



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA

&

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA LA FE - CIBERCV

**ESTUDIO DEL PAPEL FISIOPATOLÓGICO
DEL COLÁGENO EN LA INSUFICIENCIA
CARDIACA. IMPLICACIONES EN EL
REMODELADO VENTRICULAR.**

TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR:

CAROLINA GIL CAYUELA

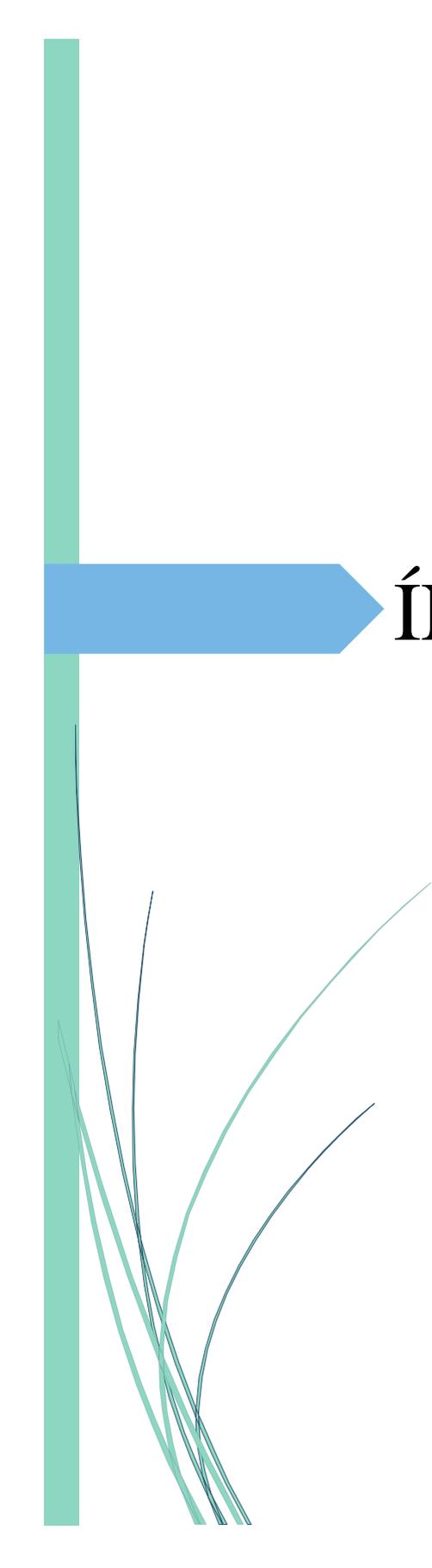
DIRIGIDA POR:

Jose Miguel Rivera Otero

Manuel Portolés Sanz

Esther Roselló Lletí

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2018



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. INSUFICIENCIA CARDIACA.....	2
1.1 Definición y clasificación.....	2
1.2 Etiología de la insuficiencia cardiaca.....	6
1.3 Fisiopatología de la insuficiencia cardiaca.....	10
1.4 Diagnóstico y pronóstico de la insuficiencia cardiaca.....	18
1.5 Tratamiento de la insuficiencia cardiaca.....	23
1.6 Prevalencia e incidencia de la insuficiencia cardiaca.....	24
1.7 Comorbilidades y factores de riesgo.....	26
2. REMODELADO CARDIACO.....	29
2.1 Definición.....	29
2.2 Remodelado e inflamación.....	31
2.3 Remodelado y fibrosis.....	35
2.3.1 Matriz extracelular y colágeno.....	43
2.4 Remodelado e hipertrofia.....	52
2.5 Remodelado y apoptosis.....	55
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	62
1. COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	63
2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR SECUENCIACIÓN DE ARN.....	67
2.1 Extracción de ARN total y aislamiento de ARN poli(A).....	69
2.2 Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN.....	71
2.2.1 Fragmentación del ARN poli(A) mediante la RNasa III ...	71
2.2.2 Purificación del ARN fragmentado.....	72
2.2.3 Evaluación del rendimiento y de la distribución de tamaño del ARN fragmentado.....	72

2.3 Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo	73
2.3.1 Hibridación y ligación del ARN fragmentado	73
2.3.2 Transcripción reversa.....	73
2.3.3 Purificación del ADNc.....	74
2.3.4 Selección del tamaño del ADNc	74
2.3.5 Amplificación del ADNc	75
2.3.6 Purificación del ADN amplificado	76
2.3.7 Evaluación del rendimiento y de la distribución de tamaño del ADN amplificado	76
2.4 <i>PCR</i> de emulsión	76
2.4.1 Preparación de la reacción de <i>PCR</i> de emulsión	76
2.4.2 Rotura de la emulsión y lavado de las <i>beads</i>	79
2.4.3 Enriquecimiento de las <i>beads</i> amplificadas	81
2.4.4 Modificación de los extremos 3'	82
2.5 Secuenciación	83
2.6 Análisis computacional de los resultados	87
3. VALIDACIÓN DE RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN DE ARN MEDIANTE <i>PCR</i> CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	89
3.1 Extracción de ARN total.....	89
3.2 Tratamiento con DNasa y precipitación de ARN total.....	90
3.3 Retrotranscripción a ADNc	91
3.4 Reacción de <i>RT-qPCR</i>	94
3.5 Cuantificación relativa de la expresión génica	98
4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS	101
4.1 Homogeneización y extracción proteica total	101
4.2 Determinación de la concentración proteica	101
4.3 <i>Western Blot</i>	104

4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida	104
4.3.2 Transferencia en seco.....	106
4.3.3 Tinción de geles	109
4.3.4 Inmunodetección.....	109
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	114
IV. RESULTADOS.....	115
1. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA	116
1.1 Características clínicas de los pacientes	116
1.2 Análisis de expresión génica	118
1.3 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y la función y remodelado ventricular	124
1.4 Validación por <i>RT-qPCR</i> de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular.....	126
1.5 Análisis proteico de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular.....	127
1.6 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y establecidos marcadores de remodelado cardiaco.....	129
2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA	131
2.1 Características clínicas de los pacientes	131
2.2 Análisis de expresión génica	133
2.3 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y la función y el remodelado ventricular.....	139
2.4 Validación por <i>RT-qPCR</i> de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular.....	140
2.5 Análisis proteico de los genes potencialmente implicados en el proceso de remodelado ventricular.....	141

2.6 Relación entre los niveles de expresión de los genes del colágeno y establecidos marcadores de remodelado cardiaco.....	143
V. DISCUSIÓN.....	145
1. ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA	146
2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS COLÁGENOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA	153
VI. CONCLUSIONES.....	159
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	162
VIII.PUBLICACIONES.....	194