ca(v)2.2 channels. *Pflugers Arch* 2011;461(4):447-59.
222. Board PG, Coggan M, Watson S, Gage PW, Dulhunty AF. CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(8):1599-612.
223. Sacher M, Kim YG, Lavie A, Oh BH, Segev N. The TRAPP complex: insights into its architecture and function. *Traffic* 2008;9(12):2032-42.
224. Yang B, Kumar S. Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ* 2010;17(1):68-77.
225. Rougier JS, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apotheloz F, *et al.* Molecular determinants of voltage-gated sodium channel regulation by the Nedd4/Nedd4-like proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(3):C692-701.
226. van Bemmelen MX, Rougier JS, Gavillet B, Apotheloz F, Daidie D, Tateyama M, *et al.* Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res* 2004;95(3):284-91.
227. Mia S, Munoz C, Pakladok T, Siraskar G, Voelkl J, Alesutan I, *et al.* Downregulation of Kv1.5 K channels by the AMP-activated protein kinase. *Cell Physiol Biochem* 2012;30(4):1039-50.
228. Mooney M, Bond J, Monks N, Eugster E, Cherba D, Berlinski P, *et al.* Comparative RNA-Seq and microarray analysis of gene expression changes in B-cell lymphomas of Canis familiaris. *PLoS One* 2013;8(4):e61088.

229. Cho CH, St-Gelais F, Zhang W, Tomita S, Howe JR. Two families of TARP isoforms that have distinct effects on the kinetic properties of AMPA receptors and synaptic currents. *Neuron* 2007;55(6):890-904.
230. Xiong D, Heyman NS, Airey J, Zhang M, Singer CA, Rawat S, *et al.* Cardiac-specific, inducible CLC-3 gene deletion eliminates native volume-sensitive chloride channels and produces myocardial hypertrophy in adult mice. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(1):211-9.
231. Xiong D, Wang GX, Burkin DJ, Yamboliev IA, Singer CA, Rawat S, *et al.* Cardiac-specific overexpression of the human short CLC-3 chloride channel isoform in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36(4):386-93.
232. Murthi P, Stevenson JL, Money TT, Borg AJ, Brennecke SP, Gude NM. Placental CLIC3 is increased in fetal growth restriction and pre-eclampsia affected human pregnancies. *Placenta* 2012;33(9):741-4.
233. Parajuli N, Valtuille L, Basu R, Famulski KS, Halloran PF, Sergi C, *et al.* Determinants of ventricular arrhythmias in human explanted hearts with dilated cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest* 2015.
234. Hiltunen TP, Donner KM, Sarin AP, Saarela J, Ripatti S, Chapman AB, *et al.* Pharmacogenomics of hypertension: a genome-wide, placebo-controlled cross-over study, using four classes of antihypertensive drugs. *J Am Heart Assoc* 2015;4(1):e001521.
235. Bradford EM, Miller ML, Prasad V, Nieman ML, Gawenis LR, Berryman M, *et al.* CLIC5 mutant mice are resistant to diet-induced obesity and exhibit gastric hemorrhaging and increased susceptibility to torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298(6):R1531-42.
236. Herrmann S, Hofmann F, Stieber J, Ludwig A. HCN channels in the heart: lessons from mouse mutants. *Br J Pharmacol* 2012;166(2):501-9.

237. Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, Varro A, Cerbai E, Mugelli A, *et al.* Molecular basis of funny current (I<sub>f</sub>) in normal and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(2):289-99.
238. Borlak J, Thum T. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J* 2003;17(12):1592-608.
239. Fenske S, Mader R, Scharr A, Papparizos C, Cao-Ehlker X, Michalakis S, *et al.* HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. *Circ Res* 2011;109(9):1015-23.
240. Bucchi A, Barbuti A, Difrancesco D, Baruscotti M. Funny Current and Cardiac Rhythm: Insights from HCN Knockout and Transgenic Mouse Models. *Front Physiol* 2012;3:240.
241. Abbott GW, Goldstein SA. A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the Mink-related peptides (MiRPs). *Q Rev Biophys* 1998;31(4):357-98.
242. Zhang M, Jiang M, Tseng GN. minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;88(10):1012-9.
243. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barhanin J. KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J* 2000;19(23):6326-30.
244. Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptacek LJ, Goldstein SA. MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 2001;104(2):217-31.
245. Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varro A, *et al.* Functional modulation of the transient outward current I<sub>to</sub> by KCNE beta-

---

subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;71(4):695-703.

246. Delpon E, Cordeiro JM, Nunez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, *et al.* Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1(3):209-18.

247. Levy DI, Cepaitis E, Wanderling S, Toth PT, Archer SL, Goldstein SA. The membrane protein MiRP3 regulates Kv4.2 channels in a KChIP-dependent manner. *J Physiol* 2010;588(Pt 14):2657-68.

248. Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, *et al.* A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;107(6):801-13.

249. Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, *et al.* Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;533(Pt 1):119-25.

250. Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory Kvbeta1 subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005;96(4):451-8.

251. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85(4):1205-53.

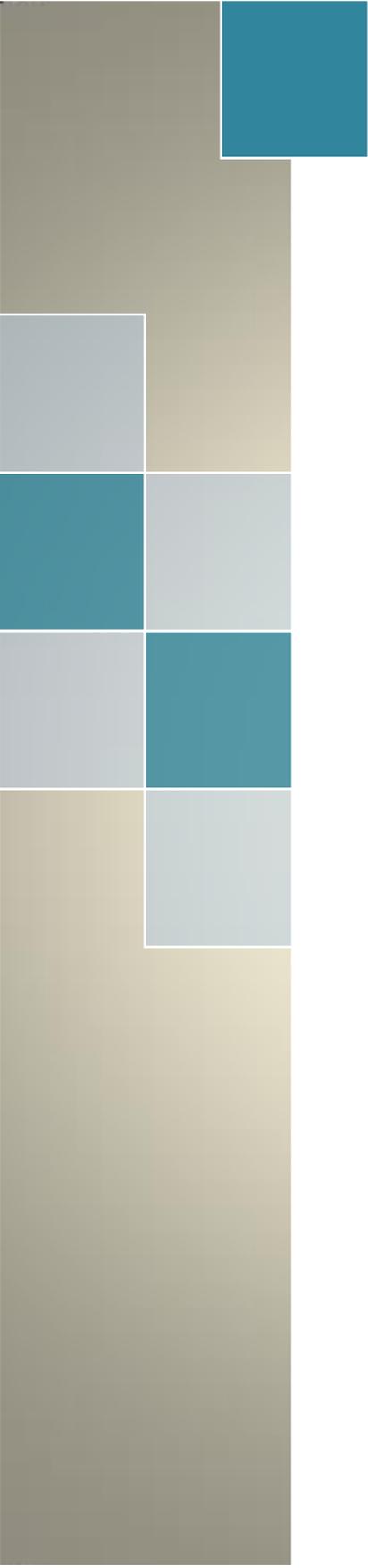
252. Guo W, Li H, London B, Nerbonne JM. Functional consequences of elimination of i(to,f) and i(to,s): early afterdepolarizations, atrioventricular block, and ventricular arrhythmias in mice lacking Kv1.4 and expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ Res* 2000;87(1):73-9.

253. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73(2):379-85.
254. Cordeiro JM, Calloe K, Moise NS, Kornreich B, Giannandrea D, Di Diego JM, *et al.* Physiological consequences of transient outward K<sup>+</sup> current activation during heart failure in the canine left ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52(6):1291-8.
255. Grubb S, Calloe K, Thomsen MB. Impact of KCHIP2 on Cardiac Electrophysiology and the Progression of Heart Failure. *Front Physiol* 2012;3:118.
256. Al-Sabi A, Kaza S, Le Berre M, O'Hara L, Bodeker M, Wang J, *et al.* Position-dependent attenuation by Kv1.6 of N-type inactivation of Kv1.4-containing channels. *Biochem J* 2011;438(2):389-96.
257. Hardziyenka M, Campian ME, Verkerk AO, Surie S, van Ginneken AC, Hakim S, *et al.* Electrophysiologic remodeling of the left ventricle in pressure overload-induced right ventricular failure. *J Am Coll Cardiol* 2012;59(24):2193-202.
258. Grubb S, Speerschneider T, Occhipinti D, Fiset C, Olesen SP, Thomsen MB, *et al.* Loss of K<sup>+</sup> currents in heart failure is accentuated in KCHIP2 deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014;25(8):896-904.
259. Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, Pilgram TK, Demolombe S, Nerbonne JM. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K<sup>+</sup> currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2008;102(11):1406-15.

260. Szuts V, Menesi D, Varga-Orvos Z, Zvara A, Houshmand N, Bitay M, *et al.* Altered expression of genes for Kir ion channels in dilated cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91(8):648-56.
261. Qi XY, Huang H, Ordog B, Luo X, Naud P, Sun Y, *et al.* Fibroblast inward-rectifier potassium current upregulation in profibrillatory atrial remodeling. *Circ Res* 2015;116(5):836-45.
262. Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, *et al.* A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332(4):1012-9.
263. Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, *et al.* A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;96(7):800-7.
264. Patel C, Yan GX, Antzelevitch C. Short QT syndrome: from bench to bedside. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3(4):401-8.
265. Mahida S, Mills RW, Tucker NR, Simonson B, Macri V, Lemoine MD, *et al.* Overexpression of KCNN3 results in sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 2014;101(2):326-34.
266. Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, *et al.* Ablation of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol* 2009;587(Pt 5):1087-100.
267. Bonilla IM, Long VP, 3rd, Vargas-Pinto P, Wright P, Belevych A, Lou Q, *et al.* Calcium-activated potassium current modulates ventricular repolarization in chronic heart failure. *PLoS One* 2014;9(10):e108824.
268. Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, *et al.* Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves

- activation of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(1):H118-30.
269. Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shinohara T, Shen MJ, *et al.* Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ Res* 2011;108(8):971-9.
270. Chang PC, Turker I, Lopshire JC, Masroor S, Nguyen BL, Tao W, *et al.* Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J Am Heart Assoc* 2013;2(1):e004713.
271. Yu Y, Chen S, Xiao C, Jia Y, Guo J, Jiang J, *et al.* TRPM7 is involved in angiotensin II induced cardiac fibrosis development by mediating calcium and magnesium influx. *Cell Calcium* 2014;55(5):252-60.
272. Yue Z, Zhang Y, Xie J, Jiang J, Yue L. Transient receptor potential (TRP) channels and cardiac fibrosis. *Curr Top Med Chem* 2013;13(3):270-82.
273. Weber KT, Sun Y, Diez J. Fibrosis: a living tissue and the infarcted heart. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(24):2029-31.
274. Ramires FJ, Sun Y, Weber KT. Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(3):475-83.
275. Demir T, Yumrutas O, Cengiz B, Demiryurek S, Unverdi H, Kaplan DS, *et al.* Evaluation of TRPM (transient receptor potential melastatin) genes expressions in myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Biol Rep* 2014;41(5):2845-9.
276. Du J, Xie J, Zhang Z, Tsujikawa H, Fusco D, Silverman D, *et al.* TRPM7-mediated Ca<sup>2+</sup> signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2010;106(5):992-1003.

- 
277. Guo JL, Yu Y, Jia YY, Ma YZ, Zhang BY, Liu PQ, *et al.* Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) contributes to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cardiac fibrosis via mediating Ca<sup>2+</sup> influx and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activation in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci* 2014;125(2):184-92.
278. Cruzen SM, Harris AJ, Hollinger K, Punt RM, Grubbs JK, Selsby JT, *et al.* Evidence of decreased muscle protein turnover in gilts selected for low residual feed intake. *J Anim Sci* 2013;91(8):4007-16.
279. Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA, Jr., Notterpek L. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis* 2006;22(1):153-64.
280. VanSlyke JK, Musil LS. Cytosolic stress reduces degradation of connexin43 internalized from the cell surface and enhances gap junction formation and function. *Mol Biol Cell* 2005;16(11):5247-57.
281. Maier SK, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T, Catterall WA. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):4073-8.



# PUBLICACIONES



## **PUBLICACIONES ORIGINADAS A PARTIR DE ESTA TESIS DOCTORAL:**

- Molina-Navarro M, Roselló-Lletí E, **Ortega A**, Tarazón E, Otero M, Martínez-Dolz L, Lago F, González-Juanatey JR, España F, García-Pavía P, Montero JA, Portolés M, Rivera M. Differential gene expression of cardiac ion channels in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2013; 8:e79792.
- **Ortega A**, Roselló-Lletí E, Tarazón E, Molina-Navarro MM, Martínez-Dolz L, González-Juanatey JR, Lago F, Salvador A, Rivera M, Portolés M. Endoplasmic reticulum stress induces different molecular structural alterations in human dilated and ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9:e107635.
- **Ortega A**, Tarazón E, Roselló-Lletí E, Gil-Cayuela C, Lago F, González-Juanatey JR, Cinca J, Jorge E, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. Patients with dilated cardiomyopathy and sustained monomorphic ventricular tachycardia show up-regulation of *KCNN3* and *KCNJ2* genes and *CACNG8*-linked left ventricular dysfunction. *PLoS One* 2015;10: e0145518.
- **Ortega A**, Roselló-Lletí E, Tarazón E, Gil-Cayuela C, Lago F, González-Juanatey JR, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. *TRPM7* is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischaemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function. *ESC Heart Failure* 2016; DOI: 10.1002/ehf2.12085.

## **OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE ELABORACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL:**

- Roselló-Lletí E, Carnicer R, Tarazón E, **Ortega A**, Gil-Cayuela C, Lago F, González-Juanatey JR, Portolés M, Rivera M. Human Ischemic Cardiomyopathy Shows Cardiac Nos1 Translocation and its Increased Levels are Related to Left Ventricular Performance. *Sci Rep* 2016, DOI: 10.1038/srep24060.
- Herrer I, Roselló-Lletí E, **Ortega A**, Tarazón E, Molina-Navarro MM, Triviño JC, Martínez-Dolz L, Almenar L, Lago F, Sánchez-Lázaro I, González-Juanatey JR, Salvador A, Portolés M, Rivera M. Gene expression network analysis reveals new transcriptional regulators as novel factors in human ischemic cardiomyopathy. *BMC Med Genomics* 2015, 8:14.
- Álvarez-García J, Ferrero-Gregori A, Puig T, Vázquez R, Delgado J, Pascual-Figal D, Alonso-Pulpón L, González-Juanatey JR, Rivera M, Worner F, Bardají A, Cinca J; investigators of the Spanish Heart Failure Network (**REDINSCOR**). A simple validated method for predicting the risk of hospitalization for worsening of heart failure in ambulatory patients: the Redin-SCORE. *Eur J Heart Fail.* 2015;17:818-827.
- Gil-Cayuela C, Rivera M, **Ortega A**, Tarazón E, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Almenar L, Martínez-Dolz L, Portolés M. RNA sequencing analysis identifies new human collagen genes involved in cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2015, 65:1265-67.

- Roselló-Lletí E, Tarazón E, Barderas MG, **Ortega A**, Otero M, Molina-Navarro MM, Lago F, González-Juanatey JR Salvador A, Portolés M, Rivera M. Heart mitochondrial proteome study elucidates changes in cardiac energy metabolism and antioxidant PRDX3 in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2014;11: e0112971.
- Roselló-Lletí E, Tarazón E, Barderas MG, **Ortega A**, Otero M, Molina-Navarro MM, Martínez A, Portolés M, Rivera M. ATP synthase subunit alpha and left ventricular mass in ischemic cardiomyopathy: a mitochondrial proteomic approach on human cardiac tissue. *J Cell Mol Med* 2014. 19:442-51.
- Tarazón E, Roselló-Lletí E, **Ortega A**, Molina-Navarro MM, Martínez-Dolz L, Montero JA, Sanchez-Lázaro I, Lago F, González-Juanatey JR, Rivera M, Portolés M. Differential gene expression of c-type natriuretic peptide and its related molecules in dilated and ischemic cardiomyopathy. A new option for the management of heart failure. *Int J Cardiol* 2014; 174:e84-e86.
- Herrer I, Roselló-Lletí E, Rivera M, Molina-Navarro MM, Tarazón E, **Ortega A**, Martínez-Dolz L, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Bertomeu V, Montero JA, Portolés M. RNA-sequencing analysis reveals new alterations in the cardiomyocyte cytoskeletal genes in patients with heart failure. *Lab Invest* 2014; 94:645-653.
- Tarazón E, Roselló-Lletí E, Rivera M, **Ortega A**, Molina-Navarro MM, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Orosa P, Montero JA, Salvador A, Portolés M. RNA sequencing analysis and atrial natriuretic peptide

production in patients with dilated and ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9:e90157.

- Cinca J, Mendez A, Puig T, Ferrero A, Roig E, Vazquez R, Gonzalez-Juanatey JR, Alonso-Pulpon L, Delgado J, Brugada J, Pascual-Figal D; investigators of the Spanish Heart Failure Network (**REDINSCOR**). Differential clinical characteristics and prognosis of intraventricular conduction defects in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:877-884.
- Molina-Navarro M, Roselló-Lletí E, Tarazón E, **Ortega A**, Sánchez-Izquierdo D, Lago F, González-Juanatey JR, García-Pavía P, Salvador A, Montero JA, Portolés M, Rivera M. Heart failure entails significant changes in human nucleocytoplasmic transport gene expression. *Int J Cardiol* 2013; 168:2837-2843.

