

ÍNDICE



I. INTRODUCCIÓN	1
1. INSUFICIENCIA CARDÍACA	2
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
2. LA CONTRACCIÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA	19
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

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS -----	56
III. MATERIAL Y MÉTODOS -----	59
1. GRUPOS CLÍNICOS -----	60
2. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE TEJIDO CARDÍACO -----	64
2.1. OBTENCIÓN -----	64
2.2. PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO-----	65
3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO MIOCÁRDICO -----	66
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
4. CARACTERIZACIÓN EN CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES -----	116
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS-----	118
6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO-----	119
IV. RESULTADOS-----	120
1. ESTUDIO SOBRE LAS ALTERACIONES EN LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA-----	121
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
2. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA MEDIANTE MICROARRAYS-----	131
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
3. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CANALES IÓNICOS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN-----	139
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
V. DISCUSIÓN -----	156
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
VI. CONCLUSIONES -----	181
VII. REFERENCIAS -----	183