



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



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
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
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
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
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>115</b>
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
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
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
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>162</b>
<b>VIII.PUBLICACIONES.....</b>	<b>194</b>