

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**Expresión diferencial de las moléculas de
adhesión celular en la insuficiencia
cardiaca y su relación con la disfunción
ventricular**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María Dolores García Manzanares

Dirigida por:

Dr. Manuel Portolés Sanz

Dra. Esther Roselló Lletí

Dr. José Terrado Vicente

**VALENCIA
2017**



**HOSPITAL UNIVERSITARIO Y
POLITÉCNICO LA FE**
**Instituto de Investigación Sanitaria
Valencia**

UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA
Moncada, Valencia

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

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

D. JOSÉ TERRADO VICENTE, Profesor Agregado del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia.

INFORMAN:

Que Dña. **MARÍA DOLORES GARCÍA MANZANARES**, Licenciada en Veterinaria por la Universidad CEU Cardenal Herrera, ha realizado bajo nuestra dirección en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, en el grupo 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: “EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA Y SU RELACIÓN CON LA DISFUNCION VENTRICULAR”.

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 25 de Abril de 2017.

Fdo. Dr. Manuel Portolés Fdo. Dra. Esther Roselló Fdo. Dr. José Terrado Vicente

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no habría sido posible sin la ayuda y colaboración de muchas personas, a las que debo mi agradecimiento:

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento más sincero a mis directores de tesis el Dr. Manuel Portolés Sanz, la Dra. Esther Roselló Lletí y el Dr. José Terrado Vicente, por su ayuda indispensable para hacer posible esta tesis. A Manolo, por sus consejos y su buen humor en cualquier circunstancia, a Esther por su disposición y paciencia constantes, y a José por su dedicación siempre presente desde los inicios de mi tesis doctoral.

Al Dr. José Miguel Rivera Otero, director del Grupo de Investigación Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del IIS La Fe, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en un entorno científico y profesional tan excelente, en el que nunca hubiera pensado poder colaborar.

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.

A las Dras. Lina Badimon, Gemma Vilahur y Laura Casaní del ICCC de Barcelona, por haberme acogido en su centro y haberme ayudado durante mi estancia de forma muy productiva y amena.

A mis compañeras del IIS La Fe, Estefanía, Ana, Carolina y a todos los "Colegas", por ayudarme en esta etapa, donde gracias a todos he adquirido unas competencias profesionales pero sobretodo personales por las que nunca olvidaré vuestra ayuda, y por los buenos y divertidos momentos que hemos pasado.

A mis compañeros del "LaboCEU", con los que se inició todo este proceso, Marta, Ana, Laura, Mariola, Tere, María S., María M., Sara, Sole, Cris, Jaime, Juanjo, Violeta, Inma, Rosa, y a Bego, les agradezco su ayuda, sus consejos, su saber escuchar, gracias por haber podido compartir una etapa tan feliz y en la que tuve la oportunidad de aprender tanto y disfrutar de momentos únicos, sois el inicio de todo y gracias a vosotros persistí en el camino hacia esta tesis.

A mis amigas por preguntar, escuchar y ayudarme en todo lo relacionado con la tesis, aunque a veces se sorprendieran de que "todavía estuviera con la tesis" y me hicieran ver que los años han pasado pero las personas no cambian.

Por último, aunque no menos importante, quiero agradecer este trabajo a mi familia, por ser tan comprensivos, dar siempre sin esperar nada a cambio, y apoyarme en los buenos y malos momentos; son y serán el motivo principal de todas mis aspiraciones, y la causa de que alcance las metas que vayan surgiendo. A César muchísimas gracias por su paciencia, apoyo y empeño en mejorar y hacer que todo vaya bien, sea cual sea la circunstancia u obstáculo.

A todos ellos, muchas gracias.

A mi familia

*Empieza por hacer lo necesario,
luego lo que es posible,
y de pronto te encontrarás haciendo lo imposible.*

San Francisco de Asís

RESUMEN

La insuficiencia cardiaca es un síndrome multifactorial cuya incidencia y prevalencia han aumentado en los últimos años, siendo una patología con elevada morbilidad, mortalidad y gasto sanitario. Las miocardiopatías de origen isquémico y dilatado son causas frecuentes de insuficiencia cardiaca, que va acompañada de alteraciones en la función ventricular y dilatación cardiaca. Se han producido importantes progresos en el diagnóstico y tratamiento de este síndrome, sin embargo, el pronóstico no ha mejorado significativamente. Además, se prevé que el incremento de la incidencia se mantenga debido al progresivo envejecimiento de la población y a los avances en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Por todo ello, existe la necesidad de estudiar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren las actuales.

Entre las alteraciones que se producen en la insuficiencia cardiaca, se encuentran los cambios en las moléculas de adhesión. El disco intercalar cardiaco es una región compleja que une cardiomiocitos mediante varios tipos de adhesiones, y es esencial para el acoplamiento eléctrico y mecánico del corazón. En este trabajo nos planteamos estudiar los cambios existentes en la expresión de las moléculas de adhesión en un grupo de pacientes con insuficiencia cardiaca, así como analizar las relaciones de estas alteraciones con la disfunción ventricular que presentan.

Nuestros resultados muestran alteraciones en la estructura del disco intercalar de estos pacientes comparados con miocardio sano. Además, mostramos cambios en la expresión de diversas moléculas adhesión, implicadas en la mayoría de tipos de uniones celulares existentes. De estas moléculas, en la miocardiopatía isquémica encontramos que los niveles aumentados de *PCDHGA3* se relacionan con la disfunción ventricular y las alteraciones hemodinámicas de estos pacientes. En el caso de las alteraciones en la miocardiopatía dilatada, el aumento de la expresión de *GJA3*, *DSP* y *CTNNA3* se relaciona con una mejor función del ventrículo izquierdo. Los cambios en el transcriptoma de esta categoría de moléculas en ambas cardiomiopatías podrían explicar las alteraciones en la estructura miocárdica que afectan a la función cardiaca.

En conclusión, demostramos la presencia de alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión que podrían establecer nuevas bases para el estudio de las adhesiones en el miocardio, así como diana de posibles tratamientos para la mejora de la disfunción cardiaca que sufren estos pacientes.

SUMMARY

Heart failure is a multifactorial syndrome whose incidence and prevalence has increased in recent years, being a pathology with high morbidity, mortality and health expenditure. Cardiomyopathies of ischemic and dilated origin are frequent causes of heart failure, which is accompanied by alterations in ventricular function and cardiac dilatation. Significant progress has been made in the diagnosis and treatment of this syndrome, however, the prognosis has not improved significantly. In addition, the increase in incidence is expected to continue due to the progressive aging of the population and the advances in the treatment of cardiovascular diseases. Therefore, there is a need to study new therapeutic strategies that improve the current ones.

Among the alterations that occur in heart failure, changes in adhesion molecules happen. The intercalated disc is a complex region that links cardiomyocytes through various types of adhesions, and is essential for the electrical and mechanical coupling of the heart. In this work, we intend to study the changes in the expression of adhesion molecules in a group of patients with heart failure, as well as to analyze the relationships of these alterations with the ventricular dysfunction that they present.

Our results show alterations in the intercalar disc structure of these patients compared to healthy myocardium. In addition, we show changes in the expression of various adhesion molecules, involved in most types of cell junctions. Of these molecules, in ischemic cardiomyopathy we found that increased levels of PCDHGA3 are related to ventricular dysfunction and hemodynamic changes in these patients. In the case of alterations in dilated cardiomyopathy, increased expression of GJA3, DSP and CTNNA3 is associated with improved left ventricular function. Changes in the transcriptome of this category of molecules in both cardiomyopathies could explain the alterations in the myocardial structure that affect the cardiac function.

In conclusion, we demonstrated the presence of alterations in the expression of the adhesion molecules that could establish new bases for the study of adhesions in the myocardium, as well as target of possible treatments for the improvement of the cardiac dysfunction that these patients suffer.

ABREVIATURAS

ACC, American College of Cardiology

ACDAI, arteria coronaria descendente anterior izquierda

AHA, American Heart Association

CNT, control

DDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo

DIC, disco intercalar

DSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo

ECG, electrocardiograma

ESC, Sociedad Europea de Cardiología

FA, fracción de acortamiento

FE, fracción de eyección

IC, insuficiencia cardiaca

MA moléculas de adhesión

MCA, miocardiopatía arrítmica

MCAVD, miocardiopatía arrítmica del ventrículo derecho

MCD, miocardiopatía dilatada

MCE, matriz extracelular

MCI, miocardiopatía isquémica

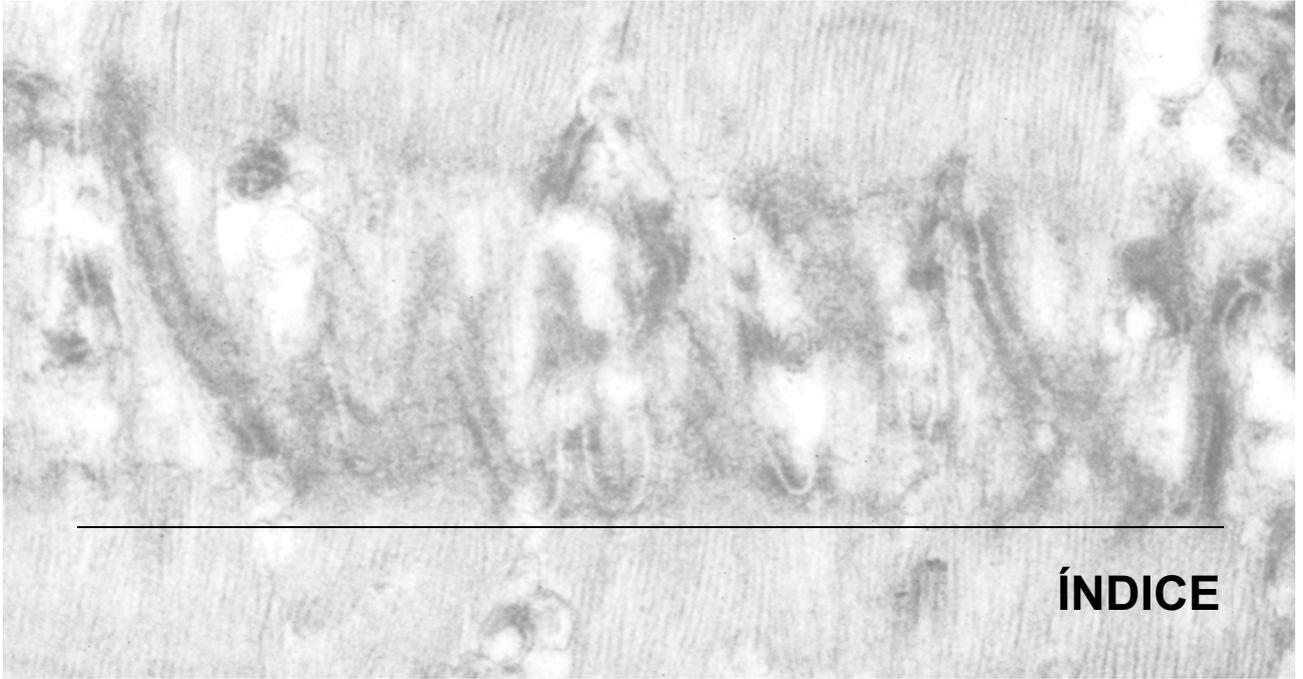
NYHA, New York Heart Association

RNA-seq, secuenciación de ARN

VI, ventrículo izquierdo

NOMENCLATURA

La nomenclatura de los acrónimos para genes y proteínas en el texto siguen las normas establecidas internacionalmente para cada especie (MGI: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>). En la especie humana, los genes se expresan en mayúsculas y cursiva (p.e. *DSP*), mientras que las proteínas se expresan en mayúsculas y sin cursiva (p.e. DSP).



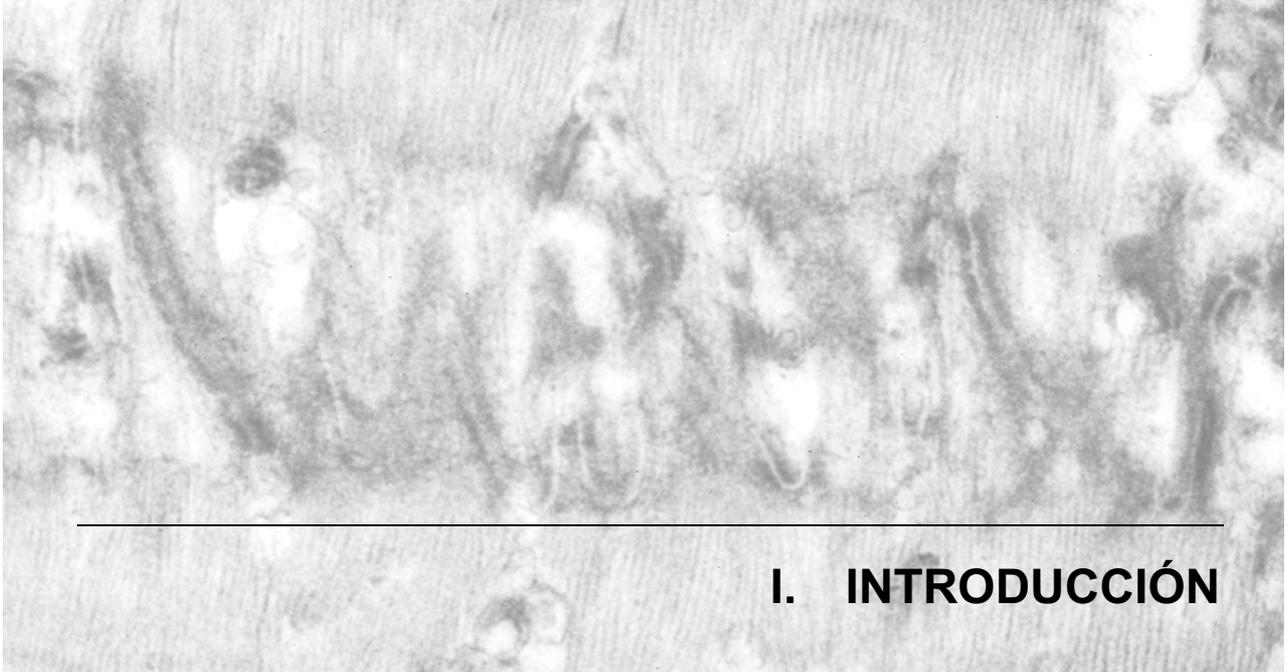
ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. INSUFICIENCIA CARDIACA.....	1
1.1. <i>DEFINICIÓN</i>	1
1.2. <i>ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS</i>	2
1.2.1. Prevalencia e incidencia	2
1.2.2. Diagnóstico y Pronóstico	2
1.2.3. Etiología y Clasificación.....	5
1.2.3.1. Miocardiopatía isquémica	9
1.2.3.2. Miocardiopatía dilatada.....	10
1.3. <i>FISIOPATOLOGÍA</i>	11
2. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.....	13
2.1. <i>FAMILIAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN</i>	13
2.2. <i>TIPOS DE UNIONES CELULARES</i>	17
2.2.1. Uniones célula-célula.....	17
2.2.1.1. Desmosomas	17
2.2.1.2. Uniones adherentes.....	19
2.2.1.3. Uniones estrechas	21
2.2.1.4. Uniones comunicantes o GAP	22
2.2.2. Uniones célula-matriz	22
2.2.2.1. Hemidesmosomas	23
2.2.2.2. Uniones focales	24
2.3. <i>FUNCIONES FISIOLÓGICAS</i>	26
2.3.1. Adhesiones celulares en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular.....	26
2.3.2. Migración celular.....	27
2.3.3. Inflamación y adhesiones celulares.....	27
3. PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA ORGANIZACIÓN DEL MIOCARDIO.....	28
3.1. <i>DISCO INTERCALAR</i>	28
3.1.1. Estructura y tipos de uniones	28
3.1.1.1. Desmosomas en el DIC	29
3.1.1.2. Uniones adherentes en el DIC.....	30
3.1.1.3. Uniones tipo GAP en el DIC	31
3.1.2. Alteraciones del DIC en patologías cardíacas	32

3.2. ADHESIONES ALTERADAS EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	33
3.2.1. Alteraciones genéticas.....	33
3.2.2. Alteraciones adquiridas y estructurales	34
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
III. MATERIAL Y MÉTODOS	43
1. GRUPOS CLÍNICOS	45
2. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE TEJIDO CARDIACO.....	47
2.1. OBTENCIÓN	47
2.2. PROCESADO Y ALMACENAMIENTO.....	48
3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO CARDIACO	49
3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	49
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA	50
3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	52
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	52
3.3.2. Transferencia en seco	53
3.3.3. Tinción de geles.....	54
3.3.4. Inmunodetección	54
3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y ESTRUCTURAL	57
3.4.1. Inclusión en resinas Epon 812.....	57
3.4.2. Corte y tinción de rejillas de cobre.....	57
3.4.3. Análisis estructural mediante microscopía electrónica de transmisión.....	57
3.5. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN DE ARN.....	59
3.5.1. Extracción de ARN poli (A)	60
3.5.2. Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN	62
3.5.2.1 Fragmentación del ARN poli(A) mediante la RNasa III	62
3.5.2.2 Purificación del ARN fragmentado	62
3.5.2.3 Evaluación del rendimiento y la distribución de tamaño del ARN fragmentado.....	63
3.5.3. Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo.....	63
3.5.3.1 Hibridación y ligamiento del ARN	63
3.5.3.2 Transcripción reversa	63
3.5.3.4 Purificación del ADNc.....	63
3.5.3.4 Selección del tamaño del ADNc	64
3.5.3.5 Amplificación del ADNc	64
3.5.3.6 Purificación del ADN amplificado.....	65

3.5.3.7 Evaluación del rendimiento y la distribución de tamaño del ADN amplificado.....	65
3.5.4. Preparación de <i>Templated Beads</i>	66
3.5.4.1. Preparación de la reacción de PCR de emulsión	66
3.5.4.2. Rotura de la emulsión y lavado de las <i>beads</i>	68
3.5.4.3. Enriquecimiento de las <i>templated beads</i>	69
3.5.4.4. Modificación de los extremos 3'.....	70
3.5.5. Secuenciación	70
3.5.6. Análisis computacional de los resultados	73
3.6. <i>CARACTERIZACIÓN EN CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES</i>	75
4. PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES.....	76
4.1. <i>MODELO DE INFARTO DE MIOCARDIO</i>	76
4.1.1. Administración de fármacos	76
4.1.2. Procedimiento quirúrgico	77
4.2. <i>PARÁMETROS DE FUNCIÓN CARDIACA</i>	80
4.3. <i>TINCIÓN CON TETRAZOLIO</i>	81
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	82
6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	83
IV. RESULTADOS	85
1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN.....	87
1.1. <i>ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA</i>	89
1.1.1. Clasificación de las categorías funcionales de genes alterados en la miocardiopatía isquémica.....	93
1.1.2. Relaciones entre las alteraciones en la expresión génica de las adhesiones celulares en los pacientes con MCI y su función ventricular.....	94
1.1.3. Análisis proteico de la protocadherina- γ A3 en los pacientes con miocardiopatía isquémica.....	95
1.2. <i>ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA</i>	96
1.2.1. Análisis de enriquecimiento funcional de las categorías presentes en los genes alterados en la MCD.	99
1.2.2. Estudio de la relación de los niveles de expresión génica de las moléculas de adhesión celular con la función ventricular en la MCD.....	99

2. ESTUDIO DE LA ZONAS DE ADHESIÓN ENTRE CARDIOMIOCITOS Y CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MIOCARDICA EN PACIENTES SANOS Y CON INSUFICIENCIA CARDIACA.....	106
3. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDIACA CRÓNICA.....	108
V. DISCUSIÓN.....	111
1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN	113
2. ALTERACIONES EN LA ULTRAESTRUCTURA DEL MIOCARDIO Y EN LAS ZONAS DE ADHESIÓN EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA.....	119
3. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDIACA CRÓNICA.....	120
VI. CONCLUSIONES.....	123
VII. ANEXOS.....	127
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	135



I. INTRODUCCIÓN



1. INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1. DEFINICIÓN

La insuficiencia cardiaca (IC) ha recibido diversas definiciones en los últimos años debido a la complejidad de aspectos que abarca este síndrome. Anteriormente, la insuficiencia cardiaca era conocida como una condición patológica y definida como “un estado patológico del corazón en el cual, a pesar de un adecuado llenado ventricular, el *output* cardiaco está disminuido o es incapaz de bombear sangre en una proporción adecuada para satisfacer las necesidades de los tejidos, y permitir que los parámetros funcionales permanezcan dentro de los límites normales” (Denolin et al. 1983).

Más recientemente, en las Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología se refiere a la insuficiencia cardiaca como “un síndrome en el que los pacientes presentan síntomas de IC, típicamente falta de aire o fatiga tanto en reposo como durante el ejercicio, o inflamación de tobillos y evidencia objetiva de disfunción cardiaca en reposo”. El diagnóstico es complejo ya que nunca debe ser único, sino la suma de síntomas, evidencias objetivas y respuesta al tratamiento dirigido a la IC (Swedberg et al. 2005).

Además, existen diferentes tipos de IC en base a la aparición de los síntomas, las regiones afectadas y las diferencias en la funcionalidad cardiaca. La IC aguda se caracteriza por una rápida aparición de síntomas y signos, una función cardiaca anormal, pudiendo existir o no una enfermedad cardiaca previa. En cambio, en la IC crónica, la forma más común, aparecen con frecuencia exacerbaciones agudas ocasionales. Ésta es la referida en la definición descrita anteriormente y en la que nos centraremos en el desarrollo de este trabajo. Otros términos en relación a los tipos de IC son el fallo cardiaco derecho e izquierdo, según la presencia predominante de congestión de venas sistémicas o pulmonares. En el caso de la IC sistólica hay una alteración evidente de la contractilidad ventricular dando lugar a reducciones en el volumen de eyección, mientras que en la IC diastólica existe un problema en la relajación ventricular comprometiendo el llenado. En la mayoría de los casos, la disfunción sistólica y diastólica no deben considerarse como entidades fisiopatológicas separadas, ya que coexisten en mayor o menor grado en un alto número de pacientes (McMurray et al. 2012; Swedberg et al. 2005).



1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.2.1. Prevalencia e incidencia

Según los últimos datos referenciales, 5,7 millones de estadounidenses de 20 años o más sufren de IC, así como un total de 23 millones de personas afectadas en todo el mundo. La prevalencia de IC es similar en ambos sexos, al igual que la incidencia a nivel global. Las últimas predicciones muestran un incremento de la prevalencia de un 46 % desde 2012 a 2030, resultando en más de 8 millones de personas afectadas de IC en EEUU (Mozaffarian et al. 2016).

En España, la IC arroja cifras de prevalencia de un 5%, superando el 2% que se da en EEUU y el resto de países europeos. Este elevado número de casos en España es consecuencia del envejecimiento progresivo de la población. Los recursos sanitarios destinados a la IC son de gran importancia: se trata de la primera causa de hospitalización de mayores de 65 años, representando además el 3% de todos los ingresos hospitalarios (Sayago-Silva et al. 2013).

Los avances en la prevención primaria de la IC podrían llevar a una reducción de la incidencia, mientras que las mejoras en la asistencia médica resultarían en una supervivencia mayor, aumentando así la prevalencia (Roger, 2013).

1.2.2. Diagnóstico y Pronóstico

La complejidad del síndrome ha dificultado el diagnóstico requiriendo diversas modificaciones en los criterios a seguir en las guías clínicas. Factores individuales que frecuentemente son comorbilidades de la IC agravan los síntomas y pueden interferir en los tratamientos farmacológicos. La isquemia miocárdica es un importante factor de riesgo en la IC, pudiendo duplicar el riesgo en pacientes que hayan sufrido un infarto de miocardio previo. Frecuentemente, también aparecen la hipertensión, la edad avanzada y el sexo masculino como factores de riesgo en pacientes con IC. La diabetes mellitus es un importante factor de riesgo ya que produce una alteración en el endotelio vascular de la microcirculación coronaria y cambios hormonales y metabólicos que pueden aumentar el riesgo de sufrir IC hasta 5 veces. También la obesidad es un factor de riesgo conocido, ya que aumenta el riesgo aterogénico además de alterar las condiciones de carga cardíaca y puede producir activación neurohormonal y deficiencia natriurética. Otros factores como la enfermedad pulmonar



obstructiva crónica (EPOC), los accidentes cerebrovasculares, el tabaquismo, la dislipemia, el estrés o la depresión son menos frecuentes e inconstantes en los pacientes con IC. Por todo ello, estas comorbilidades son de gran importancia en este síndrome dando lugar a falsos positivos en el diagnóstico (Cowie et al. 1997) y van a determinar el pronóstico de los pacientes (Ponikowski et al. 2016).

Los síntomas de IC son frecuentemente inespecíficos, mientras que los signos, más específicos, presentan mayores dificultades a la hora de su detección. Los síntomas tradicionales son la disnea paroxística nocturna y la ortopnea, que se van a dar en pacientes con IC más avanzada y síntomas más graves. Por otro lado, la retención de agua y sodio en estos pacientes que ocasiona edemas periféricos, es un signo no específico de la IC. La identificación de signos más específicos como la presión venosa yugular elevada son más difíciles de detectar (Kelder et al. 2011). Existen algunas pruebas esenciales en el diagnóstico que resultan de gran utilidad como la determinación de péptidos natriuréticos (Cowie et al. 1997; Cortes et al. 2007), electrocardiograma y ecocardiograma (Kirkpatrick et al. 2007). Para orientar en el diagnóstico de la IC debido a su complejidad, se han desarrollado algoritmos, como el que se muestra en la Figura 1.

Las reducciones en la mortalidad de la IC documentadas en los últimos años están determinadas por la mejora en la prevención de los factores de riesgo y la implementación de tratamientos efectivos como los beta-bloqueantes, IECAs y estrategias terapéuticas como la revascularización, cardioversión y resincronización (Mozaffarian et al. 2016).

La IC mantiene unas tasas de mortalidad elevadas a corto plazo, a pesar de los avances en la prevención y tratamiento. Según datos del estudio Framingham, con una cohorte de datos monitorizados durante 50 años, la mortalidad a 5 y 10 años es del 65% y 85% en varones y del 47% y 71% en mujeres, cuando la mortalidad media de todos los cánceres es del 50% (Ho et al. 1993; Levy et al. 2002). En otros estudios se revelan datos que mejoran ligeramente el pronóstico, aunque siguen mostrando que solo 1 de cada 3 pacientes hospitalizados por IC sobrevive más de 5 años (Joffe et al. 2013).

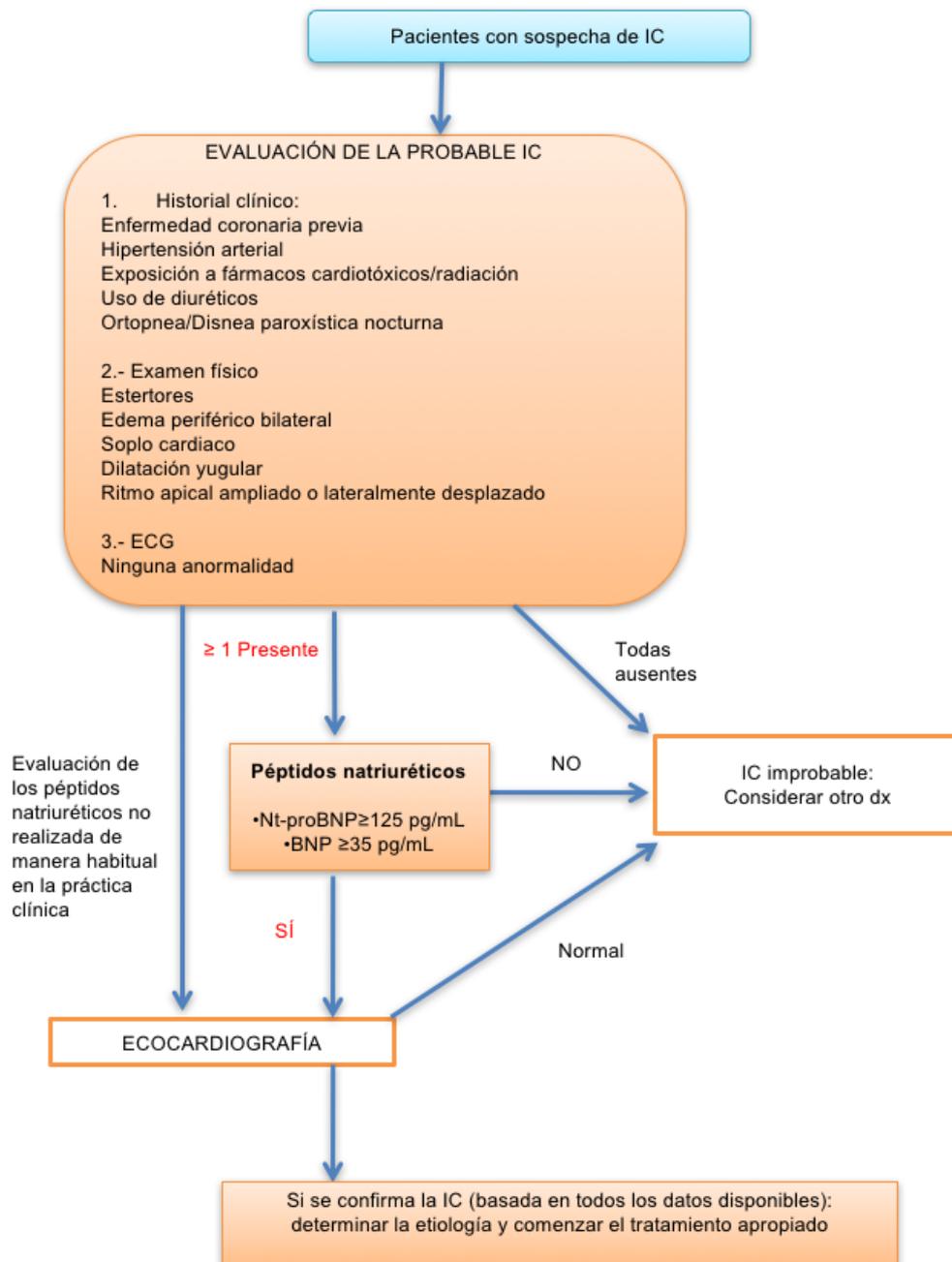


Figura 1. Algoritmo para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca o disfunción ventricular. (Modificada de *Ponikowski et al.* 2016). BNP: péptido natriurético tipo B; CAD: enfermedad coronaria; HF: insuficiencia cardiaca; MI: infarto de miocardio; NT-proBNP: N-terminal péptido natriurético pro-tipo B.



En España, la IC es la tercera causa de mortalidad por enfermedad cardiovascular en España (Boix Martínez et al. 2002) y dado su curso crónico, representa hasta el 2% del coste sanitario total, mayoritariamente por los prolongados períodos de hospitalización (Rodríguez-Artalejo et al. 2004). Los ingresos tienen lugar en personas mayores de 65 años, sobre todo, con múltiples comorbilidades y con una dependencia importante, según el índice de Barthel, que mide las capacidades básicas y determina el grado de dependencia de una persona (Solís et al. 2005). La hospitalización representa un punto de inflexión en la historia del paciente y marca un umbral que predice un peor resultado. Tras un episodio agudo de IC, al alta hospitalaria, los pacientes tienen un riesgo entre el 30% y 50% de desarrollar un nuevo episodio poco después (Rodríguez-Artalejo et al. 1997; Ruiz-Romero et al. 2016).

Dado que los costes anuales de los pacientes con IC son tan elevados como los de otras patologías crónicas, como el ictus o el Alzheimer, es importante actuar precozmente para prevenir la progresión hasta formas muy sintomáticas, ya que requieren mayores costes sociales y sanitarios (Delgado et al. 2014).

1.2.3. Etiología y Clasificación

Las cardiomiopatías se definen como patologías del miocardio asociadas a disfunción cardíaca. La enfermedad coronaria y la hipertensión se han considerado las principales causas etiológicas de cardiomiopatía en países desarrollados, mientras que las infecciones y enfermedades relacionadas con la nutrición serían las causantes de cardiopatías en el tercer mundo (Tavazzi, 2001). Mientras que la hipertensión predomina como factor de riesgo en mujeres, el infarto de miocardio produce insuficiencia cardíaca en mayor proporción en hombres (Levy et al. 2002). En la Tabla 1 se muestran las principales causas de IC y algunos ejemplos comunes en clínica.

Las causas predisponentes de IC son también consideradas los factores de riesgo, es decir, que su aparición está asociada a una mayor probabilidad de sufrir IC, aún sin síntomas ni cardiomiopatías previas. La miocardiopatía isquémica es la principal, con un riesgo 10 veces mayor de desarrollar IC transcurrido un año post-infarto al comparar con la población normal. Otras alteraciones estructurales que alteren la fisiología del corazón como la miocardiopatía dilatada o las cardiomiopatías congénitas son también etiologías predisponentes pero menos frecuentes en la población (Segovia-Cubero et al. 2004).

**Tabla 1.** Principales factores etiológicos en la insuficiencia cardíaca.

Causas	Ejemplos
<u>Causas predisponentes</u>	
Etiológicas	Cardiopatías isquémicas, cardiopatías congénitas
Probablemente etiológicas	HTA, diabetes, historia de fiebre reumática
No etiológicas	Edad, sexo masculino, obesidad, tabaquismo
<u>Causas determinantes</u>	
Miocardiopatías	
I. Primarias	Miocardiopatía dilatada, hipertrófica, restrictiva
II. Secundarias	Miocardiopatía isquémica, infecciosa, tóxica, metabólica
Sobrecarga ventricular	
I. de presión	HTA, estenosis aórtica/pulmonar, hipertensión pulmonar
II. de volumen	Insuficiencias valvulares, cortocircuitos
Llenado ventricular alterado	Hipertrofia ventricular, estenosis mitral/tricúspide, tumores, taponamiento, pericarditis constrictiva
Arritmias	Bradicardia, taquicardia, taquimiocardiopatía
<u>Causas precipitantes</u>	
Cardiacas	Arritmias, isquemia miocárdica, fármacos inotrópicos negativos: antagonistas del calcio, bloqueadores beta, antiarrítmicos, otros
Extracardiacas	Infecciones, incumplimiento del tratamiento, embolia pulmonar, anemia, fármacos (AINE), cirugía, esfuerzo, tóxicos

HTA: hipertensión arterial; AINE: antiinflamatorio no esteroideo (*extraída de Segovia-Cubero et al., 2004*).

Las comorbilidades, enumeradas anteriormente, están muy relacionadas con la incidencia de IC, sin embargo, no existe una relación causal demostrada en todas ellas que implique directamente una disfunción ventricular.

Para determinar el estado clínico de los pacientes, se clasifican los síntomas según las clases funcionales de la New York Heart Association (NYHA) (1994) definidas conjuntamente por la American College of Cardiology (ACC) y la American Heart Association (AHA):

-Clase I: Sin limitación para la actividad física. La actividad física normal no



causa excesiva disnea, fatiga o palpitaciones.

- Clase II: Ligera limitación para la actividad física. Cómodo en reposo, pero la actividad física normal resulta en excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
- Clase III: Marcada limitación para la actividad física. Cómodo en reposo, si bien una actividad física menor que lo normal resulta en excesiva disnea, fatiga o palpitaciones
- Clase IV: Incapacidad para mantener actividad física sin molestias. Puede haber síntomas en reposo. Si se realiza alguna actividad física, las molestias aumentan.

El estado clínico justifica la hospitalización y su empeoramiento supone un alto riesgo de muerte, pero en ocasiones la función ventricular está muy alterada, sin llegar a existir síntomas graves en los pacientes. Por ello, en 2001 la ACC/AHA propusieron una nueva clasificación para la IC, en la cual se tienen en cuenta los factores de riesgo y las alteraciones estructurales del corazón, y consta de cuatro etapas:

- Etapa A: pacientes asintomáticos, sin cardiopatía estructural, pero con factores de riesgo para insuficiencia cardíaca.
- Etapa B: pacientes asintomáticos, pero con daño estructural cardíaco.
- Etapa C: pacientes con síntomas de IC y daño cardíaco.
- Etapa D: representa el estadio final o situación de enfermedad refractaria.

Las etapas A y B se corresponderían con la clase I de la NYHA, al tratarse de pacientes asintomáticos. En el resto de etapas, los estados se caracterizan por ser progresivos e irreversibles, de forma que no hay vuelta a una etapa previa una vez progresado. Cada una de estas progresiones a etapas más avanzadas de la IC, supone una disminución de la supervivencia de 5 años y un incremento en las concentraciones plasmáticas de péptido natriurético (Ammar et al. 2007).

Recientemente, se ha propuesto una nueva clasificación denominada MOGE(S), que se basa en las características morfológicas, afectaciones orgánicas, causas genéticas y etiologías específicas (Arbustini et al. 2013). Desde hace 50 años, la clasificación de las cardiomiopatías en subcategorías basadas en la morfología



ventricular y su función se ha mantenido útil, porque se relaciona fácilmente con las manifestaciones clínicas y estrategias terapéuticas (Elliott 2013). La clasificación originalmente las ha agrupado en miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía hipertrófica (MCH), miocardiopatía restrictiva (MCR) y miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MCAVD) (Richardson et al. 1996).

Los avances en el conocimiento de la patofisiología y las causas subyacentes de las cardiomiopatías han permitido modificar esta clasificación, ya que se ha descubierto la relación de mutaciones con algunas cardiomiopatías o la distinción entre cardiomiopatías primarias y secundarias. En la Figura 2 se muestra una de las clasificaciones recientes, que sigue manteniendo la orientación clínica pero incluye las cardiopatías genéticas y las relacionadas con otras patologías (Elliott et al. 2008a).

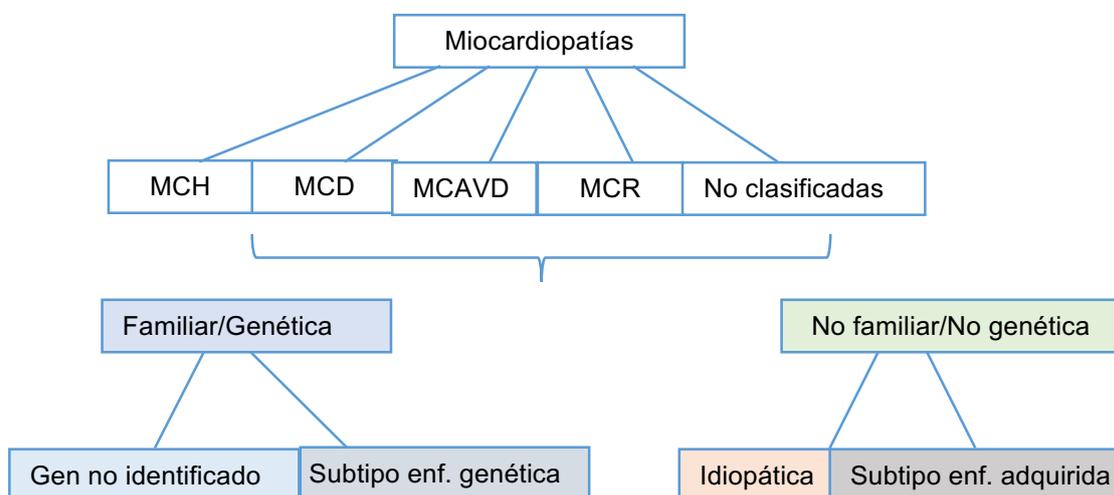


Figura 2. Clasificación de las cardiomiopatías (extraída de *Elliott et al.*, 2008). MCH: miocardiopatía hipertrófica; MCD: miocardiopatía dilatada; MCAVD: miocardiopatía arritmica del ventrículo derecho; MCR: miocardiopatía restrictiva.

Debido a la gran variedad de causas de IC que existen, no se puede realizar un *screening* de todas ellas para llegar al diagnóstico etiológico. Por ello, es útil conocer cuáles son las etiologías más frecuentes y tenerlas en cuenta a la hora de realizar la anamnesis y el examen clínico de los pacientes. Una de las clasificaciones etiológicas de la IC más comunes y utilizadas en el ámbito clínico es la que divide en pacientes con IC de origen isquémico (MCI) y miocardiopatía dilatada idiopática no isquémica (MCD). En esta tesis, nos hemos centrado en el estudio de los pacientes que presentaban estos dos tipos de cardiomiopatías.



1.2.3.1. Miocardiopatía isquémica

Se entiende por MCI la patología producida por una isquemia miocárdica generalmente causada por la aterosclerosis coronaria (Harrison et al. 2002). Las placas ateroscleróticas pueden afectar a las arterias, dando lugar a problemas en las situaciones en las que el miocardio necesita un aporte de oxígeno adicional como por ejemplo durante el esfuerzo físico (Figura 3). Si el aporte no es suficiente, se establece la isquemia y las respuestas compensatorias generadas por el sistema cardiovascular producen más daños. La progresión de la isquemia da lugar a alteraciones metabólicas, disfunción ventricular y angina (Fox et al. 2005). Como consecuencias, se pueden producir muertes súbitas por arritmias, o establecerse una fase crónica de la patología que conducirá a una IC.

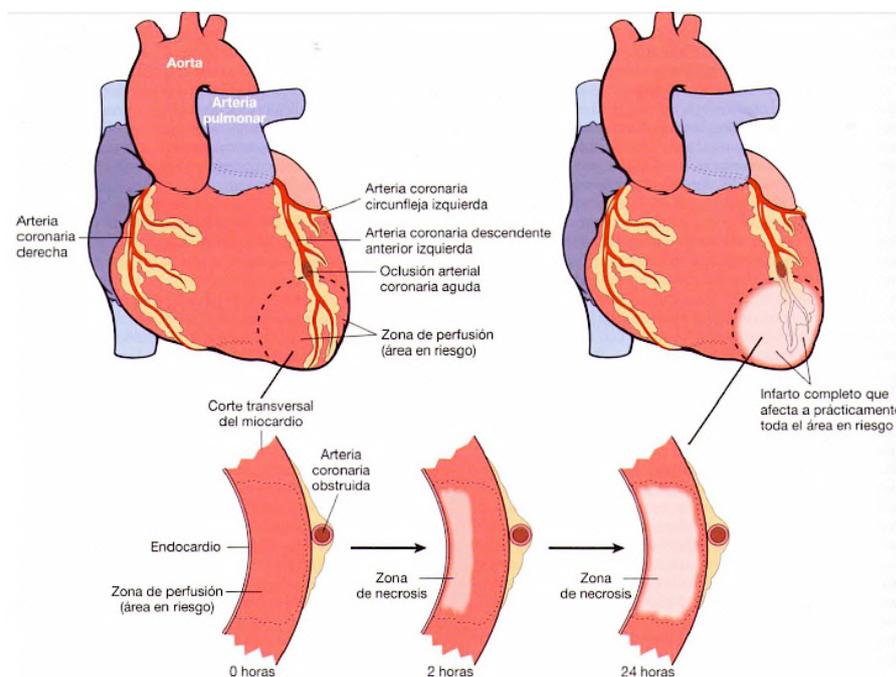


Figura 3. Esquema de la secuencia de pasos en la MCI. La progresión de la necrosis tras la oclusión coronaria comienza en una zona pequeña (extraída de *Robbins Patología humana*, 2013, 9ª edición).



1.2.3.2. Miocardiopatía dilatada

La MCD se define por la dilatación y disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, que es producida por un daño continuado en el miocardio. En las formas adquiridas, el daño al miocardio se produce como consecuencia de tóxicos o procesos inflamatorios (Maron et al. 2006). Los casos de MCD isquémica son cada vez más frecuentes, ya que la mortalidad por infarto ha disminuido, pero no todos los pacientes con enfermedad coronaria van a tener dilatación ventricular. El daño ocasionado por varios agentes va a producir fibrosis y pérdida de cardiomiocitos, que sumado a la habitual dilatación de las cuatro cavidades y la disminución del grosor de las paredes llevan a una comprometida contracción y función ventricular (Figura 4) (Richardson et al. 1996).

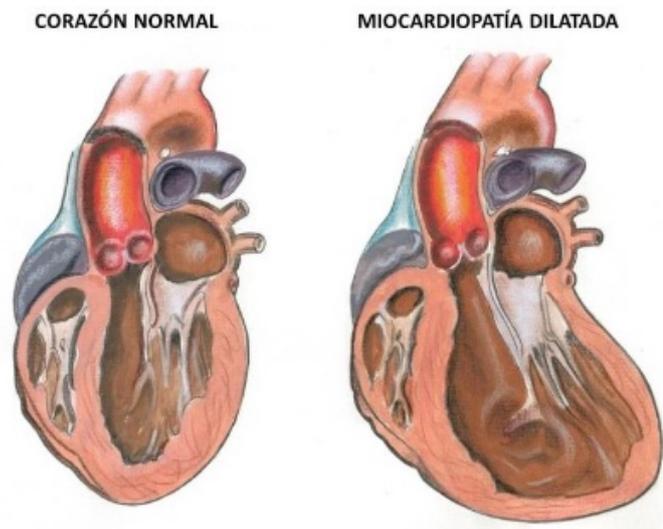


Figura 4. Dilatación cardíaca en la MCD comparando con un corazón normal (extraída de <http://cardiosaudeferrol.com/category/otras/>)



1.3. FISIOPATOLOGÍA

La evolución desde el proceso de disfunción ventricular hasta la IC tiene lugar en varias fases de forma dinámica. Inicialmente, se produce un daño en el miocardio que puede ser originado por diversas causas y que ocasiona un descenso del gasto cardiaco y una serie de alteraciones hemodinámicas. Las miocardiopatías, miocarditis o enfermedades metabólicas son causantes de un daño directo en el miocardio, mientras que las sobrecargas de presión (por hipertensión o estenosis aórtica/pulmonar) y las restricciones de llenado de los ventrículos (por MCR) son también causantes de disfunción ventricular pero no iniciada de forma directa en el miocardio (Tanai y Frantz 2015). Los mecanismos de compensación que surgen en respuesta a estas alteraciones serían los que precipitarían el avance de la disfunción ventricular a IC. Según el modelo hemodinámico, para el mantenimiento de la presión arterial se desencadena una reacción de defensa compuesta por una serie de componentes como la retención de agua y sodio, la vasoconstricción y la estimulación cardiaca, que, a pesar de ser mecanismos para promover la homeostasis, son dañinos a largo plazo (Buglioni y Burnett 2015). En la hipótesis neurohormonal, se enuncia que *“La IC progresa porque sistemas neurohormonales activados por un daño inicial al corazón ejercen un efecto perjudicial sobre la circulación (vasoconstricción y retención de sodio y agua). El efecto se presenta porque la activación neurohormonal incrementa las anomalías hemodinámicas de la IC o porque tal activación ejerce un efecto tóxico directo sobre el miocardio”* (Packer, 1992).

La inflamación también se ha propuesto como posible factor desencadenante de IC. El miocardio puede producir citoquinas proinflamatorias (como el TNF- α) y algunas evidencias sugieren que esta producción puede incrementarse, como sucede en la IC. Por otro lado, la translocación de endotoxinas bacterianas desde el intestino, suceso que se produce en pacientes con IC, puede a su vez activar el sistema inmune y derivar en la mayor producción de citoquinas inflamatorias. Una vez activada la inflamación, el efecto nocivo de estos marcadores inflamatorios puede ser actuar sobre el miocito, el intersticio miocárdico o incluso en ambos. Algunos marcadores no están presentes antes del inicio de la IC, pero una vez establecida aparecen y tienen un efecto nocivo sobre el miocardio y generalizado en el organismo, progresando así la IC (Sánchez-Lázaro et al. 2008). Finalmente, se ha comprobado que los procesos patológicos que pueden producir una inflamación de bajo grado, sean factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo) o no,



tendrían un efecto nocivo directo sobre el miocardio y por lo tanto se consideran factores de riesgo independiente para el desarrollo de IC (Willerson y Ridker 2004).

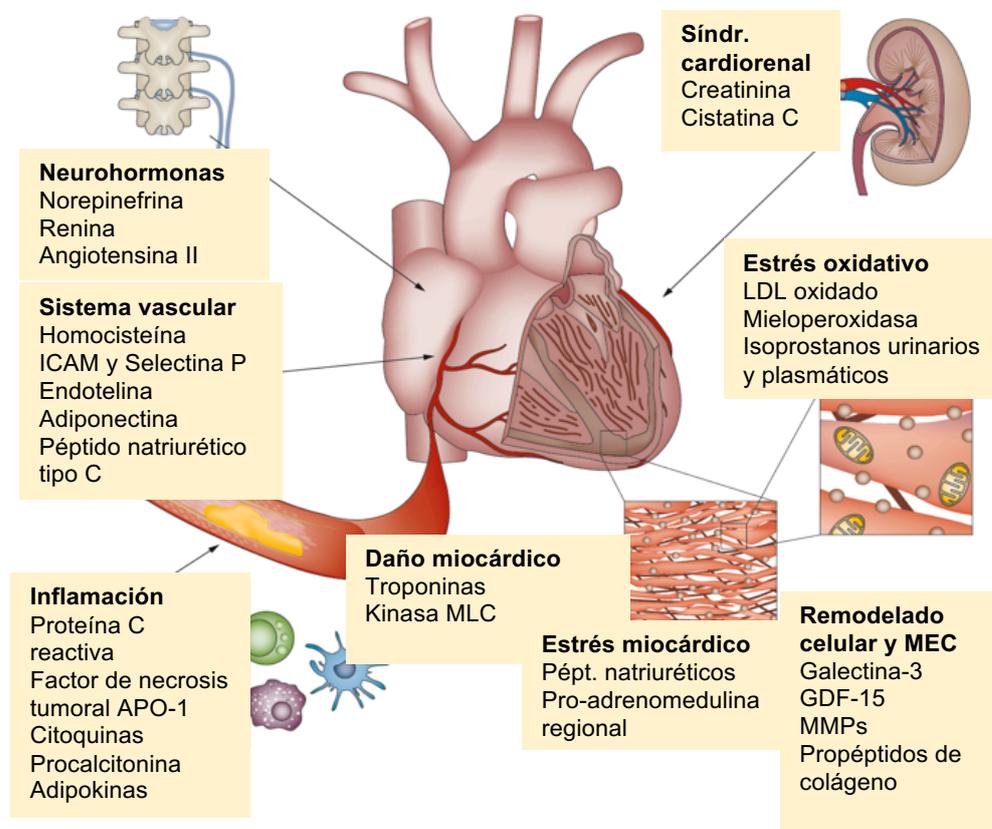


Figura 5. Mecanismos fisiopatológicos de la IC (adaptado de *Ahmad et al., 2012*). La IC es un síndrome sistémico que implica procesos inflamatorios, disfunción renal y activación neurohormonal. Existen diversos biomarcadores tanto clásicos como más recientes, que pueden clasificarse según los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo y progresión de la IC. APO: antígeno de apoptosis; GDF: factor de crecimiento diferencial; ICAM: molécula de adhesión intercelular, LDL: lipoproteína de baja densidad, MLC: cadena ligera de miosina, MMPs: metaloproteinasas de la matriz extracelular.

El remodelado ventricular es el proceso por el cual todos estos factores hemodinámicos, neurohormonales, inflamatorios y genéticos desencadenan unas alteraciones en el ventrículo en un intento de adaptación y compensación del daño miocárdico producido. La progresión de estos cambios en el ventrículo resulta en reducción de miocitos, dilatación, fibrosis, acúmulo de matriz intersticial e hipertrofia de la pared entre otros. Estos acontecimientos activan los sistemas de regulación nombrados anteriormente, aunque es difícil ordenar la secuencia cronológica al tratarse de un proceso interactivo (Rivera et al. 2004).



2. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Entre los procesos más importantes encargados de regular y mantener la estructura tisular se encuentran las adhesiones célula-célula, célula-matriz y adhesiones selectivas. A través de la unión ligando-receptor, las moléculas de adhesión (MA) constituyen varios tipos de adhesiones específicas en los tejidos, situándose en las membranas celulares. Durante el desarrollo de esta tesis se ha estudiado la expresión de las MA en el miocardio de individuos sanos y los cambios producidos en pacientes con insuficiencia cardiaca, mostrando variaciones en los niveles de éstas y destacando la presencia de nuevas moléculas implicadas en la función ventricular.

2.1. FAMILIAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Existen 5 familias de MA agrupadas por características químicas, funcionales y estructurales similares (Tabla 2): integrinas, inmunoglobulinas, selectinas, receptores leucocitarios y cadherinas (Freemont y Hoyland, 1988). Pueden ser clasificadas también según su relación con el calcio; de este modo cadherinas, selectinas e integrinas pertenecerían a las familias de moléculas de adhesión dependientes de calcio, y las inmunoglobulinas y otras familias de adhesión a moléculas inflamatorias no dependientes de calcio (Takeichi, 1991).

Las integrinas son una gran familia de receptores heterodiméricos localizados en la superficie celular cuya función es la de integrar la matriz extracelular (MEC) con el citoesqueleto intracelular para mediar la migración celular y la adhesión. Existen subunidades α y β que se combinan formando dímeros organizados en complejos específicos de cada tejido (Kreidberg y Symons, 2000). Muchas son receptores para proteínas de la MEC como fibronectinas, lamininas y colágenos, mientras que otras participan en la adhesión celular heterofílica, especialmente en leucocitos, uniéndose a cadherinas e inmunoglobulinas. Juegan un papel central en la adhesión celular a la membrana basal, en la polarización y en la migración celular a través de la MEC y en la transducción de señales intracelulares. Por lo tanto, las integrinas son cruciales tanto para la diferenciación celular y la regulación de los linfocitos, como para el desarrollo, y en algunas funciones del sistema inmune (Springer et al. 1994).

La superfamilia de las inmunoglobulinas se caracterizan por ser largas glucoproteínas de la membrana plasmática cuya principal función es la adhesión célula-célula, estando además implicadas en diferentes procesos biológicos y siendo



expresadas por numerosos tipos celulares. Constan de un número variado de dominios (Walsh y Doherty, 1997) un dominio extracelular largo, un único segmento transmembrana helicoidal y un dominio citoplasmático (Aplin et al. 1998). Se trata de una gran familia de moléculas de adhesión celular (CAMs) siendo el miembro más representativo N-CAM, presente en la superficie de células nerviosas y en las células de glía (Garner et al. 1986). También hay un grupo de CAMs responsables de la adhesión de las células circulantes de la sangre (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos) con el endotelio vascular como ICAM-1 o VCAM-1. Otros miembros de esta familia son las moléculas de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad, CD8, expresado por los linfocitos T8 citotóxicos, CD4, presente en los linfocitos T4 auxiliares.

Las selectinas son proteínas transmembrana de tipo I que median las adhesiones leucocitarias a células endoteliales (Harpaz y Chothia 1994). Establecen interacciones heterotípicas y transitorias que son el paso previo a las uniones más fuertes mediadas por integrinas. Diferentes tipos de selectinas se expresan en leucocitos, células endoteliales y plaquetas (McEver, 2015). La selectina E interviene esencialmente en la adhesión y la migración de los neutrófilos a las células endoteliales. La selectina P, inicialmente localizada en plaquetas (Bonfanti et al. 1989), está relacionada con la trombosis y la hemostasis. Finalmente, la selectina L, está implicada en el reconocimiento de los linfocitos y en la adhesión de los monocitos y los neutrófilos a las células endoteliales.

La superfamilia de las cadherinas es muy numerosa, conteniendo hasta 80 miembros (Yagi y Takeichi 2000) incluidos en varias subfamilias destacadas como las cadherinas clásicas, cadherinas desmosomales, protocadherinas, y otras cadherinas no tan comunes (Garrod y Chidgey 2008). Son glucoproteínas transmembrana que establecen uniones homofílicas entre células adyacentes (Takeichi, 1988). La homología entre las cadherinas de diversos tejidos es elevada, sobretudo en la región citoplasmática, importante para el mantenimiento de la morfología celular. En el estudio de las cadherinas clásicas se han clasificado según su expresión más abundante, determinando la E-cadherina (epitelial), N-cadherina (neuronas), P-cadherina (placenta) y V-cadherina (tejido vascular) (Yap et al. 1997). Las cadherinas desmosomales son especialmente importantes en las fuertes uniones que proporcionan los desmosomas a los tejidos, tratándose principalmente de desmogleínas y desmocolinas que interactúan con otros componentes de estas uniones celulares. La subfamilia de protocadherinas es la más numerosa y se expresa fundamentalmente en el sistema nervioso. Existen 3 grupos denominados α (PCDHA),



β (PCDHB) y γ (PCDHG) que se expresan de forma combinada en la superficie celular otorgando una gran especificidad a las interacciones homofílicas que establecen con otras células. Algunas de sus implicaciones en las células sobretodo en neuronas, están relacionadas con el desarrollo y el reconocimiento neuronal (Chen y Maniatis 2013).



Tabla 2. Principales moléculas de adhesión (adaptada de Rosell et al., 2004).

Denominación	Distribución celular	Ligandos
β1- Integrinas		
α 1 β 1	L-T activados	Colágeno, laminina
α 2 β 1	L-B, Mo, P	Colágeno, laminina
α 3 β 1	Amplia(B)	Fibronectina, colágeno
α 4 β 1	Leucocitos y melanocitos	VCAM-1, fibronectina
α 5 β 1	Amplia (L-T, L-B, Mo, etc.)	Fibronectina
α 6 β 1	Mo, P, L-T	Laminina
α 7 β 1	Músculo, melanocitos	Laminina
α 8 β 1	SNC, melanocitos	
α v β 1	Epitelio, riñón	Vitronectina, fibronectina
β2- Integrinas		
α L β 2	Panleucocitaria	ICAM-1,2,3
α M β 2	G y Mo	C3bi, fibrinógeno, CAM-1
α X β 2	Macrófagos, Mo, L-T	C3bi, fibrinógeno
Inmunoglobulinas		
CD31(PECAM-1)	L-B, G, Mo	PECAM-, α V β 3
CD50 (ICAM-3)	Leucocitos	Integrina β 2
CD54 (ICAM-1)	Células endoteliales activadas	Integrina β 2
CD56 (NCAM)	Células NK	
CD102 (ICAM-2)	Linfocitos y Mo	
CD106 (VCAM-1)	Células endoteliales activadas	Integrina α 4
Selectinas		
CD62L (L-selectina)	Leucocitos	Lewis-X
CD62E (E-selectina)	Endotelio	Adresinas
CD62P (P-selectina)	P, endotelio	Lewis-X sializado
CD44 (receptor linf)	Amplia	Ácido hialurónico
Cadherinas		
E-cadherina	Células epiteliales y Langerhans	E-cadherina
M-cadherina	Células musculares	M-cadherina
N-cadherina	Tejido neural, cristalino	N-cadherina
P-cadherina	Retina	P-cadherina
T-cadherina	Tejido nervioso, muscular, retina	T-cadherina
VE-cadherina	Células endoteliales	VE-cadherina
OB-cadherina	Osteoblasto	
Ksp-cadherina	Riñón	
H-cadherina	Células normales	

G: granulocitos, ICAM: molécula de adhesión intercelular, L-B, T: linfocitos B, T, Mo: monocitos, P: plaquetas, PECAM: molécula de adhesión plaquetaria, VCAM: molécula de adhesión celular vascular.



2.2. TIPOS DE UNIONES CELULARES

2.2.1. Uniones célula-célula

Existen 4 tipos de estructuras de adhesión célula-célula: desmosomas, uniones adherentes, uniones estrechas u oclusivas y uniones comunicantes o *gap junctions*.

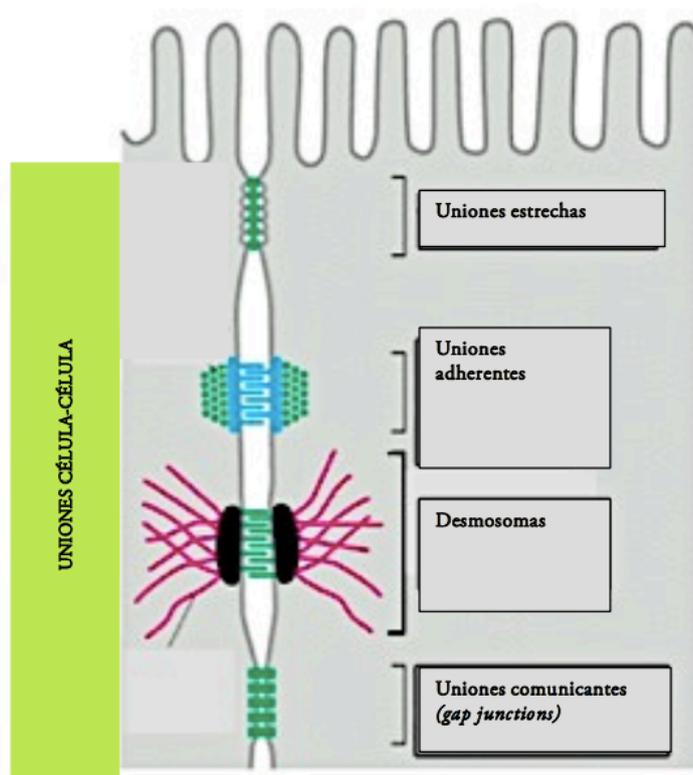


Figura 6. Tipos de uniones célula-célula (extraída de <http://www.slideshare.net/isbel66/uniones-celulares-7095552>).

2.2.1.1. Desmosomas

Las uniones entre células que establecen los desmosomas son probablemente las de mayor fuerza de adhesión, debido a las interacciones no covalentes entre sus componentes moleculares (Holthöfer et al. 2007). Este tipo de uniones son cruciales en tejidos que soportan un gran estrés mecánico, como el miocardio o la piel (Green & Simpson 2007). Además de su papel en la adhesión celular, también se han descrito en los últimos años como participantes en rutas de señalización de procesos como la proliferación y la migración celular (Johnson et al. 2014).



La estructura de los desmosomas (Figura 7) está basada en 3 familias diferentes de MA: cadherinas (desmogleínas y desmocolinas), proteínas armadillo (placofilinas y placoglobinas) y plaquinas (desmoplaquina mayoritariamente). Las cadherinas desmosomales son proteínas transmembrana dependientes de calcio que establecen acoplamientos entre células adyacentes (Garrod y Chidgey 2007). Intracelularmente, los dominios citoplasmáticos de las cadherinas interaccionan con las proteínas armadillo y éstas con la desmoplaquina, proporcionando un nexo entre las cadherinas de membrana y los filamentos intermedios (Harmon y Green 2013; Holthöfer et al. 2007).

Las placofilinas (PKPs) reclutan desmoplaquina en los desmosomas incrementando la expresión de moléculas desmosomales y por lo tanto estabilizando los complejos de adhesión desmosomal (Harmon y Green 2013). La desmoplaquina es el componente más abundante en los desmosomas y desarrolla un papel crucial en el mantenimiento de la integridad de los tejidos, así como en la estabilización de otras uniones como las uniones adherentes (Holthöfer et al. 2007). Las alteraciones en los componentes estructurales de los desmosomas, incluyendo las genéticas, producen diversos tipos de patologías como cardiomiopatías, enfermedades cutáneas o cáncer (Garrod y Chidgey 2008).

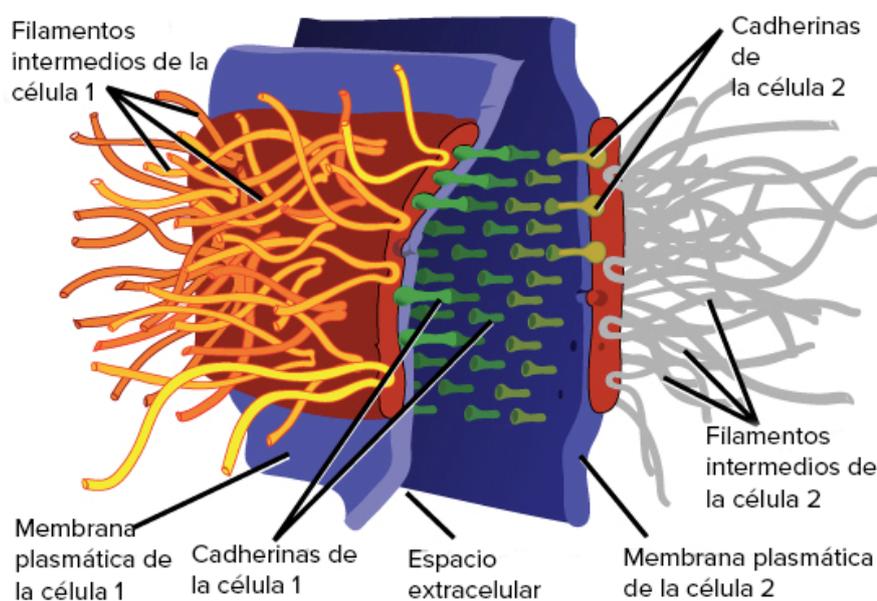


Figura 7. Estructura del desmosoma (extraída de <https://openstax.org/>).



2.2.1.2. Uniones adherentes

La importancia de las uniones adherentes radica en su papel durante la embriogénesis, y por ello han sido ampliamente estudiados en investigaciones de la biología del desarrollo (Okano et al. 1999). Adoptan diferentes formas según el tipo de tejido, pudiendo encontrar *fascie adherens* en el músculo cardíaco, *zonulae adherens* en epitelios polarizados o *puncta adherens* en células mesenquimales y neuronales (Franke, 2009) (Tabla 4).

Se tratan del tipo de uniones intercelulares más distribuidas entre los vertebrados (Indra et al. 2013). Entre las funciones que cumplen las uniones adherentes se encuentran varios procesos importantes en la homeostasis celular: estabilización de uniones intercelulares, control de la proliferación y motilidad celular, regulación del citoesqueleto y la señalización celular y regulación transcripcional. Las familias de proteínas de adhesión que forman parte de las uniones adherentes incluyen la superfamilia de las cadherinas y miembros de la familia de las cateninas (Ivanov y Naydenov 2013). Las cadherinas clásicas transmembrana se unen a las cateninas citoplasmáticas, las cuales regulan la organización del citoesqueleto y participan en diferentes vías de señalización celular (Hartsock y Nelson 2008; Perez-Moreno y Fuchs 2006). Este tipo de unión intercelular es calcio dependiente, de forma que las cadherinas se unen a este catión para cambiar su conformación y poder adherirse a otras cadherinas de células adyacentes (Ivanov, 2013). Las nectinas constituyen otro de los componentes de las uniones adherentes, formando uniones específicas entre células de forma independiente de calcio (Ivanov, 2013).



Tabla 4. Principales componentes de las adhesiones celulares (modificada de Franke, 2009).

	Localización	Filamentos asociados	Proteínas transmembrana y glicoproteínas	Proteínas específicas de placa
Desmosomas	Céls. epiteliales, cardiomiocitos, céls. meningoeliales, timo y folículos linfoides	Intermedios (queratina, vimentina, desmina)	Desmogleína 1-4 Desmocolina 1-3	Placoglobina desmoplaquina I/II placofilinas 1-3
Uniones adherentes	Céls. epiteliales, céls. endoteliales, cardiomiocitos, céls. mesenquimales y neurales	Microfilamentos (actina)	Cadherinas clásicas (ej. E-cadherina, N-cadherina)	α , β y δ catenina, placoglobina, p120, ARVCF, p0071, placofilina 2, ZO 1-3, cingulina
Uniones estrechas	Céls. epiteliales, céls. endoteliales		Ocludina, claudinas 1-24, tricelulina, JAMA, CAR, ESAM	ZO 1-3, cingulina
Uniones GAP	Células formando tejidos		Conexinas 1-21	ZO 1-3

ARVCF: proteína Armadillo *repeat* en el síndrome velo-cardio-facial; ZO: proteínas *zonulae occludens*; JAMA: molécula de adhesión A; CAR: carboxílico ácido reductasa; ESAM: molécula de adhesión celular selectiva endotelial.



2.2.1.3. Uniones estrechas

Las uniones estrechas están presentes en células endoteliales y epiteliales principalmente, donde forman una barrera que permite el paso de iones por medio de la difusión entre células e impiden la mezcla de proteínas entre membranas (Franke, 2009). El mantenimiento de estas barreras y el correcto funcionamiento del transporte intercelular es esencial en tejidos como la barrera hematoencefálica o la barrera intestinal. En las uniones estrechas participan dos tipos de moléculas, las familias de proteínas transmembrana de ocludinas y claudinas, entre diversas proteínas que conectan con filamentos de actina (Figura 8).

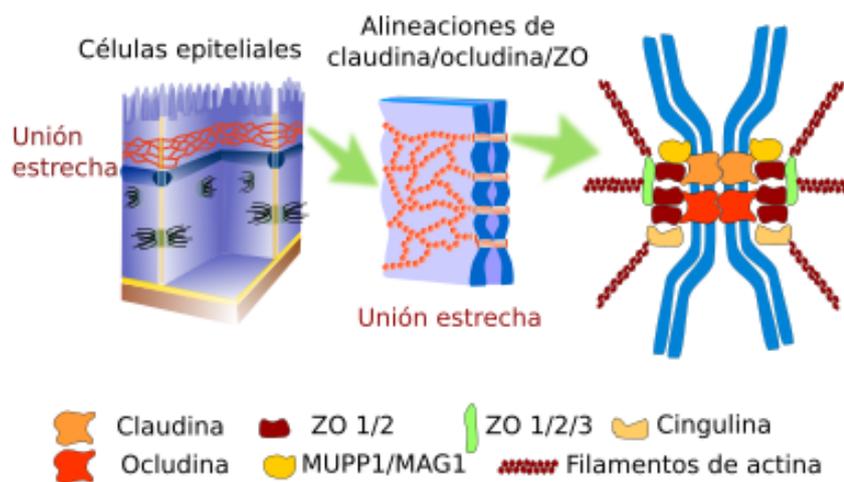


Figura 8. Esquema de las uniones estrechas de las células epiteliales. La estructura molecular parece ser similar en los distintos tipos de epitelios (modificado de Niessen, 2007). ZO: proteína zonula ocludens; MUPP1: proteína con dominio *multi-PDZ 1*; MAG1: Proteína con dominios asociados a guanilato kinasa de membrana, WW y PDZ 1.

Las ocludinas presentan zonas de unión a componentes del citoesqueleto, y regulan además la permeabilidad de la barrera intercelular. Su función y regulación en las uniones estrechas depende de su estado de fosforilación (Hartsock y Nelson 2008). Otro componente de estas uniones son las claudinas, muy importantes en el mantenimiento de la polaridad celular y la regulación de la permeabilidad celular. Dicho control se realiza mediante un patrón de expresión específico de las claudinas según el tejido, las cuales regulan el paso de iones y pequeñas moléculas a través de los canales celulares de las uniones estrechas. Actualmente se conocen 24 miembros de la familia de claudinas, y su expresión combinada de forma específica en los tejidos determina la selectividad y permeabilidad de las uniones estrechas de ese tejido (Ding et al. 2013).



Por último, en este tipo de uniones se encuentran unas proteínas llamadas *zonula ocludens*, las cuales unen claudinas y ocludinas con el citoesqueleto. Fueron descritas inicialmente como unas proteínas específicas de las uniones estrechas, reclutando diversos tipos de proteínas de la superficie celular. También se ha comprobado que las proteínas ZO pueden unirse a otros tipos de complejos como las uniones adherentes o las uniones GAP. Su función por tanto es formar el vínculo entre las proteínas transmembrana y los filamentos del citoesqueleto (Bauer et al. 2010).

2.2.1.4. Uniones comunicantes o GAP

Las uniones que se establecen en este tipo de unión celular tienen como característica la formación de canales o poros entre células adyacentes que se encuentren a poca distancia. Los conexones son las estructuras que comunican las dos membranas plasmáticas de las células y están constituidos por las conexinas. Existen varios miembros en esta familia de proteínas que se van a combinar en los conexones para formar diferentes canales con diferentes permeabilidades y propiedades eléctricas. La conexión plasmática generada por los conexones permite el paso de pequeñas moléculas e iones, que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis y regulan procesos como la apoptosis, diferenciación y proliferación celular. Se ha descrito también cierta capacidad de los conexones para comunicar el medio extracelular con el interior de las células en procesos de señalización (Ableser et al. 2014; Sutor y Hagerty 2005).

2.2.2. Uniones célula-matriz

Numerosos procesos esenciales para los tejidos, como la diferenciación de células madre o el desarrollo embrionario, están mediados por las adhesiones celulares a la MEC (Dao et al. 2013; de Pereda et al. 2009; Seltsmann et al. 2013). Las células expresan una variedad de receptores de adhesión, que son específicos del tejido, los cuales se unen a moléculas de la MEC y permiten la unión a los filamentos de actina para madurar la adhesión (Dao et al. 2013). Las integrinas son las principales moléculas de adhesión implicadas en las uniones a la MEC, y mediante la combinación de subunidades de éstas, las células son capaces de crear una variedad de receptores de adhesión en un determinado tejido. Dependiendo de este patrón de expresión específico, las células se reorganizan en los tejidos para completar procesos funcionales y estructurales (Dao et al. 2013). Los hemidesmosomas y las uniones focales son los dos tipos de uniones fuertes que se establecen entre las células y la MEC.



2.2.2.1. Hemidesmosomas

Los hemidesmosomas son complejos multiproteicos que unen las células epiteliales a la membrana basal, permitiendo procesos como la polarización celular, la organización y la arquitectura tisular (Figura 9) (Borradori y Sonnenberg 1999). Aunque los hemidesmosomas parecen similares a los desmosomas, molecularmente son diferentes. La organización molecular de los hemidesmosomas se basa en tres tipos de proteínas: proteínas de la placa citoplasmática, proteínas transmembrana y proteínas de la MEC. Estos componentes median uniones estables entre el citoesqueleto y la MEC que proporcionan resistencia al estrés mecánico en los tejidos (de Pereda et al. 2009). La placa citoplasmática es un complejo proteico de anclaje intracelular que se encuentra en los desmosomas y hemidesmosomas. Esta placa es la responsable de la unión de los elementos citoesqueléticos a las proteínas de unión transmembrana. Está constituida por dos proteínas, BP230 y plectina. La BP230 se asocia a filamentos intermedios, mientras que la plectina actúa como molécula multifuncional del citoesqueleto, pudiéndose unir a filamentos intermedios, queratinas, neurofilamentos y vimentina (Borradori y Sonnenberg, 1999; de Pereda et al., 2009; Seltmann et al., 2013).

Las proteínas transmembrana presentes en los hemidesmosomas son la integrina $\alpha 6\beta 4$, BP180 y CD151. La cola citoplasmática de la integrina $\alpha 6\beta 4$ se une a diversos componentes de los hemidesmosomas como la plectina, BP180 y BP230, actuando como paso clave para el ensamblaje de estas uniones (Walko et al. 2015). El dominio extracelular de la integrina $\alpha 6\beta 4$ es receptor de laminina, siendo crucial para la adhesión celular. BP180 o colágeno tipo XVII es una proteína transmembrana que se expresa en epitelios estratificados, pseudoestratificados y de transición (Fairley et al. 1995). Se une a la integrina $\alpha 6\beta 4$ mediante las dos subunidades de ésta, por tanto, al dominio extracelular y al intracelular. También se une a otras proteínas de los hemidesmosomas como la plectina y BPGA1 (Hopkinson et al. 1995; Borradori y Sonnenberg 1999; Schaapveld et al. 1998). Mutaciones en *COL17A*, el gen que expresa esta proteína, se han asociado con separación de los queratinocitos de la membrana basal y alteraciones en la estructura de los hemidesmosomas, dando lugar a patologías dermatológicas (Fine 2014). En cuanto a CD51, se trata de una proteína con cuatro dominios transmembrana que se asocia a las integrinas e interviene en numerosos procesos como la migración celular y la angiogénesis (Kang et al. 2014; Takeda et al. 2007). Se expresa en tejidos epiteliales y en el endotelio vascular, donde



colocaliza con los hemidesmosomas de estos tejidos, y parece participar en la formación de éstos (Hasegawa et al. 1997).

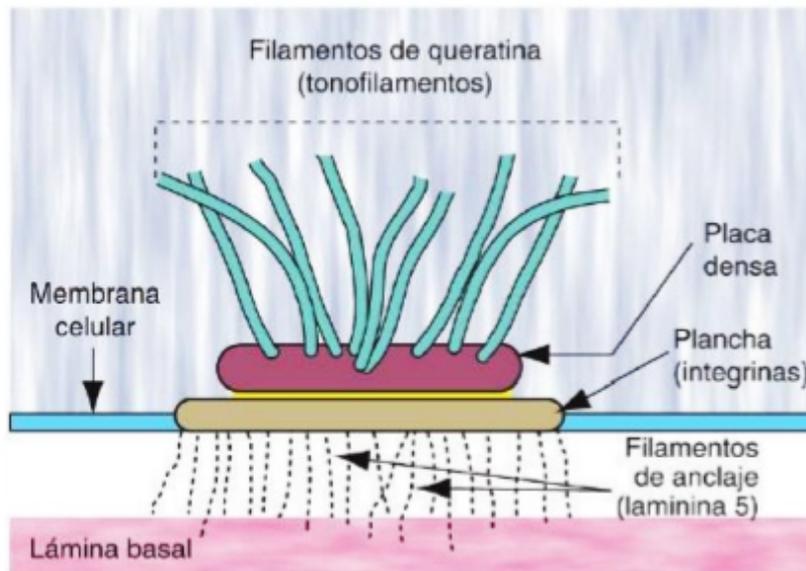


Figura 9. Esquema de un hemidesmosoma (extraída de *Garner et al, Texto Atlas de Histología, 2008*).

Por último, en los hemidesmosomas encontramos proteínas como las lamininas, componentes importantes de la MEC que interaccionan con las integrinas y mantienen una adhesión estable. Principalmente la laminina-5 que se localiza en la membrana basal de la epidermis, sirve como nexo entre la integrina $\alpha 6\beta 4$ y los componentes de la MEC (Borradori y Sonnenberg 1999).

2.2.2.2. Uniones focales

Las adhesiones a la MEC mediadas por uniones focales se producen mediante orgánulos situados en la interfaz de la MEC que están próximos a los filamentos de actina, a los cuales se unen (Hotulainen y Lappalainen 2006). La estructura y composición de estas uniones se encuentra en variación constante debido a los cambios producidos en las proteínas de adhesión en respuesta a las señales recibidas desde la ECM. Por lo tanto, intervienen en la señalización celular, son sensores de la tensión celular y pueden regular la proliferación y la migración celular (Fogh et al. 2014). Los principales componentes de las adhesiones focales son las integrinas, la vinculina y la talina, aunque se han descrito muchos más de menor importancia (Ciobanasu et al. 2014).



Las integrinas juegan un papel clave en la regulación de las adhesiones focales, y conectan el citoesqueleto con el tejido conectivo. A través de las proteínas de adhesión focal como la talina, el dominio citoplasmático de las integrinas se une al citoesqueleto, mientras que extracelularmente se une a proteínas de la MEC. Tras esta unión, otras moléculas de señalización se unen al complejo y pueden regular la dinámica de remodelación del citoesqueleto (Kalli et al. 2013). La vinculina se une a las integrinas a través de otras proteínas de adhesión de forma indirecta, como la talina, proteína de adhesión focal encargada de mediar la tensión existente en las uniones focales y posiblemente transmitirla al citoesqueleto (Johnson y Craig 1995; Massoumi y Sjölander 2001). La conformación de esta proteína varía según el estado de activación y está mediado por la unión a otras proteínas de adhesión focal, o también por las fuerzas mecánicas resultantes de las adhesiones.



2.3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Las adhesiones celulares son de vital importancia para el correcto funcionamiento y organización celular y tisular, por lo tanto, intervienen en numerosos procesos: desarrollo embrionario, diferenciación, migración, comunicación e inflamación.

2.3.1. Adhesiones celulares en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular.

Las adhesiones celulares son cruciales para la formación de tejidos tridimensionales, estableciendo además la base de la formación de organismos multicelulares. Pero tienen un papel más importante que el de simplemente mantener la estructura de los tejidos, ya que los organizan mediante patrones de expresión complejos y específicos. Durante la morfogénesis embrionaria existen dos procesos migratorios: migración en masa y migración individual. La gastrulación es un ejemplo de migración en masa, ya que grandes grupos celulares migran de forma colectiva (en forma de hojas) para constituir los diferentes órganos y el embrión. En cambio, en la migración de la cresta neural, pequeños grupos de células se separan de las capas del ectodermo y adquieren propiedades migratorias (Locascio y Nieto 2001; Horwitz y Webb 2003).

Existen diversas teorías acerca de las funciones específicas de las adhesiones durante el desarrollo, una de las primeras fue la teoría de adhesión diferencial, que proponía que la tensión superficial de los tejidos se relaciona con las adhesiones celulares para determinar la segregación celular y la organización tisular (Foty y Steinberg 2013). Numerosos estudios han demostrado la importancia de las adhesiones diferenciales en el desarrollo y morfogénesis, incluyendo procesos como la movilidad en la gastrulación (Maitre et al. 2012) o la migración de cresta neural (Mayor y Theveneau 2013). Otras teorías acerca de la organización de las adhesiones durante el desarrollo han incluido la tensión cortical dependiente de la actina-miosina como conductora de la estructuración de los tejidos (Epstein et al. 1976). Como resultado de estas teorías, se enunció que la combinación de ambas podría ser posible, implicando en el reordenamiento celular y organización tisular tanto a la adhesión como a la contracción celular (Farhadifar et al. 2007). La regulación de las moléculas de adhesión es particularmente evidente en el sistema hematopoyético, mostrando diferentes propiedades adherentes según fenotipos.



2.3.2. Migración celular

En el organismo adulto, la migración también tiene un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Para migrar, las células modifican su forma y avanzan a través de los tejidos interactuando con la MEC y las estructuras cercanas. La migración en general se produce en cinco pasos interdependientes en un ciclo continuo. En primer lugar, se produce la protrusión de una zona de la membrana, donde los filamentos de actina se conectan a las proteínas adaptadoras para iniciar el avance. En el segundo paso, se establecen las interacciones célula-MEC y los contactos focales, que serán destruidos por proteasas de superficie en el siguiente paso. Por último, la célula se contrae y se separa del sustrato (Friedl y Wolf 2003). A través de diferentes rutas de señalización que implican hormonas, citoquinas y factores de crecimiento entre otros, se guían a las células hasta su destino según las necesidades del tejido como por ejemplo en procesos inflamatorios o reparación de heridas.

2.3.3. Inflamación y adhesiones celulares

La superfamilia de las inmunoglobulinas es la más importante dentro de las moléculas de adhesión implicadas en inflamación, junto a las selectinas y las integrinas. También las de tipo receptor *homing* de linfocitos se unen a ligandos durante la respuesta inflamatoria. Los leucocitos se extravasan a los tejidos asociados a estímulos de forma selectiva. En este proceso se pueden distinguir cuatro pasos: primero, las moléculas proinflamatorias activan a las células endoteliales, que expresan selectinas, entre otras moléculas, y median en primer lugar las interacciones entre leucocitos y endotelio vascular. Tras el desplazamiento de leucocitos por el endotelio, el segundo paso consiste en una adhesión más estable mediada por las integrinas. La unión entre integrinas leucocitarias e inmunoglobulinas que se expresan sobre el endotelio vascular produce la migración a través de las células endoteliales mediante la molécula de adhesión PECAM-1 (Springer et al. 1994; Bevilacqua & Nelson 1993; Newman 1997). Dentro de las inmunoglobulinas, ICAM-1 es la proteína más ampliamente distribuida, presente en epitelios, endotelios, células hematopoyéticas y fibroblastos. Los leucocitos continúan su migración siguiendo un gradiente de quimiocinas liberadas a consecuencia del daño en el tejido y llegando a la zona afectada de forma selectiva. Otros fenómenos mediados por adhesiones celulares, como la recirculación de entrada de linfocitos a órganos linfoides o la coestimulación son necesarios para una respuesta inmunitaria correcta.



3. PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA ORGANIZACIÓN DEL MIOCARDIO

3.1. DISCO INTERCALAR

En la organización del tejido cardiaco destaca el disco intercalar (DIC), una estructura localizada en los extremos de los cardiomiocitos que permite mantener la integridad del tejido y sincronizar la contracción (Kleber y Saffitz 2014). La estructura de los DIC se observa como evaginaciones e invaginaciones de las membranas de los cardiomiocitos, donde se reflejan varios tipos de uniones que permiten el anclaje al citoesqueleto. Se trata de estructuras altamente organizadas y que aportan al tejido cardiaco apoyo para soportar la continua tensión mecánica derivada de la contracción.

3.1.1. Estructura y tipos de uniones

Las características de unión fuerte que presentan los DIC les aportan tres tipos de uniones básicas: desmosomas, uniones adherentes y tipo GAP (Figura 10). Existen otras proteínas que se relacionan con el DIC y que van a participar en procesos como el acoplamiento de la contracción, siendo crucial esta estrecha relación para el correcto funcionamiento miocárdico.

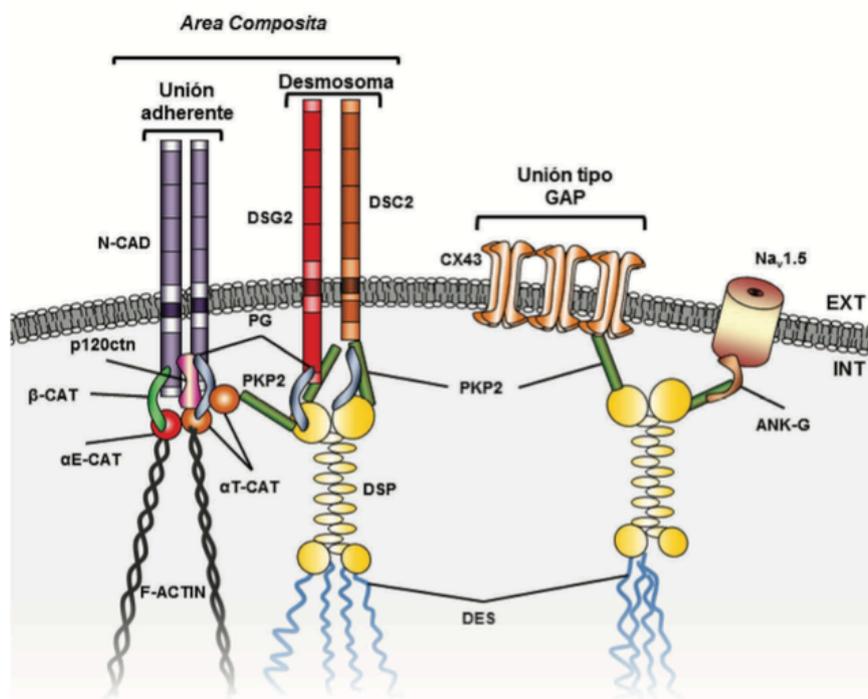


Figura 10. Estructura del disco intercalar. Desmosomas y uniones adherentes pueden formar el *area composita* combinando proteínas de ambos tipos de uniones. Las uniones GAP se sitúan lateralmente en la membrana y forman complejos con otras proteínas de membrana para permitir la comunicación de las células (extraída de *Moncayo, 2016*).



3.1.1.1. Desmosomas en el DIC

En el miocardio sano de los mamíferos se expresan 5 proteínas desmosomales: desmocolina-2 (DSC2), desmogleína-2 (DSG2), desmoplaquina (DSP), placoglobina (PCG) y placofilina-2 (PKP2). El mecanismo de unión es similar al de los desmosomas en otros tejidos ya expuesto anteriormente, destacando la formación de placas densas que conectan todas las estructuras (Figura 11). Las cadherinas desmosomales, desmogleínas y desmocolinas, se expresan en epitelios estratificados, mientras que DSG2 y DSC2 de manera ubicua se encuentran en todos los desmosomas. DSG2 interacciona de manera heterofílica con las desmocolinas de la célula adyacente por medio de sus dominios extracelulares, lugar donde se han encontrado mutaciones relacionadas con las MCA (Basso et al. 2011). También dispuesta transmembrana, se encuentra DSC2, cuya región citoplasmática puede variar de isoforma para adherirse o no a PCG (Green y Simpson 2007). Más recientes son los estudios sobre las mutaciones en DSC2, las cuales están asociadas con arritmias en algunos pacientes (Awad et al 2008).

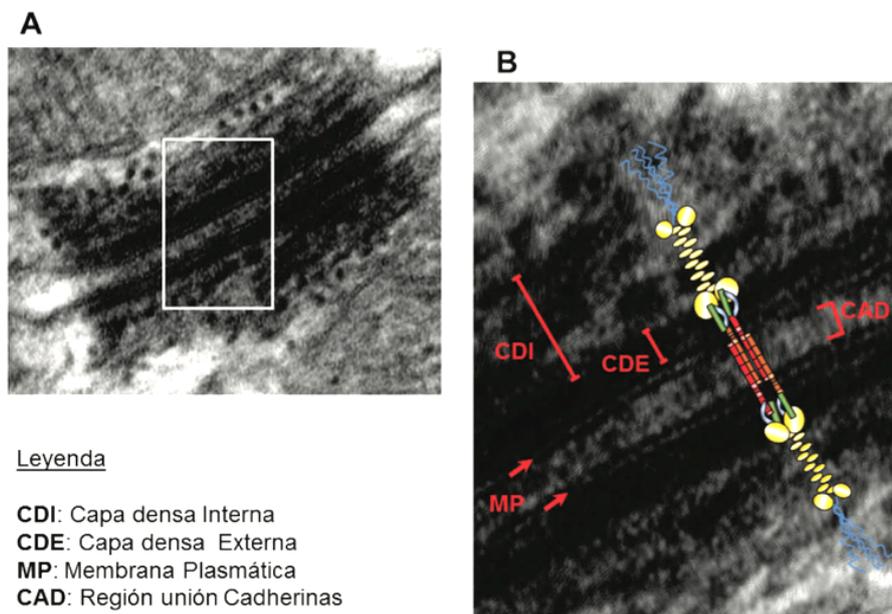


Figura 11. Ultraestructura del desmosoma en miocardio. A: desmosoma en un cardiomiocito. B: ampliación con la representación de los elementos del desmosoma (extraída de *Moncayo et al., 2016*).

En el tejido cardiaco existen dos DSP, que interaccionan con los dominios intracelulares de las cadherinas, con PKP2 y con PCG. Finalmente, todo este complejo se ancla al filamento intermedio desmina. Se han identificado diversas



mutaciones en *DSP* asociadas a patologías como por ejemplo el síndrome de Carvajal (Carvajal-Huerta et al. 1998). Estas mutaciones producen un desacoplamiento de la interacción DSP-desmina en el DIC, produciéndose cambios ultraestructurales y problemas en la función cardíaca (Carvajal-Huerta et al. 1998). Por lo tanto, parece que DSP y los desmosomas son esenciales para el mantenimiento de la integridad del tejido cardíaco.

Las proteínas armadillo PKP2 y PCG son fundamentales para la organización de los desmosomas. PCG o γ -catenina está codificada por el gen *JUP* y se trata de una de las proteínas de adhesión que interacciona con un mayor número de moléculas como DSP, PKP2, DSC, DSG. También se puede unir a proteínas de otros tipos de uniones, participando en las uniones adherentes. Por otro lado, PCG es necesaria para el tráfico de DSG2 a la membrana y su ausencia produce una disminución en el anclaje a la placa, sugiriendo esto una función en el ensamblaje del desmosoma (Acehan et al. 2008). Las PKP se encargan principalmente del soporte mecánico de los desmosomas en tejidos con gran estrés, además de participar en procesos de señalización celular (Nekrasova et al. 2013). Solo PKP2 se expresa en tejido cardíaco (Hatzfeld 2007) y contiene dos dominios, aunque solo uno de ellos interacciona con PCG y DSP (Chen et al. 2002). Durante el ensamblaje del desmosoma, PKP2 participa en el tráfico de DSC2 y en el anclaje de DSP en la membrana (Nekrasova et al. 2013; Godsel et al. 2010). PKP2 se localiza también en el núcleo pero su función allí es desconocida actualmente.

3.1.1.2. Uniones adherentes en el DIC

Estas uniones conectan células mecánicamente encadenando proteínas de ambas. En el tejido cardíaco, están formadas por N-cadherina, que se une de forma homofílica y calcio-dependiente a la célula adyacente. Citoplasmáticamente, N-cadherina conecta con β -catenina y otras de la misma familia que se unen a los filamentos de actina del citoesqueleto (Vite y Radice, 2014). Se ha estudiado la ultraestructura del DIC y se han observado unas zonas donde uniones adherentes y desmosomas se organizan en complejos, denominadas *area composita*. Estos dos tipos de uniones no solo colocalizan sino que interaccionan de forma que la reducción en uno de los componentes produce alteraciones en los demás dentro del área composita (Li et al. 2012).



En cuanto a las funciones señalizadoras de las uniones adherentes, destaca β -catenina como participante en la ruta Wnt/ β -cat no canónica, importante para el desarrollo embrionario, diferenciación y proliferación (Nelson y Nusse, 2004). PCG es muy similar a las cateninas, y es por esto que podría encontrarse en las uniones adherentes, incluso participando en las mismas rutas de señalización.

3.1.1.3. Uniones tipo GAP en el DIC

Este tipo de uniones permiten el paso de iones y otros metabolitos entre las cardiomiocitos y están formadas por conexinas. La familia de las conexinas se caracteriza por formar unos complejos transmembrana de seis en seis para crear un poro que permita el paso de moléculas (Figura 12). Dentro del tejido cardíaco, las conexinas tienen una amplia distribución: conexina 40 se expresa en aurículas y en el sistema de conducción, conexina 45 se encuentra en las ramas del haz de His y finalmente, conexina 43 que es la más distribuida por el corazón encontrándose en aurículas y ventrículos (Verheule y Kaese, 2013).

La comunicación entre las células no solo permite el paso de iones, sino que es fundamental para la propagación eléctrica dentro del tejido. Las conexinas permiten la despolarización de los cardiomiocitos en respuesta a la difusión de iones. Las alteraciones en estas proteínas causan graves fallos en la conducción además de afectar a otras estructuras del disco (Agullo-Pascual et al. 2014). Esto corrobora la idea de que el DIC se comporta como una única entidad funcional (conexoma) y que las alteraciones en uno de sus componentes causan la desorganización y desestabilización de todo el complejo.

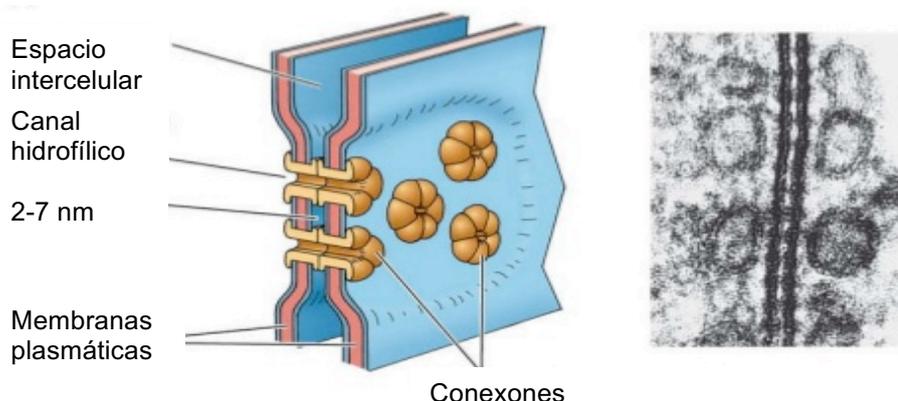


Figura 12. Estructura de las uniones tipo GAP en el miocardio (modificada de Life: the science of biology. Séptima edición, 2004)



3.1.2. Alteraciones del DIC en patologías cardíacas

Como se ha mostrado, la importancia de los componentes que forman el DIC es individual, es decir, alteraciones en uno de ellos va a producir cambios fatales en la organización del tejido. E-cadherina y N-cadherina se localizan en el DIC, y la supresión de su expresión conduce a una MCD, pero además otras moléculas de adhesión como conexina 43 o vinculina, alteran sus niveles de expresión o localización celular en respuesta a estas supresiones (Ferreira-Cornwell et al. 2002). También en modelos transgénicos, se han estudiado otras proteínas que afectan a la estructura del DIC como por ejemplo mXin, cuya supresión produciría pérdida de la continuidad del disco, desorganización e hipertrofia cardíaca (Gustafson-Wagner et al. 2007). Estudios sobre el papel de la vinculina en la regulación del miocardio han mostrado una disminución de las adhesiones, muertes súbitas y MCD en animales con ésta proteína inactivada (Zemljic-Harpf et al. 2007).

En pacientes con MCD, se ha estudiado la estructura miocárdica observándose una reducción en los sarcómeros, deslocalización de proteínas del citoesqueleto como vinculina (Schaper et al. 1991). El mantenimiento de la correcta conducción cardíaca también está condicionado por el DIC, donde se localizan canales de sodio (Kucera et al. 2002). Por ello, los cambios en la ultraestructura se han estudiado más ampliamente en las miocardiopatías arrítmicas, debido a la importancia de las proteínas desmosomales y de la organización del DIC. En pacientes con MCAVD, se han observado reducciones en el número de desmosomas y la longitud de éstos en el DIC, además de localizaciones anormales (Basso, 2006). En el síndrome de Naxos, similar a la MCAVD que además produce alteraciones dermatológicas, se han observado cambios en el DIC y la función ventricular tras restablecer los niveles de JUP, en modelos animales (Zhang et al. 2015).



3.2. ADHESIONES ALTERADAS EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las alteraciones de las MA tanto originadas por mutaciones como provenientes de factores adquiridos, producen cambios celulares y regionales que van a tener diversas consecuencias para los individuos. Algunos de los procesos que han sido relacionados con alteraciones en las MA incluyen degeneración retinaria, trastornos neurológicos, alteraciones inflamatorias o diversos tipos de cáncer (Li, 2014). Un grupo muy numeroso de patologías relacionadas con las alteraciones en las adhesiones celulares, lo constituyen las enfermedades cardiovasculares. Desde las alteraciones descritas en el DIC, a los cambios en otras uniones formadas por conexinas, cadherinas o integrinas, todos ellos participan de manera crucial en el desarrollo de varios tipos de cardiomiopatías.

3.2.1. Alteraciones genéticas

Debido a los avances tecnológicos transcurridos en los últimos años, se conocen actualmente un gran número de miocardiopatías (arritmogénicas, dilatada...etc) cuyo origen se encuentra en las mutaciones de ciertos genes, muchos de ellos implicados en la adhesión celular (Tabla 5). En total, más de 300 mutaciones han sido descritas y consideradas como potencialmente patogénicas.

De todos los casos de miocardiopatías arrítmicas, las mutaciones serían responsables del 60-65% del total de pacientes diagnosticados (Campuzano et al. 2013). Los genes desmosomales son un grupo destacado, ya que el desmosoma se trata de una estructura de gran importancia en el corazón (Awad et al. 2008). Se han encontrado alteraciones genéticas en los genes para desmogleína-2 (*DSG2*), desmocolina-2 (*DSC2*), placofilina-2 (*PKP2*), placoglobina o γ -catenina (*JUP*) y desmoplaquina (*DSP*) (Garrod et al. 2008). Otros genes no desmosomales, como la desmina (*DES*), también se han identificado como alterados genéticamente en este tipo de miocardiopatía. De todas estas mutaciones, *PKP2* puede llegar a suponer el 50% de los casos, seguido por *DSP*, *DSG2* y *DSC2*, responsables del 20-25% (Kapplinger et al. 2011).

En la MCD idiopática, se considera una asociación familiar en el 30-50% de los casos. Se han identificado mutaciones en hasta 25 genes diferentes relacionados con proteínas musculares, mitocondriales, del citoesqueleto, de membrana, canales iónicos y adhesiones celulares (Grünig et al. 1998). Alteraciones en el gen que codifica



la catenina- α T (*CTNNA3*), localizada en el DIC de los cardiomiocitos, se han relacionado con la MCD (Janssens et al. 2003). Otros casos de miocardiopatías como la etílica, hipertensiva o por miocarditis, han sido asociados con una alteración genética previa, donde los factores que se pensaban originarios de la patología en realidad podrían considerarse los factores desencadenantes en sujetos genéticamente predispuestos a MCD idiopática (Castro Beiras et al. 2003).

La miocardiopatía hipertrófica familiar se caracteriza por estar causada por mutaciones principalmente en genes de sarcómeros, y por ello frecuentemente se encuentra asociada a síndromes metabólicos o patologías neuromusculares (Li, 2014).

Tabla 5. Fenotipo y genes de adhesiones alterados en miocardiopatías (modificada de Li, 2014).

Gen	Proteína	Miocardiopatía
<i>CDH2</i>	Cadherina 2	MCD, MCH
<i>CTNNB1</i>	β -catenina	MCH
<i>JUP</i>	Placoglobina	MCA, Naxos
<i>CTNNA3</i>	Catenina α T	MCD, MCA
<i>CTNNA1</i>	Catenina α E	Ruptura ventricular post-IM
<i>mXin</i>	mXin α	MCH en modelos animales
<i>DSG2</i>	Desmogleína-2	MCA
<i>DSC2</i>	Desmocolina-2	MCA
<i>PKP2</i>	Placofilina-2	MCA
<i>DSP</i>	Desmoplaquina	MCA, síndrome Carvajal

MCD: miocardiopatía dilatada, MCH: miocardiopatía hipertrófica, MCA: miocardiopatía arrítmica, IM: infarto de miocardio.

3.2.2. Alteraciones adquiridas y estructurales

Además de los avances en las técnicas de análisis, los estudios en modelos animales transgénicos han permitido identificar un gran número de genes implicados en las miocardiopatías. Las alteraciones que afectan a la estructura miocárdica en los discos intercalares (DIC) y a las proteínas de adhesión que los forman, son las de mayor importancia y serán estudiadas en el siguiente apartado. Las familias de las integrinas, cadherinas y cateninas constituirían otros grupos destacados de moléculas de adhesión cuya alteración produciría patologías cardíacas.



En los procesos inflamatorios participan un amplio número de moléculas de adhesión, que median la unión y extravasación de linfocitos. Las integrinas, además de mediar en estas uniones, participan en diversas cascadas de señalización celulares que implican a otras moléculas y procesos. En la aterogénesis, la molécula VCAM-1 que se expresa en el endotelio, podría tener un papel fundamental en el mantenimiento de la inflamación local (Libby y Li 1993). La integrina- $\alpha V\beta 3$ también se expresa en la lesión aterosclerótica, y está relacionada con la angiogénesis y crecimiento de la placa (Hoshiga et al. 1995). Moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y selectina-P han sido mostradas como las principales mediadoras de la unión de los leucocitos a la zona infartada en pacientes con infarto agudo (Jaakkola et al. 2000). Tras los procesos de reestenosis o reperfusión miocárdica, se incrementa la expresión de integrinas leucocitarias (Mickelson et al. 1996), sugiriendo un papel importante de éstas en la respuesta inflamatoria. Se ha evidenciado que utilizando tratamiento contra la selectina-L o la selectina-P se produce una reducción de la necrosis del 60% en el miocardio reperfundido (Ma et al. 1993).

Las cadherinas están asociadas en estudios previos a enfermedades cardiovasculares, como las descritas en las cadherinas desmosomales del DIC (Elliott et al. 2010; Masuelli et al. 2003; Guo et al. 2010). En pacientes con MCD, se ha encontrado una reducción del complejo cadherina-VE/ β -catenina, lo cual resulta en una menor supervivencia de las células endoteliales (Schäfer et al. 2003). La subfamilia de las protocadherinas, del tipo no tradicionales, difiere en cuanto a estructura y función de las cadherinas clásicas (Morishita & Yagi 2007) y debido a su estudio fundamentalmente en el sistema nervioso, han sido asociadas a diversas patologías neurológicas (Pedrosa et al. 2008). También se ha descrito su papel en algunos tipos de cáncer (Terry et al. 2013). A pesar de los recientes avances en el conocimiento de esta familia, todavía se desconocen sus implicaciones en la IC y en las enfermedades cardiovasculares.

Las integrinas participan en las adhesiones célula-matriz, mediante los tipos de uniones explicados anteriormente. Entre las funciones de las integrinas en el miocardio, se encuentran funciones más ubicuas (adhesiones y señalización) y otras más específicas del tejido como la transmisión de señales mecánicas o el funcionamiento de los canales iónicos (Figura 13) (Israeli-Rosenberg et al. 2014). En el miocardio, las más expresadas son $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, además de encontrarse otras como $\alpha 6$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 3$ y $\beta 5$. Los niveles de expresión de estas proteínas varían según



las etapas del desarrollo o en estados patológicos como post-infarto de miocardio (Mittal et al. 2013).

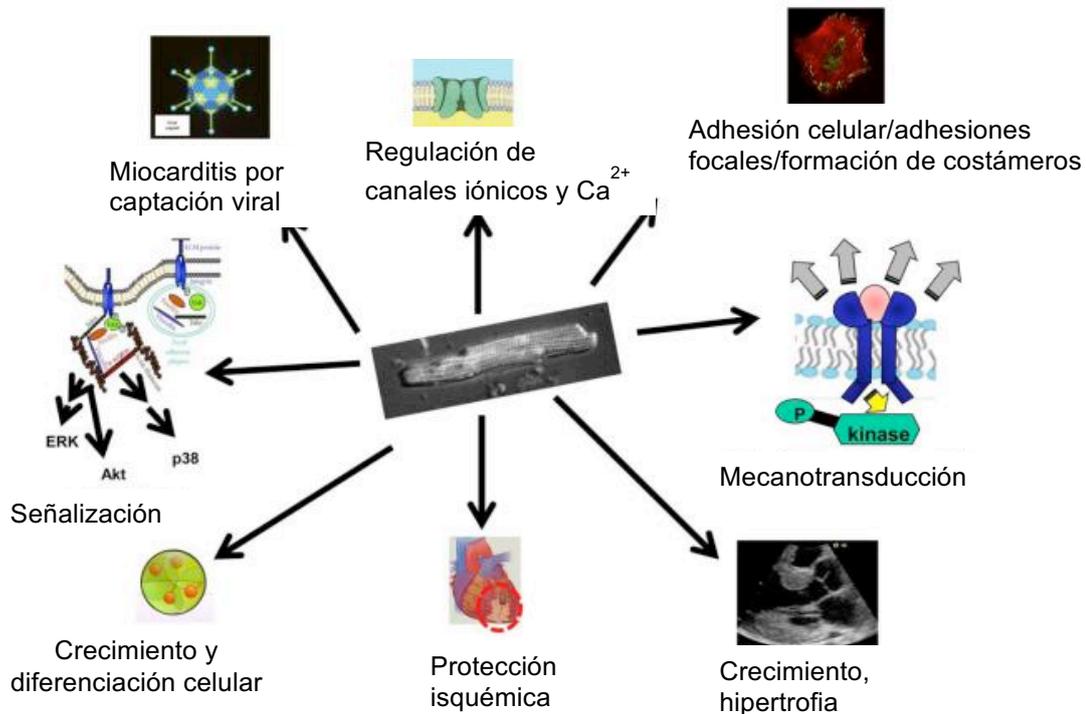


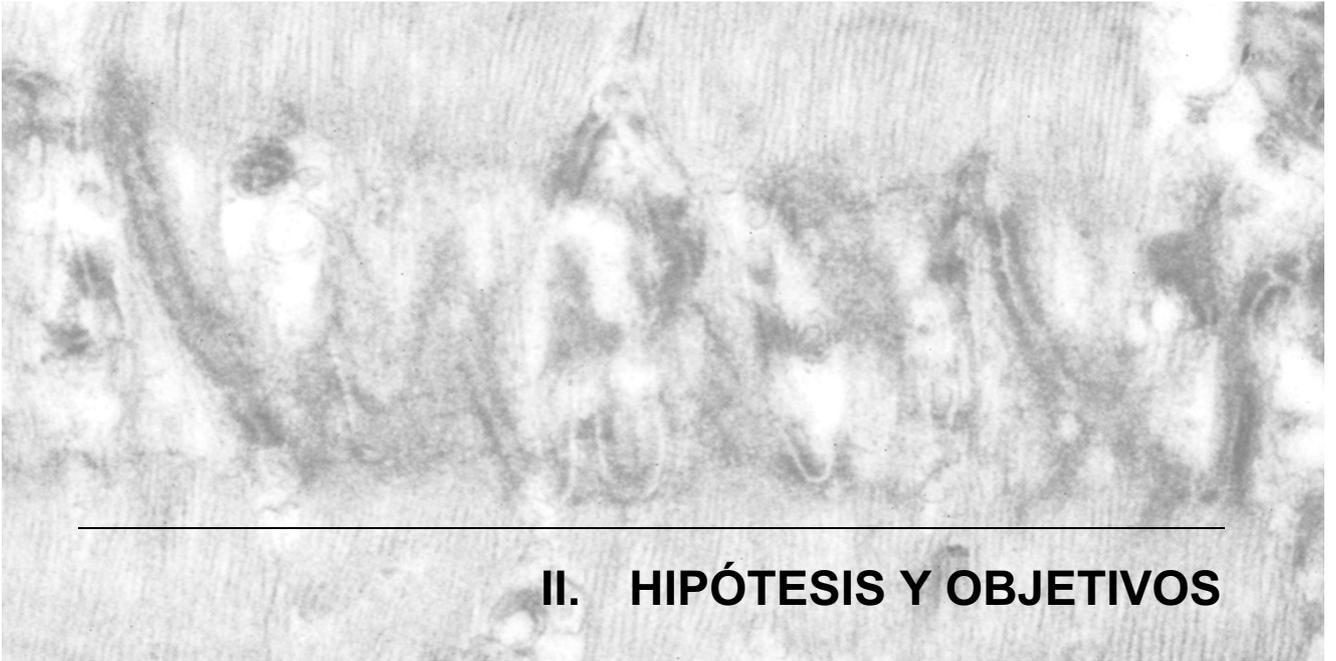
Figura 13. Funciones de las integrinas en el miocito (extraída de Isareli-Rosenberg et al, 2014).

Existen evidencias sobre el papel de la integrina- β 1D en la supervivencia de los cardiomiocitos, ya que en pacientes con MCD y MCI la expresión de esta proteína se encuentra disminuida respecto a los controles (Pfister et al. 2007). Las integrinas están relacionadas con procesos inflamatorios en el miocardio, tanto en las fases del daño tisular como en la reparación y procesos fibróticos que constituyen el remodelado. Se han descrito en modelos animales las implicaciones de ILK (quinasa ligada a integrinas) y las integrinas en la atenuación y mejora de la función cardíaca post-infarto (Mao et al. 2014).

En definitiva, todos los estudios anteriores demuestran que las MA están implicadas en numerosas patologías cardiovasculares, y esto sugiere que podrían existir alteraciones en ellas durante el desarrollo y progresión de la IC crónica. En las investigaciones realizadas en modelos animales se han mostrado implicaciones de ciertas MA en el desarrollo de cardiomiopatías, sin embargo, no existen estudios que investiguen las alteraciones de las MA a partir de muestras cardíacas de pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico y dilatado y comparando los cambios con



miocardio de pacientes sanos. Por todo ello, es necesario profundizar en el estudio de la expresión de estas moléculas en el miocardio humano y sus implicaciones en la IC.



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



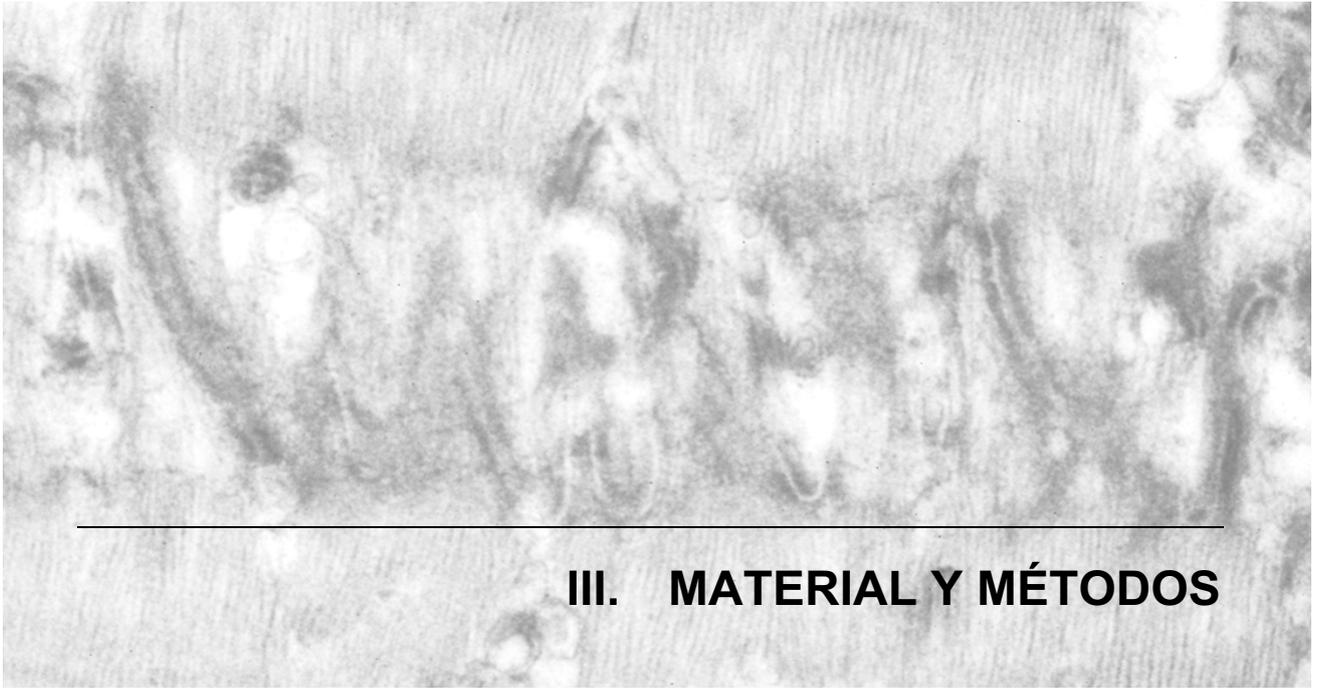
La complejidad de la insuficiencia cardiaca implica diversas etiologías y requiere de una evaluación diagnóstica amplia para determinar el origen de la patología. Tras un daño miocárdico, se producen diversos cambios celulares y tisulares que provocan alteraciones en los principales procesos de homeostasis del miocardio y resultan en una disfunción ventricular y hemodinámica. Las moléculas de adhesión se encargan de mantener la estructura tisular, participar en procesos como la migración celular, y están relacionadas con la inflamación. Han sido implicadas en los procesos inflamatorios miocárdicos producidos tras una isquemia, así como localizadas en las alteraciones estructurales del miocardio patológico. Existen estudios en modelos animales que muestran relaciones entre los cambios en las moléculas de adhesión y la función ventricular. Sin embargo, no se conoce el papel de las moléculas de adhesión en la insuficiencia cardiaca humana y los cambios producidos respecto a pacientes sanos. Por todo ello, nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la insuficiencia cardiaca avanzada, de etiología isquémica y dilatada, podría relacionarse con alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión celular. Además, nos planteamos que las alteraciones en estas moléculas podrían estar relacionadas con parámetros de función ventricular y hemodinámicos, sugiriendo nuevas vías de estudio para el desarrollo de potenciales dianas terapéuticas en la insuficiencia cardiaca.

Analizando el tejido cardiaco (ventrículo izquierdo) de un grupo de pacientes sometidos a trasplante de corazón y diagnosticados de insuficiencia cardiaca, de etiología isquémica y dilatada, y de un grupo de pacientes control sin enfermedad cardiaca, se pretende confirmar la hipótesis de esta tesis mediante los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión génica de las moléculas de adhesión celular en corazones explantados de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica y de corazones control mediante secuenciación masiva de ARNm.
2. Estudiar las relaciones de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión con los principales parámetros funcionales y hemodinámicos alterados en pacientes.
3. Analizar los niveles proteicos de las moléculas de adhesión en el ventrículo izquierdo de estos pacientes.



4. Evaluar la estructura del disco intercalar mediante microscopía electrónica en miocardio sano comparando con tejido cardiaco de pacientes con insuficiencia cardiaca.
5. Establecer un modelo animal de insuficiencia cardiaca crónica con el fin de obtener información sobre las alteraciones de las moléculas de adhesión durante la progresión de la insuficiencia cardiaca y establecer las bases para el desarrollo nuevas estrategias terapéuticas.



III. MATERIAL Y MÉTODOS



1. GRUPOS CLÍNICOS

Los pacientes con IC de los cuales se extrajeron las muestras incluidas en este estudio provenían de la Unidad de Trasplante Cardíaco del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Todos los pacientes fueron diagnosticados de IC basándose en los criterios de la ESC y de la AHA (McMurray et al. 2012; Yancy et al. 2013). Se disponía del historial clínico de cada paciente con toda la información acerca de comorbilidades y cronología de la IC. Previo al trasplante, se realizó a los pacientes un estudio en el Servicio de Cardiología del hospital en el cual se determinó su bioquímica sérica y hematología, hemodinámica, radiografía torácica, ECG, eco-Doppler y angiografía coronaria.

Para el diagnóstico de los pacientes con IC se siguió el consenso establecido entre la OMS y la World Heart Federation (WHF), para identificar las diferentes etiologías de las miocardiopatías (Richardson et al. 1996). La MCD no isquémica se estableció como etiología en los pacientes que no mostraron antecedentes de angina de pecho típica o infarto de miocardio, el ECG no mostraba signos de necrosis miocárdica y las arterias coronarias aparecían normales en la angiografía. Además, la función ventricular de estos pacientes estaba reducida ($FE < 40\%$) y presentaban una dilatación ventricular (diámetro diastólico del VI (DDVI) $> 55\text{mm}$) sin presencia de hipertrofia. El grupo de pacientes que se consideró con IC de etiología isquémica (MCI) tenían varias características comunes, como antecedentes de infarto agudo de miocardio, alteraciones ecocardiográficas (segmentos disquinéticos alternados con normales) y ECG con signos de isquemia o necrosis. Los pacientes con insuficiencia cardíaca de origen hipertenso, valvular o de carácter genético hereditario o congénito, no fueron incluidos en el estudio.

El tratamiento médico establecido a los pacientes se basó en las guías de la *European Society of Cardiology* (ESC) (McMurray et al. 2012). Todos los pacientes se sometieron a pruebas de esfuerzo y fueron clasificados funcionalmente según los criterios de la *New York Heart Association* (NYHA):

- Clase funcional III (NYHA III): los pacientes tienen enfermedad cardíaca que causa una marcada limitación de la actividad física. Se sienten confortables en reposo. La actividad física leve provoca fatiga, palpitaciones, disnea o angina de pecho.



- Clase funcional IV (NYHA IV): los pacientes presentan enfermedad cardiaca que causa incapacidad para realizar cualquier actividad física sin molestias. Los síntomas de la IC o síndrome anginoso pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza cualquier actividad física el malestar se incrementa.

Las muestras controles (CNT) provenían de pacientes de trasplantes no realizados (n=10), tras ser excluidos para dicho fin, y no presentando patologías cardiacas o sistémicas. No se obtuvieron datos de los pacientes de acuerdo a la Ley de protección de datos. La función ventricular era normal (>50%), no existía infección activa en el momento del trasplante y la causa de la muerte fue por accidente cerebrovascular (68%) o de tráfico (32%). La media de edad fue de 46 ± 17 años y el 69,2 % eran hombres.

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Informe 2016/0320) y se realizó de conformidad con las líneas directivas de la buena práctica clínica y las normas éticas para la experimentación humana establecida por la Declaración de Helsinki (Macrae 2007). Tanto los pacientes con IC, como 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 CARDIACO

2.1. OBTENCIÓN

Las muestras de VI procedentes de pacientes con MCD y MCI, así como de los CNT sanos, se tomaron de la zona cercana al vértice o ápex del VI, con un tamaño de 5 cm² aproximadamente (Figura 14). Se extrajo la muestra con unas tijeras romas y pinzas quirúrgicas sin dientes e inmediatamente se introdujeron en una solución estéril de NaCl al 0,9% contenida en un recipiente refrigerado a 4°C para transportarla hasta su procesamiento. El tiempo medio transcurrido desde la pérdida de circulación coronaria hasta el almacenamiento a -80°C de las muestras fue de 4,4 ± 3 horas.

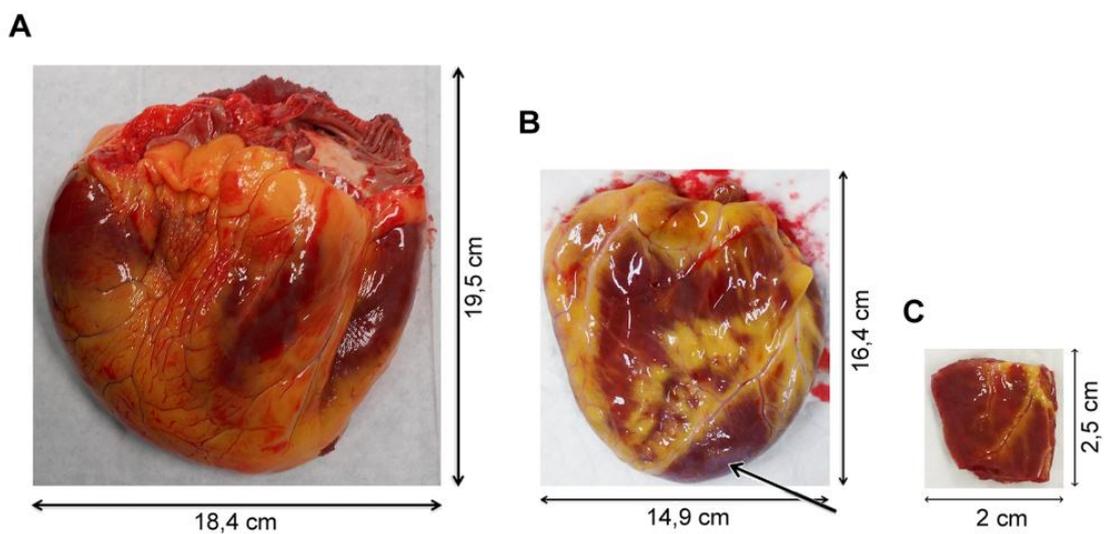


Figura 14. Corazones de pacientes con MCD (A) y MCI (B). Dimensiones y morfología de la muestra (C).



2.2. PROCESADO Y ALMACENAMIENTO

Tras el transporte, se realizó un procesado inicial de las muestras en el laboratorio que consistió en retirar los restos de tejido epicárdico y endocárdico, así como los posibles músculos papilares que pudieran encontrarse en el área de la muestra. Para la adecuada conservación del tejido, todo este proceso se realizó manteniéndolas inmersas dentro de placas Petri con suero fisiológico refrigerado a 4°C, realizando lavados para eliminar los restos de sangre y coágulos. Se conservó el miocardio, objetivo del estudio, y se fragmentó en pequeños segmentos cuadrados (0,5 cm²) de tejido para almacenarlos en crioviales a -80°C.



3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO CARDIACO

3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se cortaron 25 mg de cada muestra de VI almacenadas previamente en criotubos a -80°C . Estas muestras fueron introducidas en tubos *Lysing matrix D*, específicos para su uso en el homogenizador *Fast Prep-24 (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°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°C (*Eppendorf* Modelo 5415R). Se recogió el sobrenadante y se transfirió a tubos estériles 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 (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, ε es el coeficiente de absorción 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*) que son complementarias (Figura 15): (1) 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, y (2) el principal componente del reactivo amarillo Folin & Ciocalteau, 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.

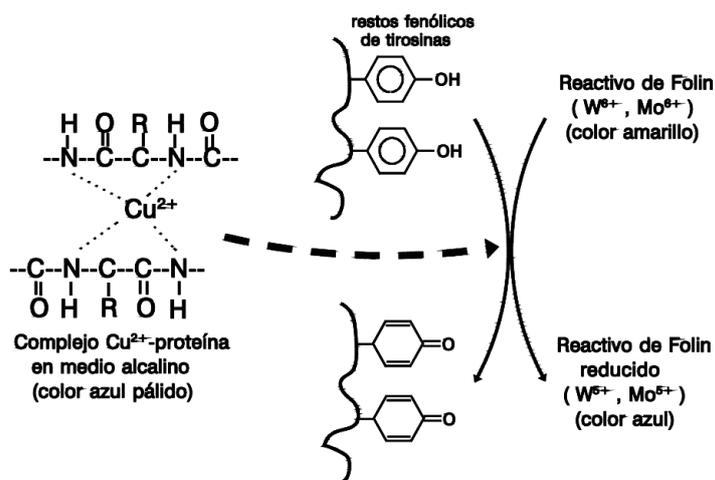


Figura 15. Reacciones químicas para la determinación del método Lowry.



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 (Winters y Minchin 2005).

Después de determinar la concentración de proteínas de las muestras, se hicieron alícuotas de 60 μ l en tubos estériles de 0,5 ml, que se congelaron a -80°C hasta su utilización en técnicas de análisis de proteínas y extracción de ARN.



3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

El primer paso fue la descongelación a 4°C de las muestras y su preparación para la electroforesis. Se utilizaron geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris* 4-12% de poliacrilamida de 20 pocillos. El volumen final de carga en los geles fue de 25 µl. Se utilizaron condiciones de electroforesis no reductoras y los volúmenes de reactivos siguientes (Tabla 6):

Tabla 6. Volúmenes y reactivos utilizados para la electroforesis de las muestras.

	<i>NuPAGE® Novex Bis-Tris</i> 4-12% polyacrylamide
Muestra	*
<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)</i>	6,25 µl
Agua bidestilada	**

* Volumen de muestra necesario para tener una concentración de proteína de 30 µg/25 µl. ** Volumen de agua bidestilada necesario para completar el volumen final de 25 µl.

Las muestras se calentaron a 70°C durante 10 minutos en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*) para la electroforesis. Los geles se colocaron en una cubeta (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) con el tampón de electroforesis MES 1X (*20X NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen*). En el primer pocillo se cargó el marcador de peso molecular conocido (*Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen, Rango 3,5-260 kDa*) y el volumen de carga correspondiente.

La separación electroforética de las diferentes proteínas se realizó de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970) y las condiciones de voltaje y amperaje fueron de 200 V y 200 mA durante 90 minutos. De este modo se separó la proteína PCDHGA3 de peso 101 KDa, en gel (13 x 8,3 cm) de poliacrilamida en gradiente 4-12% (*NuPAGE® Novex Bis-Tris*) 4-12% poliacrilamida con 20 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 cargándolas negativamente de forma proporcional a su masa.



3.3.2. Transferencia en seco

Las proteínas separadas se transfirieron de los geles de poliacrilamida a membranas de PVDF mediante la utilización del sistema de transferencia en seco *iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen)*. Esta transferencia se produce por un campo eléctrico (electrotransferencia) mediante el montaje de un sándwich con los componentes requeridos (Figura 16). 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, se minimiza la manipulación y la consistencia de la transferencia es mayor 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. De este modo, al combinarse con la tecnología de la matriz gelificada de los *iBlot® Gel Transfer Stacks*, se genera una alta energía y corriente que aumentan la velocidad y reducen el tiempo de transferencia de las proteínas.

El primer paso fue desencastrar el gel del *cassette* por medio de una espátula, y se situó sobre un papel de filtro humedecido (*iBlot® Filter Paper*). Se eliminaron las partes no deseadas (inferior o reborde y la parte superior correspondiente a los pocillos, *Stacking gel*). A continuación, se abrió el envoltorio conjunto del ánodo y el cátodo (*iBlot® 2 Transfer Stacks*) y se situó el gel en contacto directo sobre la parte correspondiente al ánodo que contenía la membrana de PVDF (0,2 μm), y el papel de filtro situado en la parte superior. Para evitar la aparición de posibles burbujas en la membrana durante la transferencia, se utilizó el rodillo *Blotting Roller*. Después 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*. Finalmente, se colocó el sándwich montado sobre el dispositivo *iBlot® 2 Gel Transfer Device* y una esponja de resina de melamina gris (*iBlot® 2 Absorbent Pad*) en la parte superior sobre el cátodo. Esta esponja lleva una tira metálica adherida para hacer contacto con la tapa de la unidad de transferencia, y de esta forma completar el circuito eléctrico. El exceso de líquido de los *stacks* que se produce durante la transferencia también se absorbió con esta esponja, que también genera la presión necesaria y uniforme para el ensamblaje de las diferentes partes dentro de la unidad. El programa de transferencia elegido tenía unas condiciones de voltaje constante de 20 V y una duración de 10 minutos.

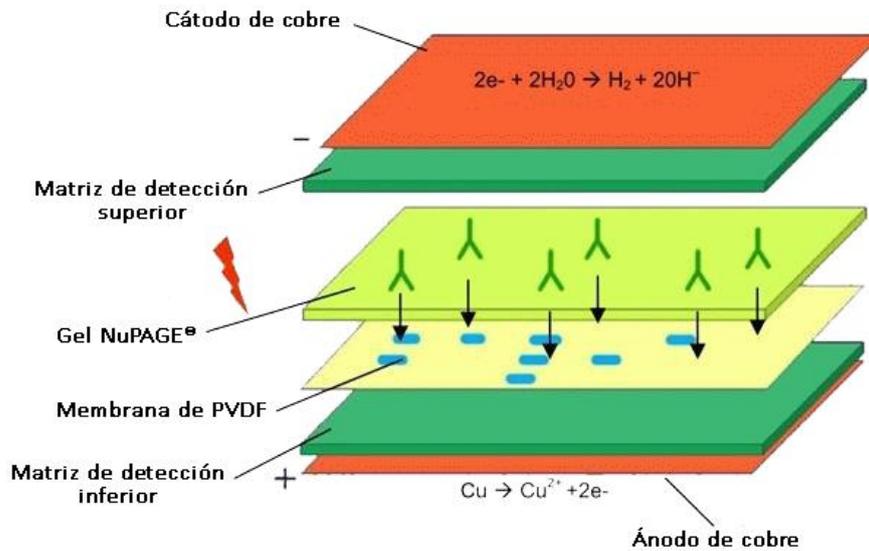


Figura 16. Esquema de transferencia en seco mediante el sistema *iBlot™ Dry Blotting System* (Invitrogen) (modificada de <https://www.thermofisher.com>).

Tras la transferencia, se tiñó el gel para comprobar la eficacia de la misma. Se incubó la membrana de PVDF 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

Se utilizó el kit de tinción de Coomassie (*Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen*) para teñir los geles. La tinción se realizó sumergiendo el gel 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 en agitación. Tras la tinción, se lavó con agua bidestilada, para eliminar el exceso de tinción también 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

Para la inmunodetección de las proteínas transferidas se utilizó el protocolo de Towbin (Towbin et al. 1979):

- Lavado de la membrana con TBS-T: se cambió la solución de bloqueo (BSA) por TBS-T.



- Incubación con el anticuerpo primario: se retiró el TBS-T, y se incubaron las membranas con una solución de TBS-T con el anticuerpo primario anti-*PCDHGA3* (Santa Cruz) a una dilución 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave, en nuestro caso.
- Lavados: se realizaron 3 lavados con TBS-T de 5 minutos cada uno en agitación.
- Incubación con el anticuerpo secundario: se incubaron las membranas en anticuerpo anti-cabra conjugado con fosfatasa alcalina (*Sigma-Aldrich*) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave.
- Lavados: 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos y 3 lavados más con TBS, en agitación.
- Revelado del antígeno-anticuerpo: se incubó la membrana con solución de revelado BCIP/NBT (*SigmaFastTMBCIP /NBT tablet, Sigma-Aldrich*) preparada en el momento de uso y en oscuridad (1 pastilla + 10 ml de agua bidestilada). La reacción se mantuvo en 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 para la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina que se usa como marcado conjugado a un anticuerpo. El 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (BCIP) se trata de un sustrato cromogénico artificial que se usa para la detección colorimétrica de la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual hidroliza BCIP a 5-bromo-4-cloro-3-indolil y fosfato inorgánico (Horwitz & Webb 2003). El bromo-cloro-indol, separado del grupo fosfato, sufre tautomerización y luego mediante NBT se oxida a un compuesto insoluble de color violeta (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro índigo White) (Figura 17).

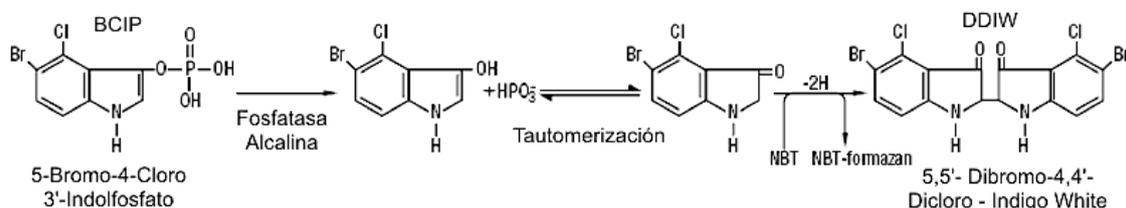


Figura 17. Reacción NBT/BCIP (extraída de <http://lookfordiagnosis.com>).

- Control de carga: se utilizó anti-GAPDH monoclonal en suero de ratón (*Abcam*) a una dilución 1:1000 que se incubó igual que el anticuerpo primario, y a continuación con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa



alcalina (*Sigma-Aldrich*).

- Parada de la reacción colorimétrica: tras la aparición de las bandas se paró la reacción con un lavado de agua bidestilada y se realizaron a continuación 3 lavados con agua bidestilada de 10 minutos para dejar secar finalmente la membrana sobre papel de filtro durante al menos 24 horas.
- Análisis cuantitativo de las membranas: se digitalizó la membrana seca utilizando una estación de análisis de imagen para aplicaciones colorimétricas y fluorescencia (DNR Bio-Imaging Systems), con un software de cuantificación de geles y membranas (GelQuant Pro v 12.2). Se relativizaron finalmente los valores obtenidos a G6PDH y al grupo CNT.



3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y ESTRUCTURAL

3.4.1. Inclusión en resinas Epon 812

Las muestras de tejido miocárdico (1 mm^3) de los corazones con MCD y MCI se fijaron en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4) con 1,5% de glutaraldehído y 1% de formaldehído durante 1 hora a 4°C . A continuación, se lavaron con tampón cacodilato 0,1 M y se incubaron en una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% durante 3 horas a 4°C en oscuridad. Posteriormente, el tejido se incubó en oscuridad en una solución de acetato de uranilo al 2% a temperatura ambiente. En el siguiente paso, se deshidrataron las muestras a 4°C en una serie de acetonas de gradación creciente (25, 50, 75, 90, 95 y 100%).

Para la inclusión se introdujeron las muestras en mezclas de Epon-acetona a proporciones variables (1:3, 1:1 y 3:1) durante 1 hora a 4°C , seguidas de tres inclusiones en Epon Sil sin ningún otro compuesto durante 1 o 2 horas respectivamente a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una inclusión final dejando el tejido durante 48 horas en Epon Sil puro a 60°C .

3.4.2. Corte y tinción de rejillas de cobre

Inicialmente, se evaluaron las secciones semi-finas en un microscopio óptico (*Olympus BX-50*) antes de proceder a realizar las secciones ultrafinas (80 nm). Éstas se realizaron en ultramicrotomo (*Leica EM UC6*) y para el montaje se utilizaron rejillas de níquel. Tras un reposo de 12 horas, se tiñeron las secciones con una serie de reactivos. En primer lugar, una dilución de 1% de acetato de uranilo (2% uranilo, etanol 100°) durante 20 minutos en oscuridad, seguida de un lavado con agua bidestilada. A continuación, una segunda tinción con 2,7% de citrato de plomo (citrato sódico dihidrato 0,2 M; nitrato de plomo 0,08 M; NaOH 1 M) durante 3 minutos (Portolés et al. 1994). Se dejaron secar las rejillas y se conservaron a temperatura ambiente y protegidas de polvo y otros agentes hasta ser analizadas en el microscopio.

3.4.3. Análisis estructural mediante microscopía electrónica de transmisión

Se examinaron las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (*Philips CM-100*), con una cámara *Soft Imaging Systems MegaView III CCD*. Para la observación de la ultraestructura miocárdica se utilizaron aumentos de X15000 de las



diferentes secciones. Antes de comenzar con el análisis, se inspeccionaron las secciones para evitar seleccionar micrografías con artefactos o bandas de contracción. Se realizó un muestreo aleatorio uniforme sistemático (Lucocq 2008) para seleccionar las secciones que se habían escogido en la inspección anterior.

El análisis histomorfométrico del disco intercalar se realizó siguiendo el protocolo descrito por Basso et al (Basso et al. 2006). Se midió el índice de convolución, expresado como la distancia real del disco dividida por la distancia total de extremo a extremo.

Para homogenizar el proceso de análisis de las muestras, se llevaron a cabo unas estrategias que minimizaran la variabilidad entre observadores y la variabilidad individual. La variabilidad inter-observador se intentó reducir realizando el análisis al azar por dos observadores, cada uno de ellos cegado a los resultados obtenidos por el otro y sin conocer la patología de la muestra. La variabilidad intra-observador se intentó disminuir realizando un análisis del mismo número de muestras analizadas por el mismo observador en dos días consecutivos.



3.5. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN DE ARN

Para analizar el transcriptoma celular, es decir las transcripciones de una célula en un momento determinado, se ha desarrollado la técnica RNA-seq. Esta técnica de próxima generación (NGS) permite reproducir la presencia de ARNm, ARNt, ARNr y otros ARN no codificantes, además de cuantificar sus niveles. 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. Esta capacidad permite que se estudien las bases que se están transcribiendo en ese momento exclusivamente y por lo tanto realizar una medición de los niveles de expresión real. Con esta técnica se pueden identificar además otros eventos en el transcriptoma como *splicing* alternativo y de fusión génica o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

La secuenciación se puede realizar a partir de muestras de ARN de novo, sin requerir de un genoma de referencia (Wang et al. 2009). El paso previo a la secuenciación es la generación de una librería del transcriptoma celular (Figura 18), por lo que es importante obtener muestras de calidad. Para mejorar la detección de todos los tipos de ARN, incluyendo los minoritarios, se utilizan kits comerciales que reducen la detección de los más abundantes, como por ejemplo el ARNr, el cual supone el 80% del total en las células.

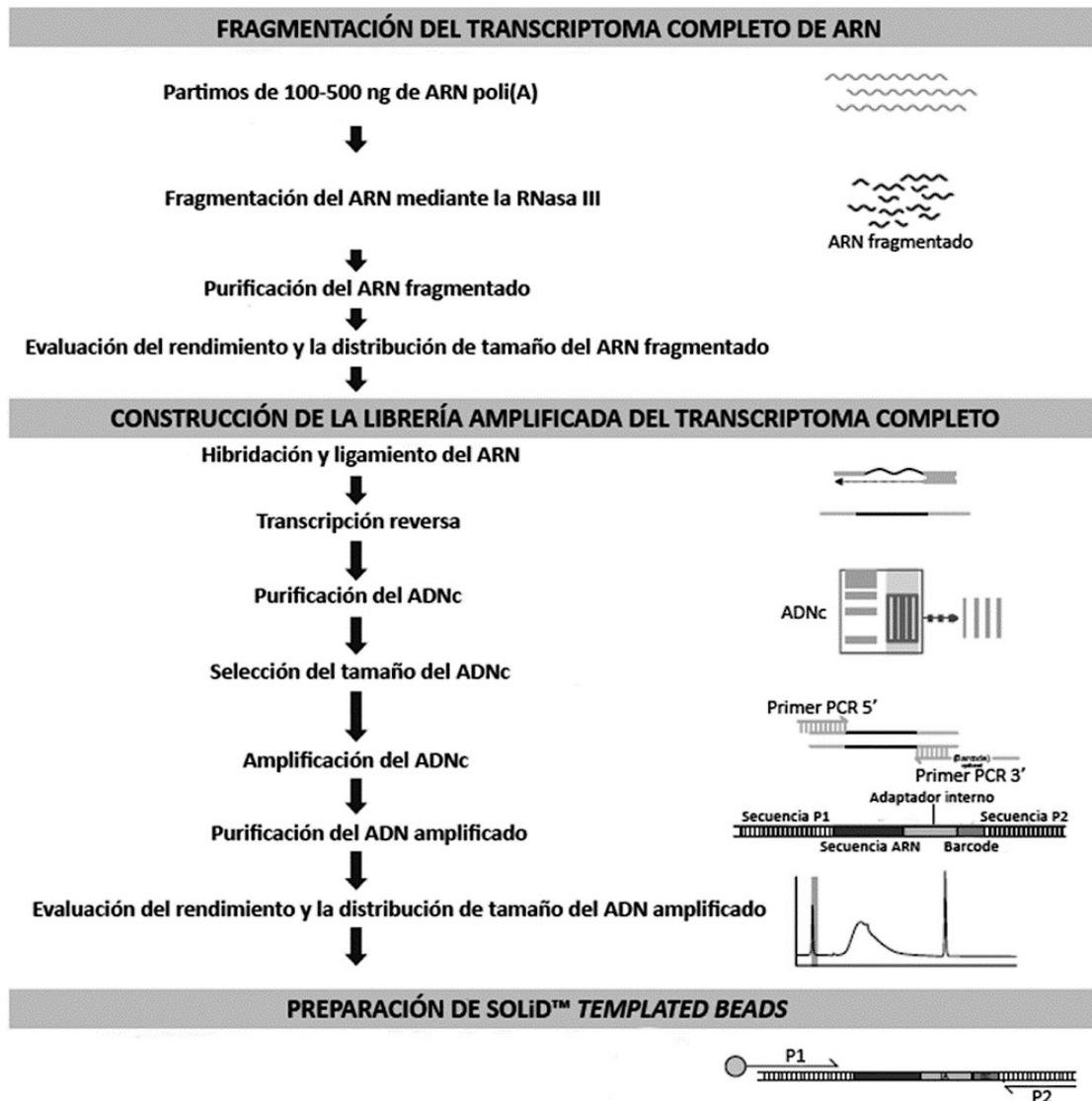


Figura 18. Esquema de la construcción de la librería del transcriptoma completo (modificada de *Applied Biosystems*).

3.5.1. Extracción de ARN poli (A)

Para generar librerías del transcriptoma completo que fueron utilizadas en la secuenciación se obtuvieron muestras de ARN poli(A) 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[®] Reagent* (*Sigma-Aldrich*). Las muestras de VI estaban almacenadas a -80°C , y de ellas se cortó una fracción de aproximadamente 25 mg. Este fragmento se homogenizó en presencia del tampón *TRIzol[®]*, que contiene isotiocianato de guanidina y fenol, mediante el homogenizador *TissueLyser LT* (*Qiagen*) con bolas de carburo de tungsteno de 3 mm.



Para las extracciones de ARN se utilizó el kit *PureLink™ RNA* (Ambion by Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió 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. Se realizaron dos lavados de la columna, primero con 700 µl de tampón de lavado I y a continuación 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 determinó su concentración mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). La integridad de las muestras se evaluó mediante una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*) con el kit *RNA 6000 Nano LabChip®*. Las muestras presentaron una proporción 260/280 mayor de 2,0 y alcanzaron un RIN ≥ 9 (Figura 19). Finalmente, se conservó el ARN extraído y cuantificado a -80°C.

Para el aislado del ARN poli(A) se utilizan 25 µg de ARN extraído previamente, mediante el kit *MicroPoly(A) Purist™* (Ambion by Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra de ARN se unió a una celulosa de oligo(dT), y 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. Para facilitar esta unión, la incubación se realizó 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.

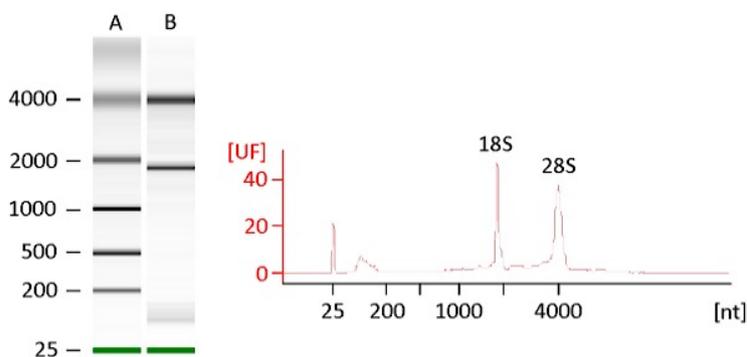


Figura 19. Análisis de la calidad del ARN de una muestra con un RIN de 9,1. En el gel de ARN de la izquierda se observan las bandas del marcador (A) y de la muestra (B). En el electroferograma correspondiente a la derecha, se observan los picos de las subunidades



ribosómicas 18S y 28S. UF, unidades de fluorescencia; nt, nucleótidos.

Por último, 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°. Finalmente, se resuspendió en solución de almacenamiento y se conservó a - 80°C hasta su posterior uso.

3.5.2. Fragmentación y purificación del transcriptoma completo de ARN

3.5.2.1 Fragmentación del ARN poli(A) mediante la RNasa III

La fragmentación del ARN poli(A) es necesaria para obtener los tamaños de inserción adecuados para la secuenciación en el equipo *SOLiD*TM, antes de proceder a la ligación. Primero se preparó una reacción para cada muestra de ARN poli(A) (100-500 ng) a 4°C que contenía 1 µl de tampón RNasa III 10X, 1 µl de RNasa III y agua libre de nucleasas hasta completar los 10 µl. Se incubó en un termociclador a 37°C durante 10 minutos e inmediatamente después, se añadieron 90 µl de agua libre de nucleasas. Esta digestión con RNasa 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. Por lo tanto, la fragmentación proporciona comodidad y robustez para el análisis integral del transcriptoma utilizando el sistema *SOLiD*TM.

3.5.2.2 Purificación del ARN fragmentado

El ARN fragmentado obtenido en el proceso anterior se mantuvo a 4°C y entre 0 a 60 minutos después se purificó usando el *RiboMinus*TM *Concentration Module* (*Invitrogen*). Con este producto se consigue eliminar hasta el 95-98% de las moléculas de ARNr humano, con lo cual se enriquece todo el espectro de transcritos de ARN.

Para purificar el ARN se cargó la muestra en una columna y se añadieron 100 µl de tampón *Binding* y 250 µl de etanol 100° para proceder a continuación a la centrifugación 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. 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 µl de agua libre de RNasas. La columna y el tubo se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto y se recuperó el ARN.



3.5.2.3 Evaluación del rendimiento y la distribución de tamaño del ARN fragmentado

Se utilizó el kit *Quant-iT™ RNA Assay* en el *Qubit® Fluorometer (Invitrogen)* para evaluar el rendimiento del ARN. Para evaluar la distribución de tamaño del ARN fragmentado se diluyó 1 µl 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 µl, una concentración ≥ 50 ng de ARN poli(A) y ≥ 100 ng de ARN total empobrecido en ARNr o ≥ 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.

3.5.3. Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo

3.5.3.1 Hibridación y ligamiento del ARN

Para la construcción de la librería el primer paso es la hibridación y el ligamiento del ARN. Se transfirieron 5 µl de tampón de hibridación (2 µl de *SOLiD™ Adaptor Mix* y 3 µl de solución de hibridación) a 3 µl 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 µl de tampón de ligamiento 2X y 2 µl de mezcla de enzima de ligamiento) y se incubó en un termociclador a 16°C durante 16 horas.

3.5.3.2 Transcripción reversa

En primer lugar, se preparó la mezcla de todas las reacciones que contenía 11 µl de agua libre de nucleasas, 4 µl de tampón RT 10X, 2 µl de *dNTP Mix* y 2 µl de *SOLiD™ RT Primer* para cada reacción. Se incubó esta reacción en un termociclador a 70°C durante 5 minutos y luego se enfrió en hielo. A continuación, se añadió 1 µl de la transcriptasa reversa *ArrayScript™* a cada muestra y se incubó en un termociclador a 42°C durante 30 minutos.

3.5.3.4 Purificación del ADNc

Se purificó el ADNc obtenido mediante el kit *MinElute® PCR Purification (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se transfirió todo el ADNc a un tubo *ependorf* de 1,5 ml y se añadieron 60 µl de agua libre de nucleasas y 500 µl de tampón PB. A continuación, 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 μ l de tampón PE y se eluyó con 10 μ l de tampón EB.

3.5.3.4 Selección del tamaño del ADNc

El tamaño del ADNc se seleccionó mediante una electroforesis con el sistema *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis (Invitrogen)*. Se mezclaron 5 μ l de cada muestra de ADNc y 5 μ l de 50 pb DNA *ladder*, previamente diluido a 40 ng/ μ l, con 5 μ l de 2X *Novex TBE-Urea Sample Buffer*. A continuación se calentaron en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*) a 95°C durante 3 minutos. Se cargaron los 10 μ l de cada muestra en los pocillos de los geles *Novex® 6% TBE- Urea* dentro de una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*). El tampón de electroforesis utilizado fue TBE 1X (*5X Novex® TBE Running Buffer, Invitrogen*) y las condiciones de voltaje fueron constantes de 180 V durante 25 minutos a temperatura ambiente.

El gel se tiñó seguidamente 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, y se puede visualizar utilizando un transiluminador ultravioleta estándar.

3.5.3.5 Amplificación del ADNc

Para cada pieza de gel se preparó previamente a la amplificación una mezcla que contenía 10 μ l de tampón de PCR 10X, 8 μ l de dNTP Mix, 2 μ l de SOLiDTM 5' PCR Primer, 1,2 μ l de ADN polimerasa *AmpliTaq®* y 76,8 μ l de agua libre de nucleasas. Se añadieron 2 μ l de SOLiDTM 3' PCR Primer a la mezcla en tubos de 0,2 ml con cada pieza de gel. Se llevó a cabo la reacción de PCR en un termociclador siguiendo el programa siguiente (Tabla 8):

**Tabla 8. Amplificación del ADNc.**

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

3.5.3.6 Purificación del ADN amplificado

Para purificar el ADN amplificado se añadieron 800 µl de tampón de unión a cada tubo y se utilizó el *PureLink™ PCR Micro kit (Invitrogen)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar, cada muestra se cargó en las columnas del kit y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto. A continuación, se lavó el ADN con 600 µl de tampón de lavado y, finalmente, se eluyó dos veces con 10 µl de tampón de elución.

3.5.3.7 Evaluación del rendimiento y la distribución de tamaño del ADN amplificado

La evaluación de la concentración de ADN purificado se determinó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*. En el caso de ser necesario, se diluyó el ADN a <50 ng/µl mediante el *kit DNA 1000 (Agilent)* para poder realizar una cuantificación precisa. Para evaluar el rendimiento y la distribución de tamaño se usó una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*) con el *kit DNA 1000 (Agilent)* y el software *2100 expert*, obteniendo el perfil que se muestra en la Figura 20. Con esto, 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, que fue de aproximadamente 500 pM.

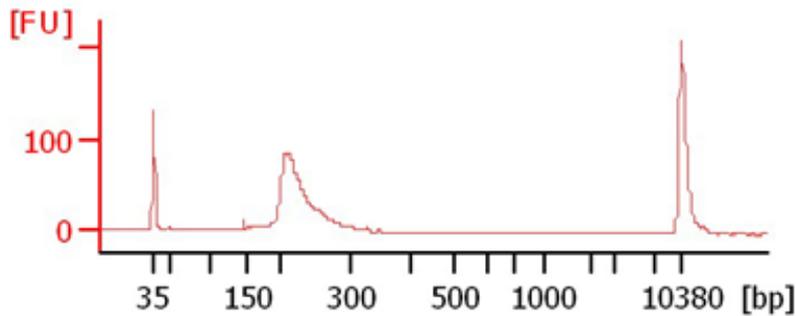


Figura 20. Perfil obtenido en 2100 Bioanalyzer de la librería de ADNc.

3.5.4. Preparación de *Templated Beads*

3.5.4.1. Preparación de la reacción de PCR de emulsión

Para generar muchas copias de la librería de ADNc y, por tanto, aumentar la sensibilidad de la secuenciación, se utiliza la PCR de emulsión (ePCR) ya que los métodos de secuenciación de una sola molécula no son lo suficientemente sensibles. Esta técnica se basa en utilizar un método de emulsión para realizar una amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADN en *SOLiD™ P1 DNA Beads*. Estas 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*). Durante la PCR se recubre la microesfera con copias clonales (30.000 copias o más) de las moléculas aisladas de ADN que serán inmovilizadas para después secuenciarlas (Figura 21). Para la ePCR se utilizó el *kit SOLiD™ ePCR (Life Technologies)*.

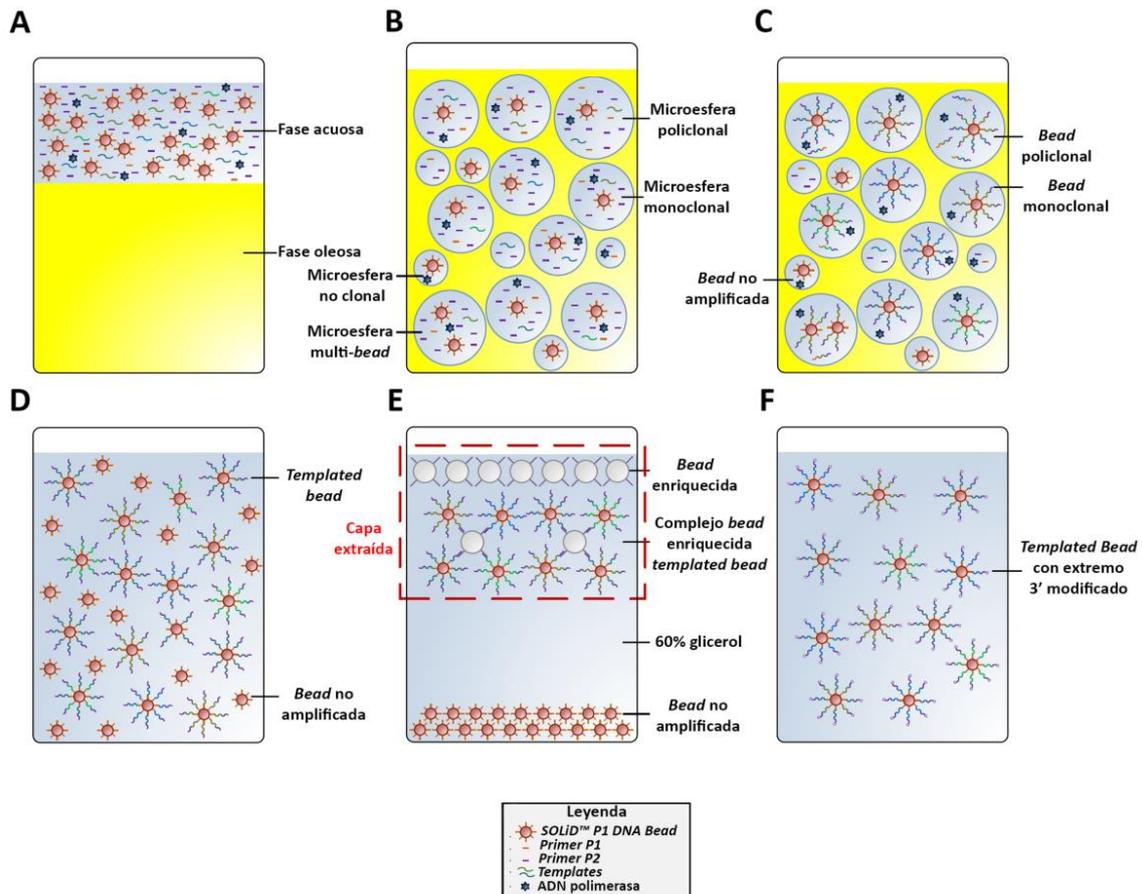


Figura 21. Método de emulsión para la amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADN en SOLiD™ P1 DNA Beads. A, fase acuosa y fase oleosa previa a la emulsión. B, emulsión previa a la amplificación. C, emulsión después de la amplificación. D, *templated beads* y *beads* no amplificadas 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*).

Se prepararon una serie de reactivos previamente:

- Fase oleosa: se mezclaron 1,8 ml de estabilizador 1, 400 μ l 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 21A).
- Fase acuosa (para una concentración de la librería de 1.0 pM): se mezclaron 280 μ l de tampón de PCR 10X, 392 μ l de mezcla de *dNTPs*, 70 μ l de cloruro de magnesio 1 M, 11,2 μ l del cebador 1, 16,8 μ l del cebador 2, 5,6 μ l de *Template* 500 pM, 1.644,4 μ l de agua libre de nucleasas y 300 μ l de la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold*® 5 U/ μ l. (Figura 21A).



- *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.

Para crear la emulsión se utilizó un *ULTRA-TURRAX® Tube Drive (IKA®)* (Figura 21B), que se repartió en cada uno de los pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos (150 µl de esta emulsión en cada uno) 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 9):

Tabla 9. Programa de amplificación de ePCR.

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

3.5.4.2. Rotura de la emulsión y lavado de las *beads*

Tras la ePCR, se rompió la emulsión con 2-butanol y las *templated beads* y las *beads* no amplificadas se lavaron para eliminar el 2-butanol residual, la fase oleosa y la fase acuosa que contiene los reactivos de la PCR. La emulsión se recogió 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.

Se lavaron las *beads* a continuación con 600 µl de tampón de lavado durante 2 minutos. A continuación, se resuspendieron con una pipeta y se transfirieron a un tubo LoBind de 1,5 que se agitó previamente a su centrifugación a 21.000 g durante 1 minuto. Tras el centrifugado, 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. Por último, 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)*.

3.5.4.3. Enriquecimiento de las *templated beads*

Para el enriquecimiento, que consiste en aislar las *templated beads* de las *beads* no amplificadas o mal amplificadas, se usaron *beads* de poliestireno con un adaptador P2 de cadena simple para su captura. En el proceso 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 un primer paso, se eliminó el sobrenadante de las *beads* enriquecidas centrifugando a 21.000 g durante 2 minutos. Se realizaron dos lavados de 900 µl de tampón de unión y lavado y se resuspendieron con 350 µl de tampón de unión y lavado, se añadieron 3,5 µl de oligo de enriquecimiento 1 mM. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, 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. Después se lavaron con 300 µl de tampón desnaturizante 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.

Después de la sonicación de las *templated beads*, la mezcla de *beads* se incubó a 61°C durante 15 minutos e inmediatamente 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 21E). 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.



3.5.4.4. Modificación de los extremos 3'

La unión covalente de las *beads* P2 enriquecidas a los portas de vidrio se facilita mediante la adición de dUTP al extremo 3' de las *templated beads* P2 usando una reacción de la transferasa terminal. Primero 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. A continuación, se lavaron dos veces las *beads* enriquecidas con este tampón y finalmente se resuspendieron en 178 µl al que se añadieron 20 µl de solución de enlazado 1 mM para sonicarlas. Después del sonicado se añadieron 2 µl de transferasa terminal (20 U/µl) y se mantuvo en rotación a 37°C durante 2 horas. Se lavaron las *beads* dos veces con 400 µl de tampón TEX 1X y se sonicaron. Por último, se cuantificaron las *beads* con el *SOLIDTM Bead Concentration Chart* y el espectrofotómetro *NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific)*.

3.5.5. Secuenciación

La secuenciación de las muestras se realizó 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 *SOLiDTM* de *Applied Biosystems* utiliza un método enzimático para la secuenciación que emplea una ADN ligasa (secuenciación por ligación) en vez de una polimerasa para identificar la secuencia. Esta ligasa une los extremos de las moléculas de ADN, es sensible a su estructura y tiene muy baja eficiencia cuando no hay complementariedad entre las bases de dos cadenas. Este hecho resulta en que la secuenciación por ligación depende de la sensibilidad de la ADN ligasa. La molécula a secuenciar es una sola hebra de ADN desconocido y ha de tener por lo 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 22). El ligamiento preferente de la ADN ligasa por su secuencia específica produce una señal correspondiente a la secuencia complementaria en esa posición concreta.

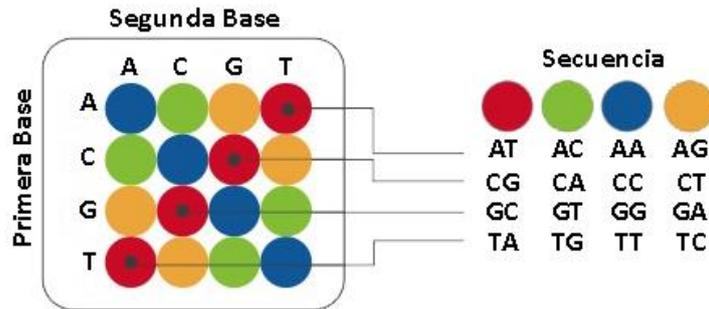


Figura 22. Codificación de dos bases (modificada de *Applied Biosystems*).

Se depositaron las *templated beads* en portas de vidrio en disposición aleatoria después de la modificación de los extremos 3' de (Figura 23). 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. Una vez cargado el porta en la plataforma, los cebadores hibridaron con la secuencia P1 de las *templated beads*.

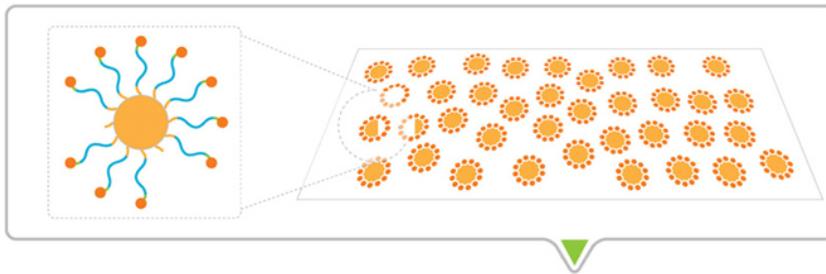


Figura 23. Depósito de *beads* en portas de vidrio (modificada de *Applied Biosystems*).



Una vez cargado el porta en la plataforma, los cebadores hibridaron con la secuencia P1 de las *tempated beads* (Figura 24).

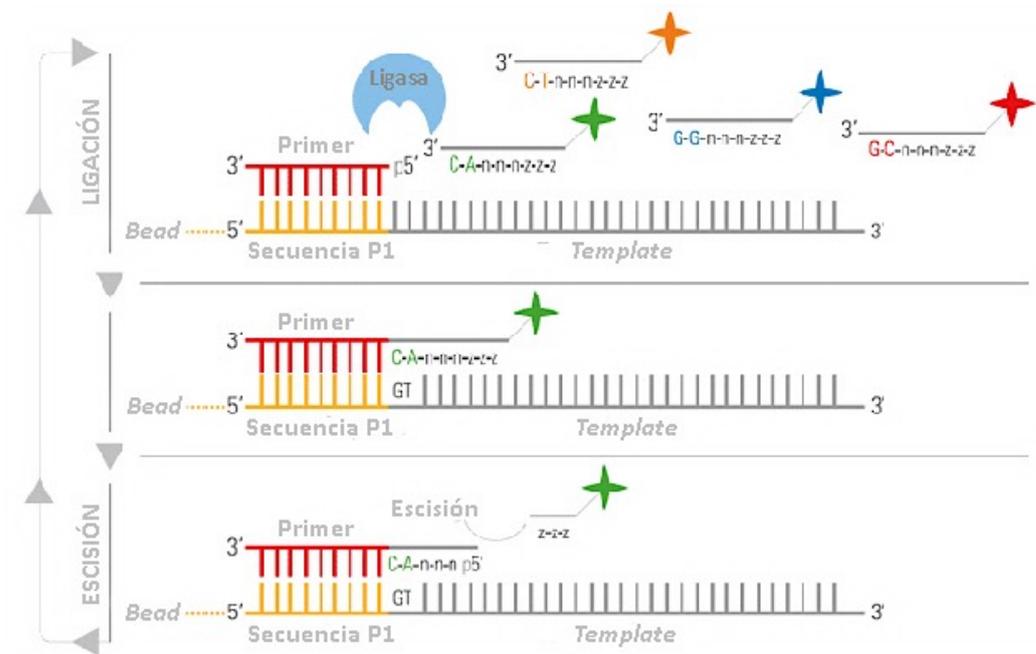


Figura 24. Secuenciación por ligación (modificada de *Applied Biosystems*).

Las sondas de dos bases marcadas con fluorescencia compiten para la ligación al cebador de la secuencia, y la especificidad de la sonda se logra interrogando a todas las primeras y segundas bases de cada reacción de ligación. Se realizan múltiples ciclos de ligación, detección y escisión, determinando el número de ciclos la longitud de la lectura. Después de 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. En total, se completan cinco rondas de restablecimiento de cebadores para cada secuencia (Figura 25). Mediante este proceso, prácticamente todas las bases son interrogadas en dos reacciones de ligación independientes por dos *templates* diferentes. Esta característica es fundamental para determinar la precisión que posee el 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.

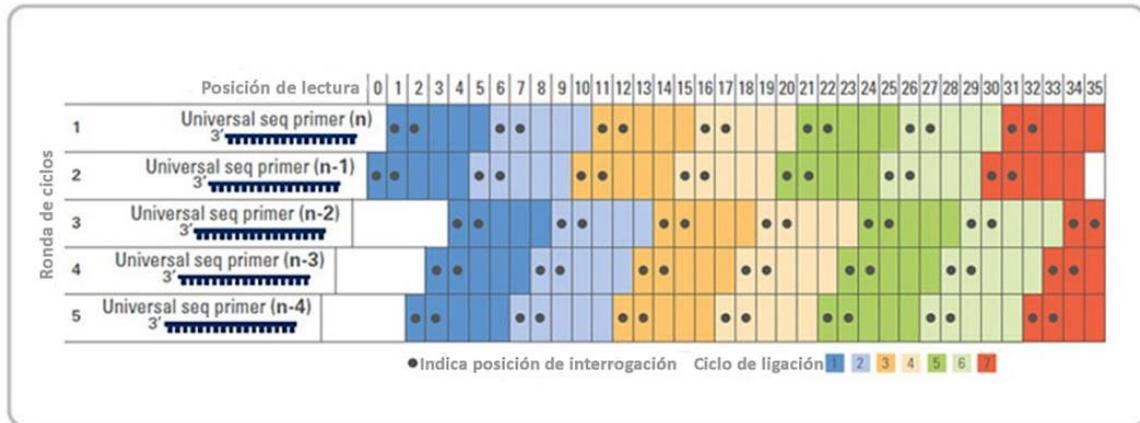


Figura 25. Rondas de ciclos de ligación (modificada de *Applied Biosystems*).

3.5.6. Análisis computacional de los resultados

Se utilizó el algoritmo de mapeo de *Life Technologies* (<http://www.lifetechnologies.com/>; versión 1.3) para mapear las lecturas iniciales de todo el transcriptoma obtenidas por secuenciación contra la última versión del genoma humano (versión *GRCh37/hg19*). Se utilizaron los parámetros estándar del software *BioScopeTM*, 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* (Li et al. 2009). 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). A continuación, se estimó la predicción de genes usando el método de *Cufflinks* (Trapnell et al. 2010) y los niveles de expresión se calcularon usando el software *HTSeq*, versión 0.5.4p3 (Anders et al. 2015). Este método elimina las lecturas multimapeadas, considerando sólo las lecturas únicas para la estimación de la expresión génica.



El análisis de expresión diferencial entre las condiciones patológicas y las normales se realizó aplicando el método *edgeR*, versión 3.2.4 (Robinson et al. 2010). Este método se basa en diferentes procesos de normalización, profundidad de muestras globales, composición CG y longitud de los genes. Para incluir los genes en el análisis se consideró un mínimo de 20 lecturas. Para estimar la varianza de los datos de RNA-seq en el proceso de la expresión diferencial, se usó un modelo de *Poisson* que también tiene en cuenta la variabilidad biológica. Como técnica para moderar el grado de dispersión de los transcritos se usaron métodos de *Bayes* empíricos que mejoran la fiabilidad de la inferencia. Los datos cuantitativos obtenidos en el análisis de RNA-seq fueron depositados en la base de datos:

NIH GEO (GEO#GSE55296)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55296>) (Edgar et al. 2002)



3.6. CARACTERIZACIÓN EN CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES

Tras obtener los resultados del análisis del transcriptoma con RNA-seq, se decidió estudiar la variedad de categorías funcionales diferentes presentes en el total de genes diferencialmente expresados. Para ello, se utilizan herramientas bioinformáticas que realizan esta clasificación funcional y permiten otras opciones como establecer redes entre los genes. Estas redes que agrupan genes funcionalmente similares, son de gran utilidad para entender los mecanismos de determinadas patologías, ya que nos dan información sobre cuáles de ellos están asociados en el momento del análisis, que suele coincidir con el desarrollo de la enfermedad.

En el caso de la técnica de RNA-seq que se realizó con las muestras de los pacientes con MCD, MCI y los controles sanos, se establecieron las categorías funcionales existentes mediante el uso de *ToppGene suite* (Chen et al. 2009). Este portal aplica una prueba hipergeométrica que permite analizar el enriquecimiento y priorización de genes candidatos de una lista de genes ya existente, basada en anotaciones funcionales e interacciones proteicas. Se seleccionó el conjunto de genes a clasificar mediante la herramienta *ToppFun*, que tenían un *fold change* $\geq 1,3$ y una $p < 0,05$, aplicando la corrección de Bonferroni.

A continuación, se representaron las categorías funcionales más significativas 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>).



4. PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES

Todos los procedimientos *in vivo* de este estudio fueron previamente supervisados y aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Fundación Hospital La Fe (PI-13/00100), respetando la legislación española sobre “Protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos” (Real Decreto 53/2013) y las Directivas de la Comunidad Europea al respecto.

El modelo animal utilizado para este estudio fueron ratas (*Rattus norvegicus*) macho adultos (> 2 meses) de 250-300 gramos de peso de las cepas *Oncins France Strain A* (OFA) y Wistar (W), ambas obtenidas de los laboratorios Charles River. Las condiciones de estabulación de los animales fueron a una temperatura estable de 22°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y comida y agua *ad libitum*, esterilizadas por irradiación. Se clasificaron en tres grupos: ratas a las que se les realizó una ligadura coronaria permanente produciendo un infarto agudo de miocardio (IAM) (n=29), un grupo de ratas operadas, pero sin ligadura (SHAM) (n=4) y otro grupo de ratas CNT (n=6).

4.1. MODELO DE INFARTO DE MIOCARDIO

4.1.1. Administración de fármacos

Para realizar el infarto en los animales, se utilizó un protocolo anestésico estandarizado. El primer paso consistió en la inducción del animal mantenido en cámara anestésica con una mezcla de oxígeno y sevoflurano (5% v/v *Abbott*) durante 2 minutos aproximadamente o hasta visualizar un cese de la actividad motora. Se procedió a la intubación endotraqueal de la rata con un catéter de 18 G (1,3 mm de diámetro) y una longitud de 2” (5,1 cm) (*Braun*). Para ello, se colocó a la rata en decúbito supino sobre una plataforma y se sujetaron los miembros para estabilizar la posición. Mediante la iluminación con una fuente de luz fría dirigida a la zona ventral del cuello y extrayendo la lengua con delicadeza, se visualizó la glotis y tráquea de la rata. Se procedió a la intubación y se conectó a la rata inmediatamente a un respirador automático (*Harvard Apparatus, modelo 683*) con unos parámetros establecidos de 2 ml de volumen tidal y 140 respiraciones por minuto. La correcta intubación se comprobó mediante la confirmación de aliento sobre una superficie de cristal primero y asegurando el movimiento rítmico del tórax con respecto a la ventilación asistida después. Se fijó el tubo al animal y a la mesa quirúrgica. El plano anestésico adecuado se mantuvo durante el procedimiento quirúrgico mediante sevoflurano al



2%, 0,3 ml de N₂O y 0,1 ml de O₂. La rata se colocó en una superficie de corcho y se tapó con un paño quirúrgico. Al tratarse de un procedimiento doloroso, se utilizó un fármaco analgésico, el fentanilo (*Fentanest, Kern Pharma*) a una dosis de 0,05 mg/kg inoculada inmediatamente antes de comenzar la cirugía por vía intraperitoneal (IP) y una dosis de 0,05 mg/kg IP de buprenorfina (*Buprex, Schering-Plough S.A.*) 20 minutos antes de empezar la cirugía. Para evitar las contracciones musculares se infiltraron dosis de 6 mg/kg lidocaína intraincisionalmente al inicio del procedimiento. Post-quirúrgico se les administró una dosis de 0,05 mg/kg de buprenorfina IP u oral cada 6-8 horas que se mantuvo durante 48 horas. Para la administración oral, se prepararon gelatinas de fresa en placas que se administraron a las ratas en el rango especificado. Se añadió la buprenorfina a la gelatina cuando estaba fría y antes de cuajar a concentración de una ampolla (0,3 mg) en 2 cc de gelatina. Se administró 1 cc a cada rata de 300 gr y variando según pesos.

La eutanasia de las ratas se realizó según la normativa vigente, administrando una dosis anestésica de ketamina/diazepam y realizando una exsanguinación posterior, o bien inoculando 1 ml de KCl 0,2 M intracardiaco.

4.1.2. Procedimiento quirúrgico

La rata se colocó en decúbito supino sobre una base de corcho aislada y se inmovilizaron los miembros con cintas adhesivas. Se hidrataron los ojos con lágrima en gel para evitar úlceras corneales (*Lubrifilm, Alcon Cusí*). Para la preparación de la zona quirúrgica, se rasuró el tórax y se desinfectó con povidona diluida (*Betadine, Viatrix Manufacturing*). Se cubrió al animal con un paño quirúrgico dejando el tórax libre (Figura 26) para la realización de una toracotomía lateral entre el 4º y 5º espacio intercostal izquierdo.

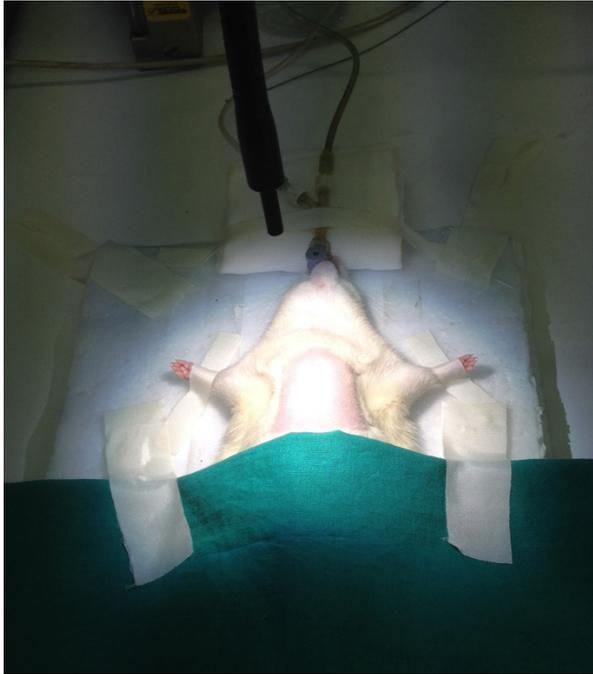


Figura 26. Preparación de la zona quirúrgica.

Primero se realizó una incisión cutánea de dos centímetros dirigida hacia el esternón y zona media del tórax. Se separó el tejido subcutáneo y tras la disección de los músculos pectorales e intercostales (estos últimos cranealmente a la costilla para evitar el paquete vascular que corre caudalmente a las mismas) se accedió a la cavidad torácica. Mediante la colocación de separadores en el espacio intercostal y gasas debajo del tórax de la rata se consiguió exponer el corazón. Después, con la ayuda de una torunda empapada en suero salino fisiológico (SSF) se retiró el timo cranealmente. A continuación, con delicadeza y evitando el lóbulo pulmonar craneal, se realizó la pericardiotomía incidiendo con unas pinzas romas de microcirugía. Se limpió la zona con una gasa húmeda y estéril para poder visualizar el campo y partiendo de unos 4 mm debajo de la aurícula izquierda se buscó la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDAI), objetivo de ligadura (Figura 27). Para la oclusión de la misma se utilizó sutura de monofilamento no reabsorbible de 5/0 (*Premilene, Braun*) mediante ligadura permanente. Al no disponer de monitorización intraoperatoria, se evidenció la correcta ligadura de la arteria y del infarto por tanto debido al cambio que se produce de forma inmediata en la zona infartada (color azulado).

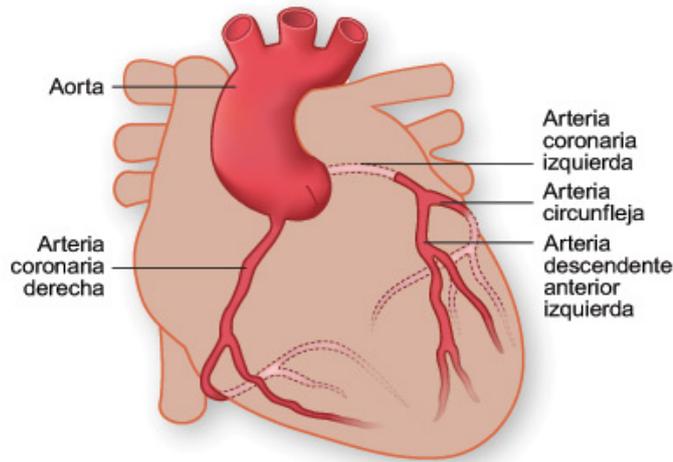


Figura 27. Principales arterias coronarias cardiacas (extraída de http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy_Esp/coroea_sp.cfm).

Para finalizar, se suturó el tórax con una sutura en X de monofilamento reabsorbible de 3/0 (*Monosyn, Braun*), se aseguró que no había permeabilidad torácica para que la presión negativa torácica se recuperara tras el cierre. Se cerró la capa muscular con una sutura continua y se irrigaron los tejidos con SSF. Finalmente se cerró la piel con una sutura intradérmica y se desinfectó con povidona la herida. Unos minutos después de retirar el agente inhalatorio se comenzaron a apreciar reflejos respiratorios y ventilaciones del animal, momento en el cual se desconectó y se dejó aislado y atemperado en una jaula con una manta eléctrica.



4.2. PARÁMETROS DE FUNCIÓN CARDIACA

Para evaluar la función ventricular de las ratas, se realizaron ecocardiografías previas y postoperatorias. De esta forma se obtuvo información detallada de la morfología cardiaca de cada individuo y de su evolución en el tiempo.

Se administró una combinación de fármacos anestésicos para la inmovilización de los animales y poder tomar las imágenes. Se preparó una dosis de 50 mg/kg de ketamina (*Ketalar, Pfizer*) y 5 mg/kg de diazepam (*Valium, Roche*) y 15 minutos previamente a la ecocardiografía se inoculó la mitad de la dosis a la rata, inoculando el restante si era necesario. Se rasuró el tórax y se colocó al animal sobre una manta eléctrica en decúbito supino. Para la adquisición de imágenes se utilizó el sistema de ultrasonido *Envisor C1 (Philips)* junto a un transductor lineal de 10 MHz.

La toma de imágenes fue realizada por el Doctor José Miguel Rivera Otero, cardiólogo, y se realizó de 1 a 3 días antes de la cirugía, para registrar la función ventricular basal de la rata, y post-infarto se realizaron 7 días y 60 días después. En el estudio se realizaron ecocardiografías transtorácicas en el eje corto mediante 3 cortes: uno detrás de las aurículas, otro corte en la zona media ventricular a la altura de los músculos papilares y por último otro en la zona del ápex. Se tomaron imágenes en modo-M (imagen lineal a la que se le ha introducido la variable tiempo) y también en modo 2D (imagen bi-dimensional en tiempo real). Para calcular los parámetros funcionales se midieron tres ciclos cardiacos consecutivos utilizando métodos estándar (Litwin et al. 1994).

Se midieron los diámetros del VI (DVI) en sístole y diástole en el modo-M y el área interna del VI (AVI) en el modo 2D (Figura 28) según el protocolo descrito por Litwin. A partir de estas medidas se calculó la fracción de acortamiento y la fracción de eyección:

Fracción de Acortamiento (FA): $[(DVI_d - DVI_s) / DVI_d] \times 100$ Donde: DVI_d : Diámetro ventrículo izquierdo diastólico DVI_s : Diámetro ventrículo izquierdo sistólico

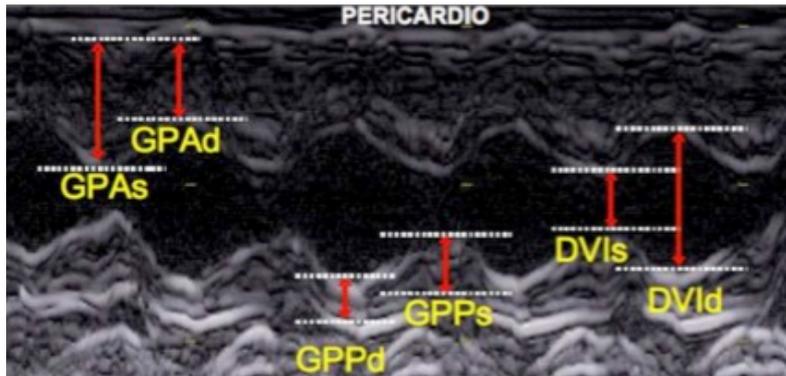


Figura 28. Medidas en modo-M del VI (extraída de Cerrada et al 2012).

4.3. TINCIÓN CON TETRAZOLIO

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el corazón para realizar la tinción de tetrazolio. El cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTZ) (*Sigma*) reacciona con las células en función de su actividad mitocondrial; tiñe de rojo oscuro el miocardio viable ya que el rojo de formazán reacciona por acción de deshidrogenasas. En cambio, las áreas infartadas no se tiñen debido a la necrosis celular y la ausencia de actividad de deshidrogenasas. Gracias a este proceso se pueden visualizar el tamaño del infarto según la zona de la ligadura de la ACDAI y realizar las medidas.

Para la tinción, se siguió el protocolo descrito por Vivaldi (Vivaldi et al. 1985). En primer lugar, se realizaron cortes transversales seriadas del corazón desde la base hasta el ápex, con un grosor de unos 5 mm. Estas secciones se sumergieron en una solución de TTZ al 1% en tampón fosfato 0,1 M (PBS) con pH 7,4 durante 20 minutos a 37°C. Por último, se lavaron las secciones con PBS y se guardaron a 4°C hasta realizar las imágenes y su estudio.



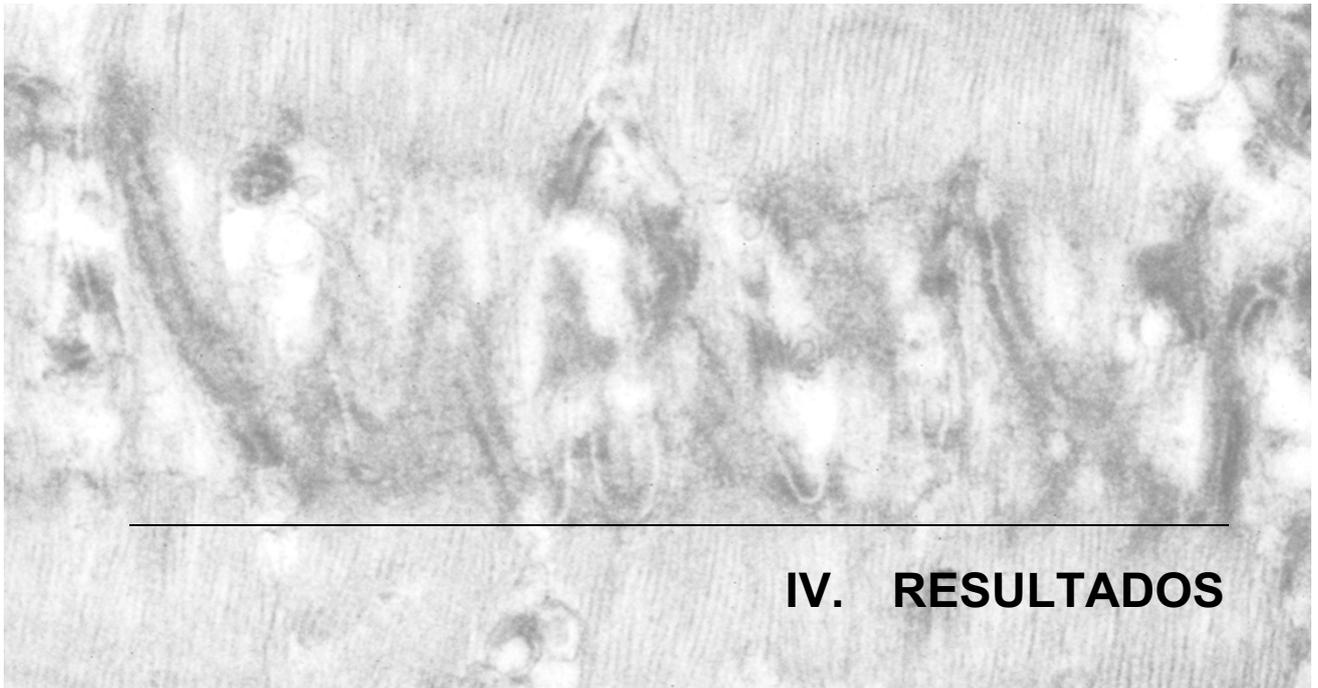
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se utilizó el test de *Kolmogorov-Smirnov* para analizar la distribución de las variables. Todos los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE) para las variables continuas y como porcentaje para las discretas. El test *t-Student* se llevó a cabo para la comparación de las características clínicas de las variables continuas y el test exacto de Fisher para las variables discretas. Los niveles de ARNm que se obtuvieron se compararon entre los grupos de estudio utilizando 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*. Los niveles de proteína se analizaron de la misma forma. Por último, para el estudio de las relaciones entre niveles de ARNm/proteína y los parámetros de función ventricular se realizó un análisis de regresión simple utilizando el coeficiente de correlación (*r*) de *Pearson*. Se asumió el nivel de significación estadística 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

La variabilidad entre las diferentes muestras cardíacas es una limitación inherente en este tipo de estudios, debido a su origen humano y los diferentes tratamientos farmacológicos al que los pacientes estaban sometidos. Algunos de estos tratamientos convencionales podrían afectar a los niveles de ARNm y proteicos. Se eligieron pacientes con MCD sin antecedentes familiares para asegurarnos de que la población era lo más etiológicamente homogénea posible, así como la elección de pacientes con MCI de etiología isquémica. El número de muestras obtenidas y analizadas en este estudio es significativo, siendo, por lo tanto, los resultados obtenidos extrapolables a las poblaciones de pacientes con estas patologías. Por último, la importancia de las muestras de este estudio también radica en el momento de recogida de las muestras, directamente en quirófano durante el trasplante, mejorando las condiciones y la calidad de la muestra, que no se podrían obtener en otros momentos y mediante biopsias o necropsia.



IV. RESULTADOS



1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN

Se estudiaron los niveles de expresión génica de 26 pacientes con insuficiencia cardiaca, 13 de origen isquémico y 13 con cardiomiopatía dilatada mediante la técnica RNA-seq. Esta técnica proporcionó una mayor sensibilidad y precisión en la detección de genes diferencialmente expresados que otras técnicas utilizadas en estudios anteriores, como los realizados con la técnica de microarrays por nuestro grupo (Ortega et al. 2015). Se analizaron también 10 muestras de CNT sanos.

Los pacientes con MCI eran varones, con una media de edad de 54 ± 7 años y estaban clasificados funcionalmente, según la NYHA, como III a IV. Presentaban diversas comorbilidades como diabetes e hipertensión (38% y 30%, respectivamente) además de encontrarse un elevado número de pacientes fumadores (84%). El grupo de pacientes con MCD estaba compuesto también por una mayoría de varones (92%) con una edad media de 51 ± 11 años. Funcionalmente, según la NYHA, estaban clasificados en los grupos III y IV y presentaban diversas comorbilidades (17% de diabéticos e hipertensos). En cuanto a los tamaños ventriculares, se observaron aumentados en las medidas del DDVI y DSVI de los pacientes con MCD respecto al grupo de MCI. Las características clínicas de los pacientes del estudio se muestran en la Tabla 10.

Todos los pacientes con IC recibían un tratamiento farmacológico de manera prolongada: el 60% estaban tomando antialdosterónicos, un 54% diuréticos, un 50% IECAs, un 42% beta bloqueantes, un 31% estatinas, un 27% ácido acetilsalicílico y Sintrom, un 19% Trangorex y un 15% insulina, entre otros fármacos en menor porcentaje.

**Tabla 10. Características clínicas de los pacientes con insuficiencia cardiaca (n=26).**

VARIABLE	MCI (N=13)	MCD (N=13)
EDAD (AÑOS)	54±7	51±11
VARONES (%)	100	92
NYHA CLASIF.	III-IV	III-IV
ÍNDICE M.C. (KG/M ²)	26±4	27±5
HEMOGLOBINA (MG/DL)	14±3	13±3
HEMATOCRITO (%)	41±6	39±8
COLESTEROL TOTAL (MG/DL)	162±41	147±37
HIPERTENSIÓN (%)	30	17
FUMADORES (%)	84	50
DIABÉTICOS (%)	38	17
FE (%)	24±4	20±7
FA (%)	13±2	11±4
DSVI (MM)	55±7	71±12*
DDVI (MM)	64±7	80±11**
DURACIÓN DE LA ENF. (MESES)	48±41	77±71

MCI, miocardiopatía isquémica; MCD, miocardiopatía dilatada; NYHA, New York Heart Association; MC, masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo. La duración de la enfermedad se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón. *p<0,01; **p<0,001.



1.1. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA MIOCARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Tras obtener el extracto transcriptómico a gran escala de estos pacientes mediante el análisis de RNA-seq, se estudiaron los niveles de ARNm comparados con controles sanos (CNT n=10) para determinar si existían diferencias entre los grupos y averiguar la implicación de nuevos genes en el desarrollo y progresión de la MCI. El análisis mostró diferencias significativas ($FC \geq 1,3$ y $p < 0,05$) en los niveles de expresión de un total de 1712 genes en pacientes isquémicos comparados con el grupo CNT. En total, 815 genes estaban sobreexpresados en estos pacientes, mientras que 897 habrían reducido sus niveles de expresión comparados con CNT.

A continuación, se estudiaron los genes relacionados con adhesiones celulares, encontrando diferencias significativas en los niveles de expresión respecto a los controles. En el grupo de MCI, se encontraron 42 genes con niveles de ARNm alterados, de los cuales 15 estaban aumentados y 27 reducidos. Estas alteraciones en la expresión de los genes de adhesiones celulares de los pacientes con MCI están representadas en la Figura 29.

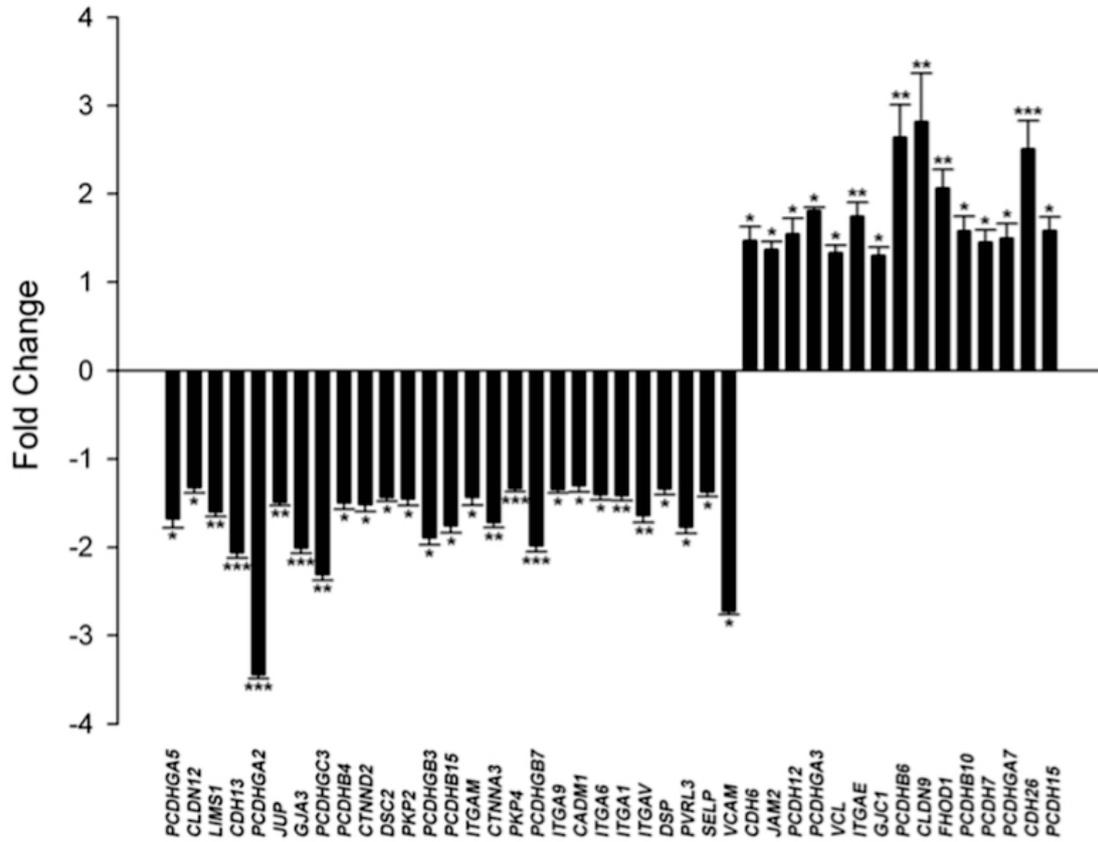


Figura 29. Genes codificantes de moléculas de adhesión diferencialmente expresados en la MCI. Los valores del grupo CNT se han referido a 1. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de valores de expresión relativa del ARNm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. vs. grupo CNT. CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica.



Tabla 11. Lista de genes significativamente alterados en las adhesiones celulares de pacientes con miocardiopatía isquémica.

Gen	Descripción	Uniones	Fold C.	P-valor
<i>CADM1</i>	Molécula de adhesión celular 1	Adherentes	-1.30	0.037
<i>CDH6</i>	Cadherina 6, cadherina K	Adherentes	1.47	0.042
<i>CDH13</i>	Cadherina 13, cadherina H	Adherentes	-2.06	6.1 x 10 ⁻⁴
<i>CDH26</i>	Proteína <i>cadherin-like 26</i>	Adherentes	2.51	5.8 x 10 ⁻⁴
<i>CLDN9</i>	Claudina 9	Estrechadas	2.82	0.008
<i>CLDN12</i>	Claudina 12	Estrechadas	-1.32	0.025
<i>CTNNA3</i>	Catenina α 3	Adherentes	-1.71	0.004
<i>CTNND2</i>	Catenina δ 2	Adherentes	-1.52	0.024
<i>DSC2</i>	Desmocolina 2	Desmosoma	-1.44	0.041
<i>DSP</i>	Desmoplaquina	Desmosoma	-1.34	0.011
<i>FHOD1</i>	<i>Formin homology 2 domain containing 1</i>	Inmunológica	2.07	0.001
<i>GJA3</i>	Proteína GAP α 3, conexina 46	GAP	-2.01	7.1 x 10 ⁻⁴
<i>GJC1</i>	Proteína GAP γ 1, conexina 45	GAP	1.30	0.010
<i>ITGA1</i>	Integrina α 1	Adh. focales	-1.42	0.004
<i>ITGA6</i>	Integrina α 6	Adh. focales	-1.40	0.028
<i>ITGA9</i>	Integrina α 9	Adh. focales	-1.34	0.047
<i>ITGAE</i>	Integrina α E	Adh. focales	1.75	0.003
<i>ITGAM</i>	Integrina α M	Adh. focales	-1.43	0.031
<i>ITGAV</i>	Integrina α V	Adh. focales	-1.64	0.005
<i>JAM2</i>	<i>Junctional adhesion molecule B</i>	Inmunológica	1.36	0.018
<i>JUP</i>	Placoglobina	Desmosoma	-1.49	0.006
<i>LIMS1</i>	Prot. LIM de céls senesc. dom. Ag1	Adh. focales	-1.60	0.001
<i>PCDH7</i>	Protocadherina 7	Adherentes	1.45	0.048
<i>PCDH12</i>	Protocadherina 12	Adherentes	1.55	0.033
<i>PCDH15</i>	Protocadherina 15	Adherentes	1.59	0.031
<i>PCDHB4</i>	Protocadherina β 4	Adherentes	-1.50	0.025
<i>PCDHB6</i>	Protocadherina beta β 6	Adherentes	2.64	0.001
<i>PCDHB10</i>	Protocadherina beta β 10	Adherentes	1.58	0.025
<i>PCDHB15</i>	Protocadherina beta β 15	Adherentes	-1.76	0.042
<i>PCDHGA2</i>	Protocadherina γ subtipo A2	Adherentes	-3.45	4.1 x 10 ⁻⁴
<i>PCDHGA3</i>	Protocadherina γ subtipo A3	Adherentes	1.81	0.035
<i>PCDHGA5</i>	Protocadherina γ subtipo A5	Adherentes	-1.68	0.031
<i>PCDHGA7</i>	Protocadherina γ subtipo A7	Adherentes	1.50	0.020
<i>PCDHGB3</i>	Protocadherina γ subtipo B3	Adherentes	-1.89	0.039
<i>PCDHGB7</i>	Protocadherina γ subtipo B7	Adherentes	-1.98	6.5 x 10 ⁻⁴
<i>PCDHGC3</i>	Protocadherina γ subtipo C3	Adherentes	-2.31	0.006
<i>PKP2</i>	Placofilina 2	Desmosoma	-1.46	0.044
<i>PKP4</i>	Placofilina 4	Desmosoma	-1.34	1.0 x 10 ⁻⁴
<i>PVRL3</i>	Nectina 3	Adherentes	-1.77	0.005
<i>SELP</i>	Selectina-P	Inmunológica	-1.38	0.017
<i>VCAM1</i>	Molécula de adhesión vascular 1	Inmunológica	-2.73	0.011
<i>VCL</i>	Vinculina	Adherentes	1.33	0.039



La Tabla 11 representa las descripciones de los genes relacionados con las adhesiones celulares que mostraron sus resultados (ARNm) alterados en la MCI, indicando a qué tipo de uniones pertenecen, así como su valor *fold change* y P valor. Como se observa en la Tabla 11, las modificaciones mayoritarias (52 %) se encuentran entre las uniones adherentes.

Para comparar los patrones de expresión entre pacientes con MCI y controles sanos, se realizó una representación gráfica en un *Heat map* y *hierarchical clustering* (Figura 30), donde se observó la diferencia en dos grupos con expresión claramente diferencial.

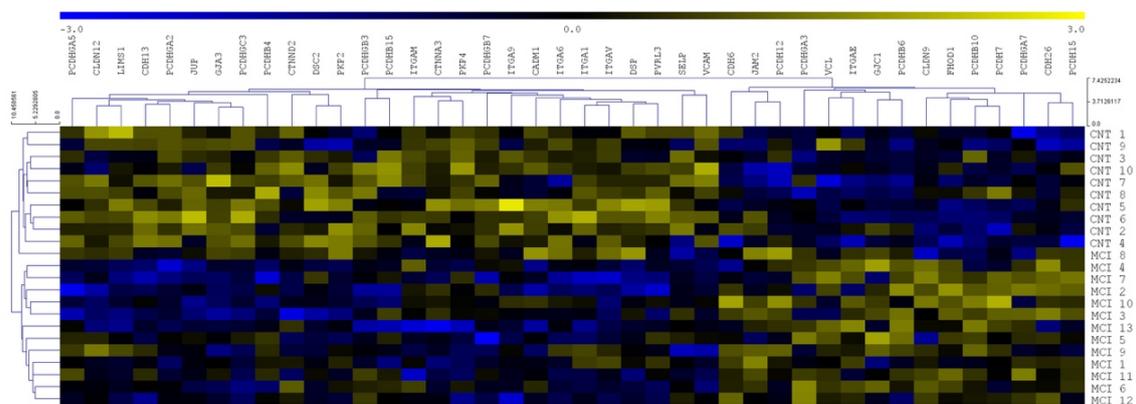


Figura 30. Heat map con hierarchical clustering representando el perfil de expresión génica de las adhesiones celulares en la MCI. La barra de colores representa el nivel de expresión relativa de cada gen, azul indica menor expresión y amarillo mayor expresión. Las 10 primeras filas representan la expresión en cada muestra CNT y las 13 filas inferiores muestran la expresión en cada paciente MCI. CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica.

En el margen derecho de la Figura 30 se observan que los dos grupos de muestras, MCI y CNT, se han agrupado según su nivel de expresión, siendo claramente diferentes en el conjunto de genes alterados, unos sobreexpresados y otros infraexpresados al comparar con CNT.



1.1.1. Clasificación de las categorías funcionales de genes alterados en la miocardiopatía isquémica

Utilizando la herramienta *ToppGene* se clasificaron los genes alterados en categorías según la función molecular, y el resultado fue que las adhesiones celulares representaban un grupo muy destacado (16%) dentro de los genes diferencialmente expresados. Dentro de esta categoría, también se analizó el tipo de unión que representaba cada gen, y se encontraron genes codificantes de proteínas con funciones de adhesión célula-célula, célula-matriz, migración celular y adhesión leucocitaria. En la Figura 31 se representan las categorías analizadas y los grupos obtenidos en el análisis de los genes del estudio.

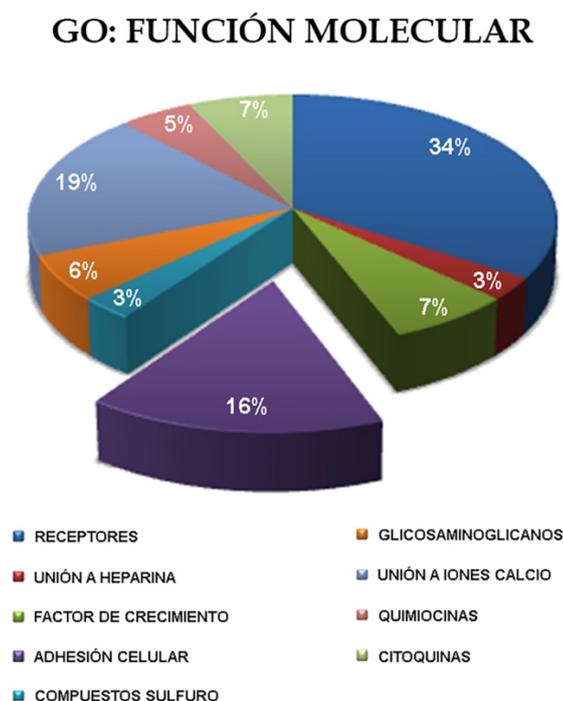


Figura 31. Representación funcional de las principales moléculas de adhesión, mostrando las adhesiones celulares como la tercera categoría más alterada en la MCI. Los resultados de *Gene Ontology* obtenidos con *ToppGene* se basaron en la función molecular y se corrigieron utilizando el método Bonferroni. El diagrama incluye las principales categorías en las que se clasifican las moléculas de adhesión. Receptores; Unión a heparina; Factor de crecimiento; Adhesión celular; Compuestos sulfuro; Glicosaminoglicanos; Unión a iones calcio; Quimiocinas; Citoquinas.



1.1.2. Relaciones entre las alteraciones en la expresión génica de las adhesiones celulares en los pacientes con MCI y su función ventricular

Se estudiaron los principales parámetros hemodinámicos y funcionales de los pacientes mediante ecocardiografía. En el grupo de MCI se disponían de los datos de 11 pacientes. Se estudió la relación entre los niveles de ARNm de las moléculas de adhesión en los pacientes con sus datos de función ventricular. En la Figura 32 se representan las relaciones lineales observadas en los niveles de ARNm de los pacientes con MCI. El gen que codifica la protocadherina A3, *PCDHGA3*, resultó relacionado con la función cardiaca de forma significativa en los pacientes con MCI. *PCDHGA3* mostró una relación inversamente proporcional con la FE ventricular ($r=-0,793$; $p=0,004$) (Figura 32B) y también se encontraron relaciones directas con los diámetros ventriculares, DSVI y DDVI ($r=0,867$, $p=0,001$; $r=0,781$, $p=0,005$) (Figura 32C y D). En cuanto a los factores hemodinámicos, los niveles de *PCDHGA3* estaban inversamente relacionados con el volumen latido ($r=-0.826$, $p=0.003$) (Figura 32A). En el anexo I se detallan todas las relaciones estadísticas encontradas entre los genes alterados en los pacientes con IC y su función ventricular.

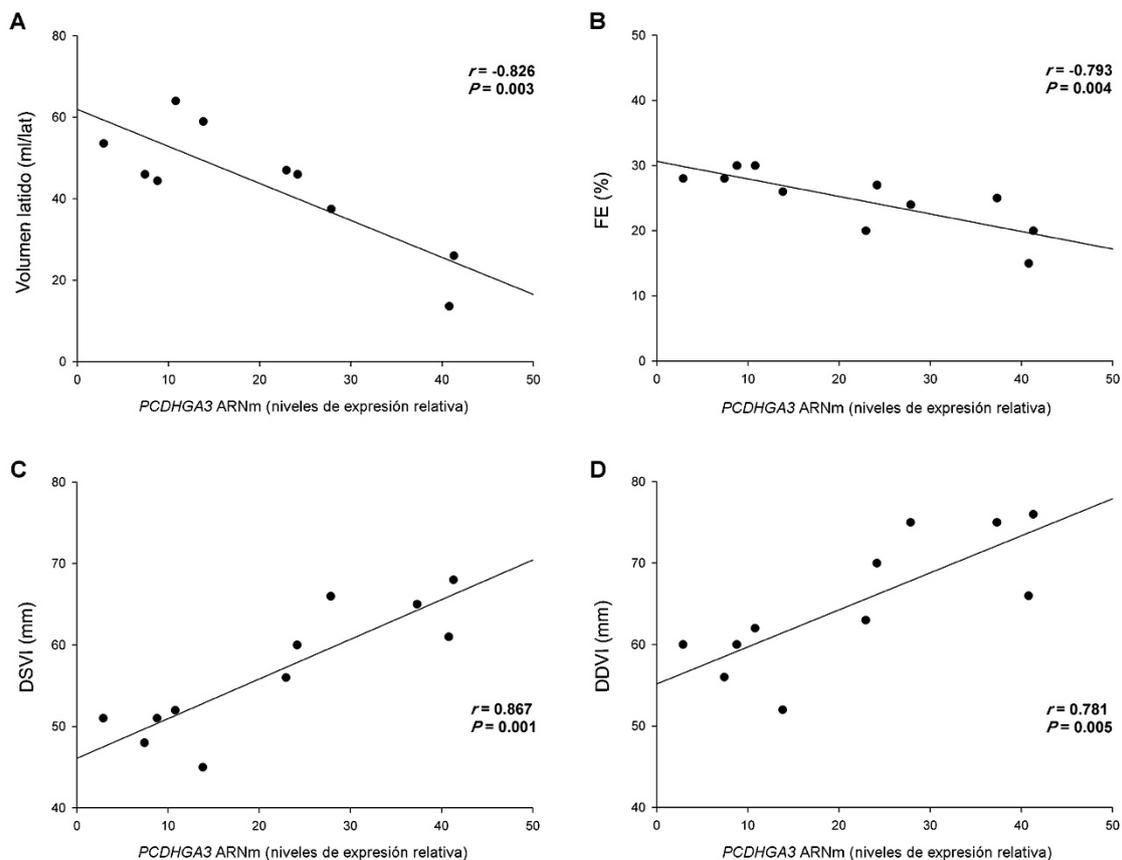


Figura 32. Relación entre los niveles de *PCDHGA3* y la función ventricular.

FA, fracción de acortamiento; FE, fracción de eyección; MCI, miocardiopatía isquémica;



En cuanto a las relaciones de las moléculas de adhesión entre sí, se identificaron 30 cuyos niveles de expresión estaban relacionados con otras moléculas de adhesión. El gen *DSP* que expresa la desmoplaquina, y el gen *GJA3* que expresa la conexina 46, fueron los que mostraron mayor número de correlaciones entre los pacientes isquémicos (13 y 7 correlaciones con otras moléculas de adhesión, respectivamente). En el anexo II se muestran todas las relaciones encontradas entre los diferentes grupos de moléculas de adhesión.

1.1.3. Análisis proteico de la protocadherina- γ A3 en los pacientes con miocardiopatía isquémica

Debido a las relaciones encontradas entre los niveles de *PCDHGA3* y la función ventricular en los pacientes con MCI, se propuso confirmar si las alteraciones transcriptómicas encontradas en los pacientes se correspondían con alteraciones proteicas. Para ello se realizó un análisis por Western blot de esta proteína. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de esta proteína en los pacientes con MCI respecto a los CNT (Figura 33) (135 ± 16 vs 100 ± 28 UA, $p < 0.001$), en el mismo sentido que ocurría en el análisis de ARNm.

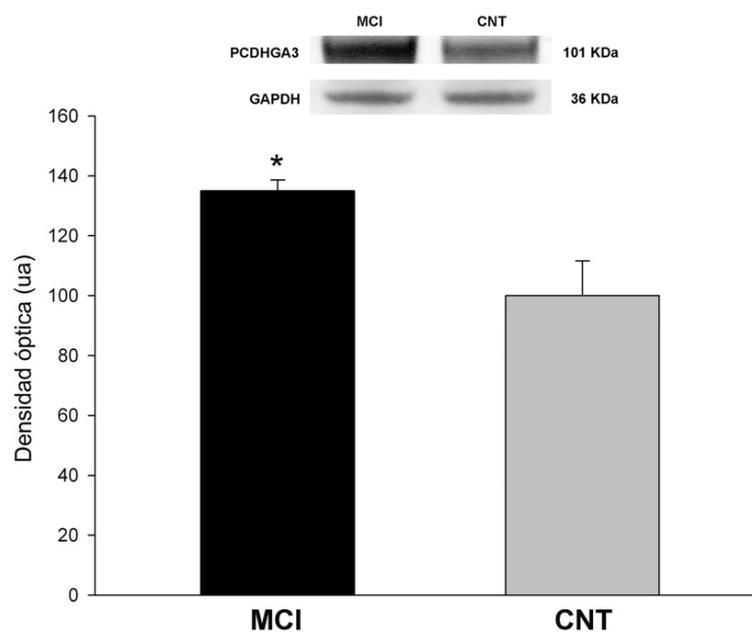


Figura 33. Expresión proteica de PCDHGA3 comparada en pacientes con MCI y CNT sanos.



1.2. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

Se realizó el análisis transcriptómico a gran escala mediante RNA-seq de las muestras de pacientes con MCD y de controles sanos, con el objetivo de determinar las diferencias entre grupos e identificar nuevos genes implicados en el desarrollo de la patología. Se encontraron 2398 genes diferencialmente expresados (≥ 1.3 -fold, $p < 0.05$) en las muestras de MCD respecto a los CNT, de los cuales 935 estaban sobreexpresados y 1463 habían reducido sus niveles de expresión.

En el estudio de genes implicados en las adhesiones celulares, fueron 29 genes los que resultaron diferencialmente expresados (≥ 1.3 -fold, $p < 0.05$) respecto a los pacientes sanos, con 12 genes cuya expresión estaba aumentada y disminuida en otros 17 (Figura 34). Del total de genes de adhesión que se mostraron alterados, el 41% eran componentes del DIC cardiaco.

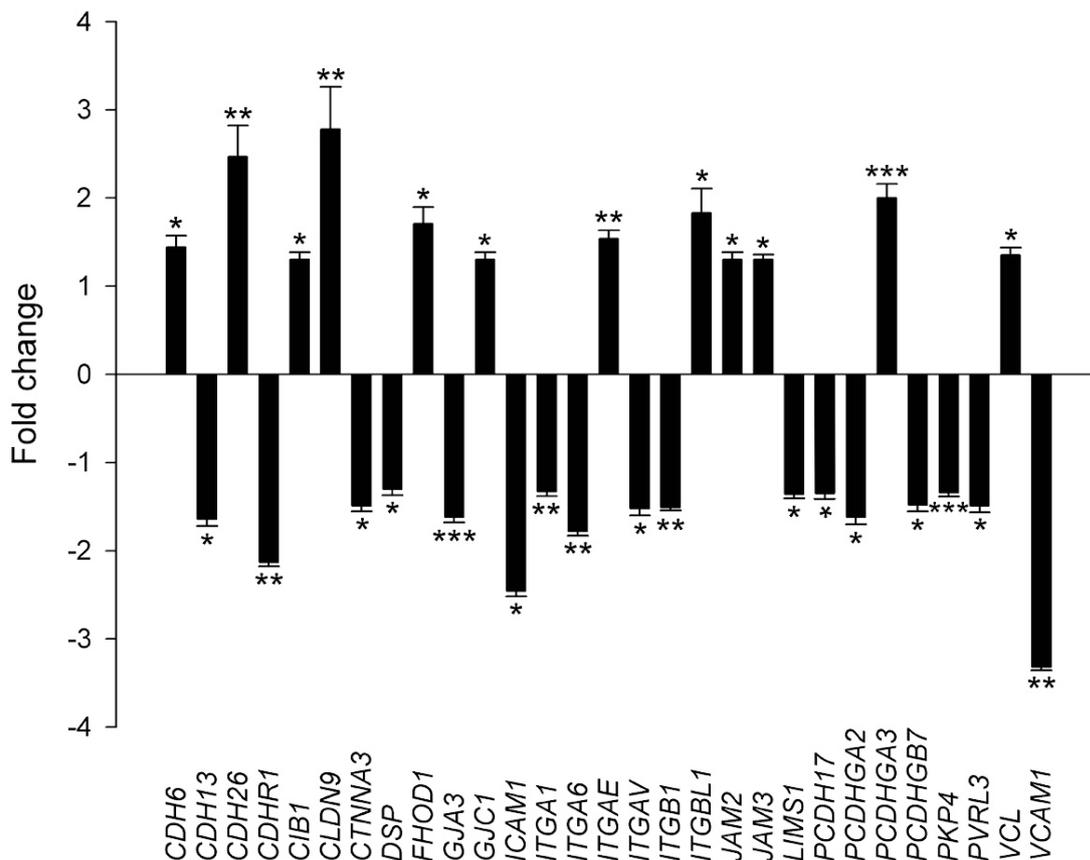


Figura 34. Expresión génica diferencial en la MCD en relación a las adhesiones celulares.

Los valores del grupo CNT se han referido a 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.



Tabla 12. Lista de genes significativamente alterados en la miocardiopatía dilatada.

Gen	Descripción	Uniones	Fold C.	P-valor
<i>CDH6</i>	Cadherina 6, cadherina K	Adherentes	1.44	0.032
<i>CDH13</i>	Cadherina 13, cadherina H	Adherentes	-1.64	0.011
<i>CDH26</i>	Proteína <i>cadherin-like</i> 26	Adherentes	2.47	0.002
<i>CDHR1</i>	Molécula <i>cadherin-related</i> 1	Adherentes	-2.13	0.004
<i>CIB1</i>	Proteína de unión a Ca ²⁺ e ITG1	Adh. focales	1.30	0.018
<i>CLDN9</i>	Claudina 9	Estrechadas	2.82	0.008
<i>CTNNA3</i>	Catenina α 3	Adherentes	-1.49	0.021
<i>CTNND2</i>	Catenina δ 2	Adherentes	-1.52	0.024
<i>DSP</i>	Desmoplaquina	Desmosoma	-1.30	0.028
<i>FHOD1</i>	<i>Formin homology 2 domain containing</i> 1	Inmunológica	1.71	0.12
<i>GJA3</i>	Proteína GAP α 3, conexina 46	GAP	-1.62	5.4 x 10 ⁻⁴
<i>GJC1</i>	Proteína GAP γ 1, conexina 45	GAP	1.30	0.027
<i>ICAM1</i>	Molécula de adhesión intercelular 1	Inmunológica	-2.46	0.036
<i>ITGA1</i>	Integrina α 1	Adh. focales	-1.33	0.009
<i>ITGA6</i>	Integrina α 6	Adh. focales	-1.78	0.004
<i>ITGAE</i>	Integrina α E	Adh. focales	1.54	0.003
<i>ITGAV</i>	Integrina α V	Adh. focales	-1.52	0.012
<i>ITGB1</i>	Integrina β 1	Adh. focales	-1.51	0.007
<i>ITGBL1</i>	Proteína <i>integrin beta-like</i> 1	Adh. focales	1.83	0.023
<i>JAM2</i>	<i>Junctional adhesion molecule</i> B	Inmunológica	1.30	0.034
<i>JAM3</i>	<i>Junctional adhesion molecule</i> C	Inmunológica	1.30	0.018
<i>LIMS1</i>	Prot. LIM de céls senesc. dom. Ag1	Adh. focales	-1.36	0.014
<i>PCDH17</i>	Protocadherina 17	Adherentes	-1.35	0.036
<i>PCDHGA2</i>	Protocadherina γ subtipo A2	Adherentes	-1.62	0.014
<i>PCDHGA3</i>	Protocadherina γ subtipo A3	Adherentes	2.00	2.8 x 10 ⁻⁴
<i>PCDHGB7</i>	Protocadherina γ subtipo B7	Adherentes	-1.48	0.020
<i>PKP4</i>	Placofilina 4	Desmosoma	-1.34	4.7 x 10 ⁻⁴
<i>PVRL3</i>	Nectina 3	Adherentes	-1.49	0.025
<i>VCAM1</i>	Molécula de adhesión vascular 1	Inmunológica	-3.32	0.006
<i>VCL</i>	Vinculina	Adherentes	1.35	0.031

La Tabla 12 representa las descripciones de los genes relacionados en la cardiopatía dilatada con las adhesiones celulares que mostraron sus resultados (ARNm) alterados, indicando a qué tipo de uniones pertenecen, así como su valor *Fold change* y P valor. Como se observa en la Tabla 12, las modificaciones mayoritarias se encuentran entre las uniones adherentes (38%), como ocurría en la MCI, y en las adhesiones focales (28%).



Se elaboró un Heat map y un Hierarchical clustering para visualizar las diferencias transcriptómicas. Se evidenciaron claramente los dos grupos, MCD y CNT, en perfiles de expresión completamente diferentes (Figura 35).

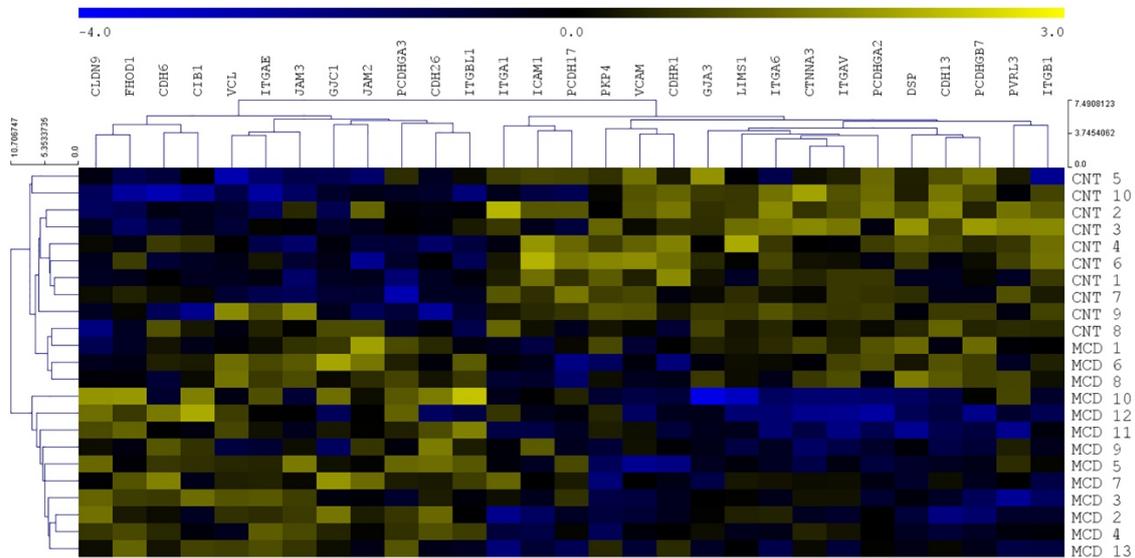


Figura 35. Heat map con Hierarchical clustering en el que se representan los dos perfiles génicos de pacientes con MCD comparados con CNT. Se encontraron 29 genes diferencialmente expresados entre ambos grupos. La barra de colores representa el nivel de expresión relativa de cada gen, azul indica menor expresión y amarillo mayor expresión. CNT, control; MCD, miocardiopatía dilatada.



1.2.1. Análisis de enriquecimiento funcional de las categorías presentes en los genes alterados en la MCD.

A continuación se realizó el análisis de los genes alterados en la MCD para determinar las categorías de ontología génica (términos GO) mediante la herramienta *ToppGene*. Se analizaron los términos GO en la categoría de Función Molecular para determinar en qué funciones biológicas participan o se implican los genes del estudio. Los resultados mostraron que las adhesiones celulares representaban el 15% del total de categorías, siendo la tercera más predominante (Figura 36).

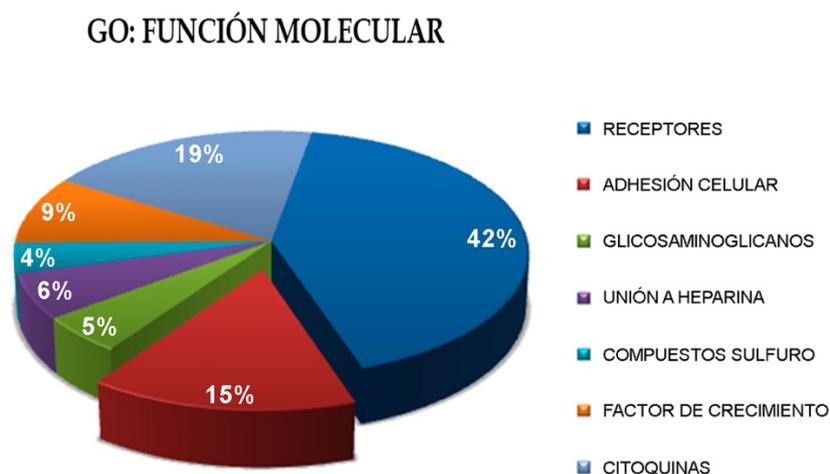


Figura 36. Análisis mediante *ToppGene* de las categorías funcionales encontradas en los genes alterados del estudio en MCD. Los términos GO se obtuvieron en base a la función molecular y se utilizó la corrección de Bonferroni.

1.2.2. Estudio de la relación de los niveles de expresión génica de las moléculas de adhesión celular con la función ventricular en la MCD.

También se analizaron las posibles relaciones existentes entre los niveles de expresión de los genes de adhesión celular alterados y los parámetros de función del VI de los pacientes con MCD. Se disponía de los datos ecocardiográficos de todos los pacientes.

Los resultados mostraron 3 genes cuyos niveles de expresión en los pacientes estaban relacionados con la función ventricular. La expresión de *GJA3*, gen que codifica la conexina 46, estaba directamente relacionada con la FE ($r=0.741$, $p=0.004$) y con los diámetros DSVI y DDVI ($r=-0.746$, $p=0.003$; $r=-0.712$, $p=0.006$,



respectivamente) (Figura 37). También se encontraron relaciones entre la expresión del gen desmosomal *DSP* con la FE ($r=0.674$, $p=0.011$) y con los mismos diámetros ventriculares ($r=-0.753$, $p=0.003$ para el DSVI y $r=-0.801$, $p=0.001$ para el DDVI) (Figura 38). Finalmente, los niveles de *CTNNA3*, de la familia de las cateninas, presentaron relación directa con la FE ($r=0.565$, $p=0.044$) y con las dimensiones ventriculares DSVI y DDVI ($r=-0.605$, $p=0.028$ y $r=-0.616$, $p=0.025$) (Figura 39).

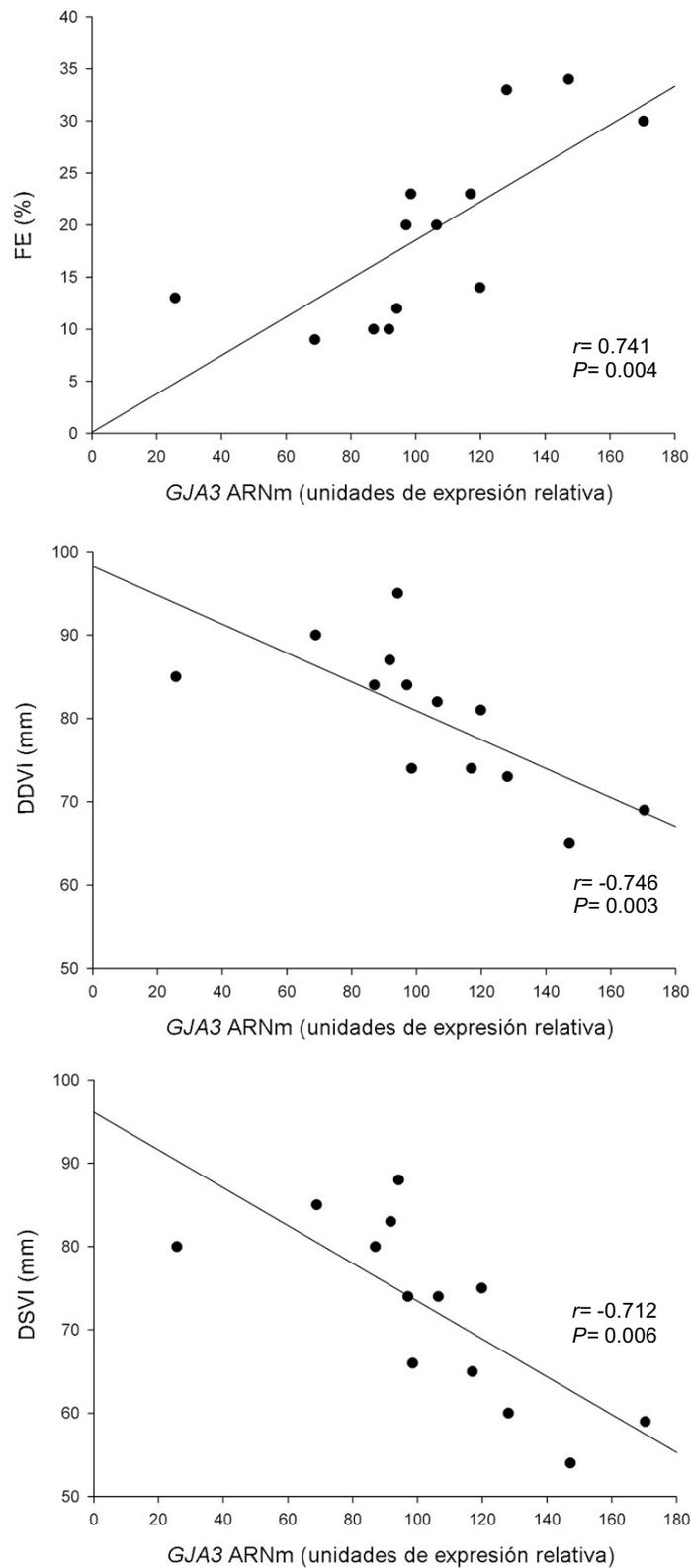


Figura 37. Relaciones de la expresión génica de GJA3 con los parámetros de función ventricular. FE: fracción de eyección; DSVI: diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DDVI: diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo.

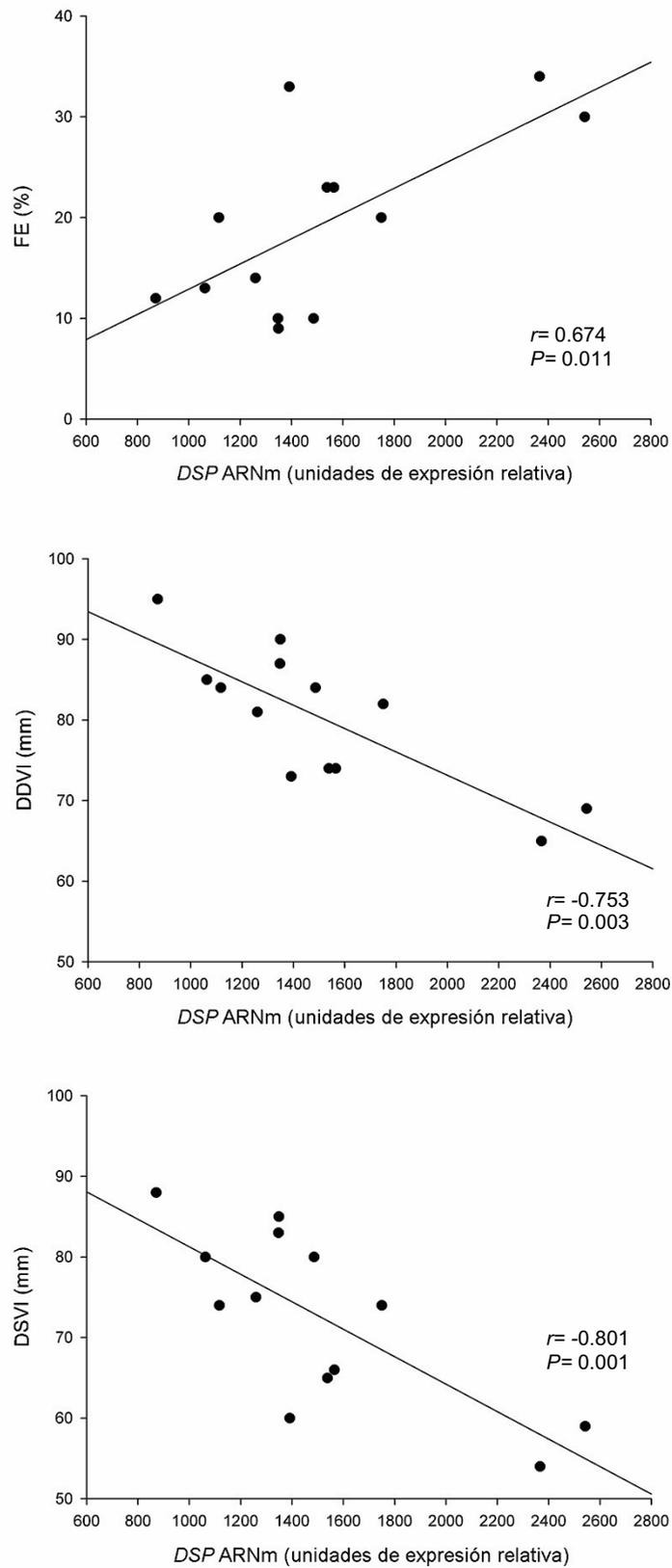


Figura 38. Relaciones de la expresión génica de DSP con la función ventricular. FE: fracción de eyección; DSVI: diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DDVI: diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo.

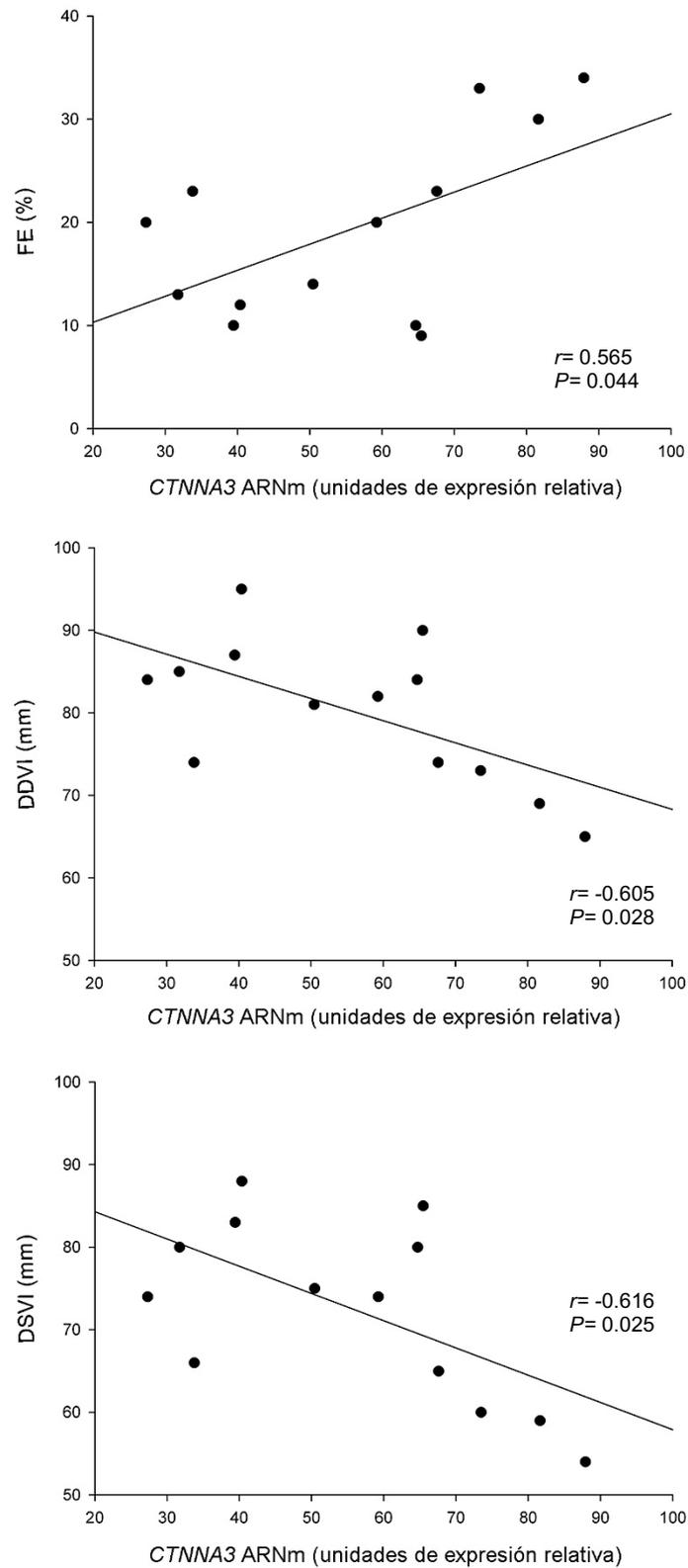


Figura 39. Relaciones de la expresión génica de CTNNA3 con la función ventricular. FE: fracción de eyección; DSVI: diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DDVI: diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo.



Analizamos a continuación las relaciones entre los niveles de expresión alterados de los diferentes genes de adhesiones dentro del grupo de MCD: *GJA3* estaba directamente relacionado con *DSP* ($r=0.739$, $p=0.004$) y con *CTNNA3* ($r=0.667$, $p=0.013$). Al mismo tiempo, *DSP* también se relacionó directamente con la expresión de *CTNNA3* ($r=0.753$, $p=0.003$); estas relaciones están representadas en la Figura 40.

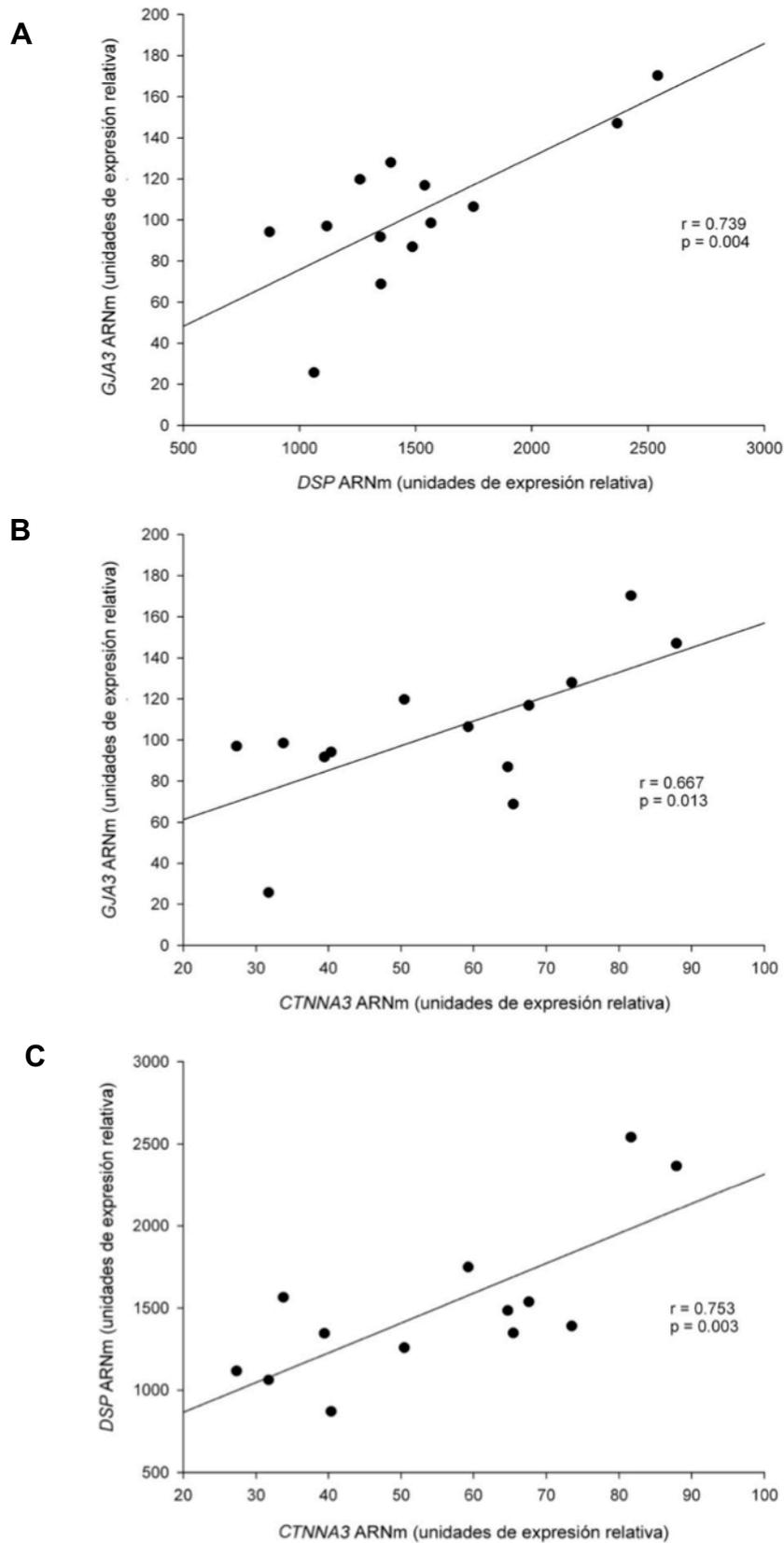


Figura 40. Relaciones entre los genes de adhesión del DIC entre sí en los pacientes con MCD. A. Correlación entre GJA3 y DSP. B. Correlación entre GJA3 y CTNNA3. C. Correlación entre DSP y CTNNA3.



2. ESTUDIO DE LA ZONAS DE ADHESIÓN ENTRE CARDIOMIOCITOS Y CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MIOCARDICA EN PACIENTES SANOS Y CON INSUFICIENCIA CARDIACA.

Se analizaron las diferencias estructurales en las zonas de adhesión entre cardiomiocitos (n=3) sanos y de pacientes con insuficiencia cardiaca (n=3) mediante microscopía electrónica de transmisión. Se analizaron 10 imágenes de microscopía electrónica por paciente e individuo control. En el caso de los tejidos analizados de corazones con MCD, se observaron diferencias respecto a la estructura del grupo CNT. En primer lugar, el disco aparece desorganizado y su estructura está alterada al comparar con los corazones sanos. Se identificaron también alteraciones en los desmosomas, que presentaban un aspecto más pálido y menos denso y que mostraban una interrupción de las placas internas. El espacio intercelular también estaba aumentado en el miocardio de los corazones con MCD. Finalmente, se midió el índice de convolución del disco intercalar y se observó una disminución significativa en las convoluciones de éste respecto a los CNT ($1,74 \pm 0,22$ vs $4,20 \pm 0,97$; $p < 0,001$). En el caso de los análisis de los tejidos procedentes de pacientes con MCI no se observaron diferencias significativas en los parámetros estructurales. Las imágenes analizadas se representan en la Figura 41.

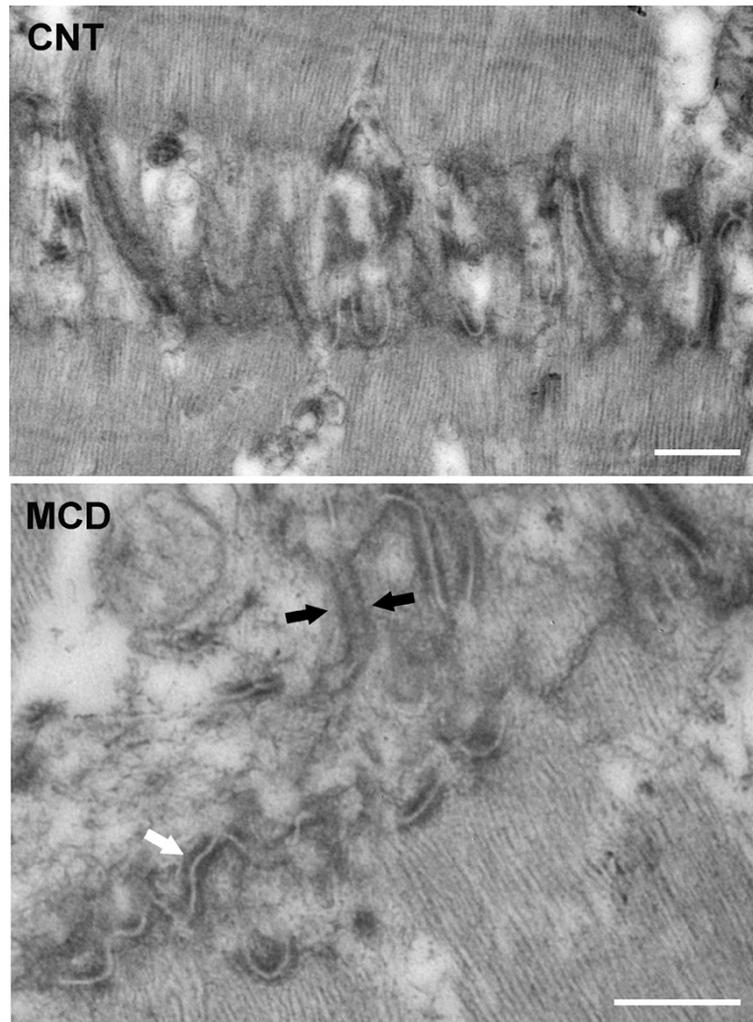


Figura 41. Ultraestructura miocárdica de los pacientes con MCD mediante microscopía electrónica de transmisión comparando con CNT. La menor densidad de las placas internas desmosomales (flecha blanca) y el aumento del espacio intercelular (flechas negras) fue evidente en el miocardio con MCD. Barra escala: 500 nm.



3. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDIACA CRÓNICA.

Se utilizaron 39 ratas OFA macho para el estudio. La inducción de la IC crónica se realizó según la técnica quirúrgica descrita en el apartado de Material y Métodos. Se produjo una moderada mortalidad temprana del 30% asociada a las complicaciones de la cirugía como fibrilaciones y hemorragias; también durante el período de recuperación debido a la variabilidad individual en la respuesta al tamaño del infarto. Para evaluar el área infartada y comprobar la isquemia se tiñeron los corazones post-infarto (Figura 42). Se realizó un control de la función cardiaca mediante el protocolo de ecocardiografía descrito y el resultado mostró que un 56% de las ratas que sobrevivieron a la ligadura coronaria permanente presentaron una FE<25%, considerándose por lo tanto en condiciones de IC. El resto de animales conservó el tamaño ventricular dentro de los parámetros normales (DDVI $5,58 \pm 0,8$ mm) y por lo tanto no fueron considerados en IC.



Figura 42. Secciones de un corazón de rata postinfarto teñido con TTZ. La flecha indica el lugar de la ligadura, observándose un halo de tejido más pálido alrededor de la zona de isquemia.

En el análisis ecocardiográfico de los animales afectados (Figura 43) se compararon las imágenes en 2D y los resultados mostraron alteraciones en la dinámica del septo y en la contracción ventricular en el 100% de los animales con una reducción de la FE. El tamaño de las cavidades cardiacas se evaluó realizando las mediciones en modo M según el protocolo descrito y se observó una variabilidad entre individuos, ya que algunos presentaron una evidente dilatación ventricular, mientras que otros no aparecieron muy alterados, a pesar de tener un empeoramiento en la funcionalidad cardiaca.

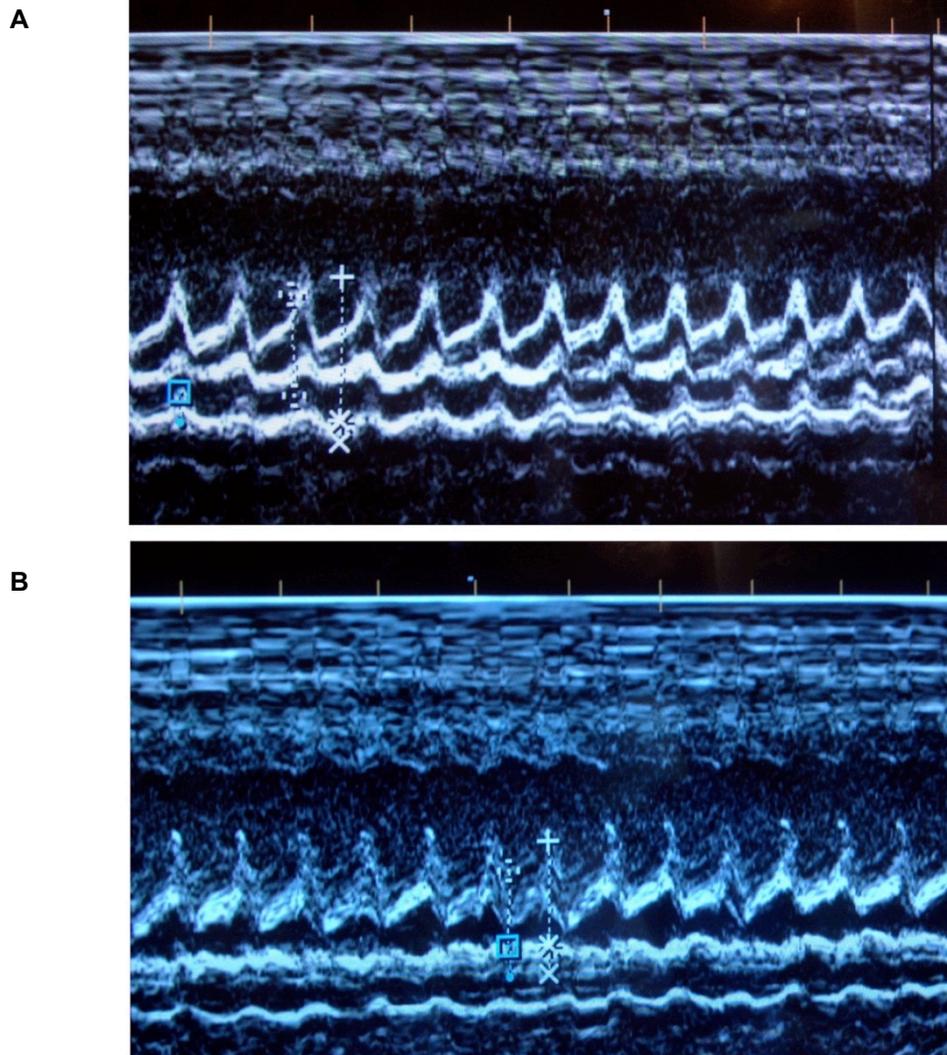


Figura 43. Ecocardiografía de rata 1 mes post-ligadura coronaria en modo M. Se puede apreciar la disquinesia de la pared posterior y el aumento de tamaño del VI (B) que es evidente comparado con un corazón sano (A). + DIVId, diámetro interior del VI en diástole; x PPVI, pared posterior del VI en diástole.

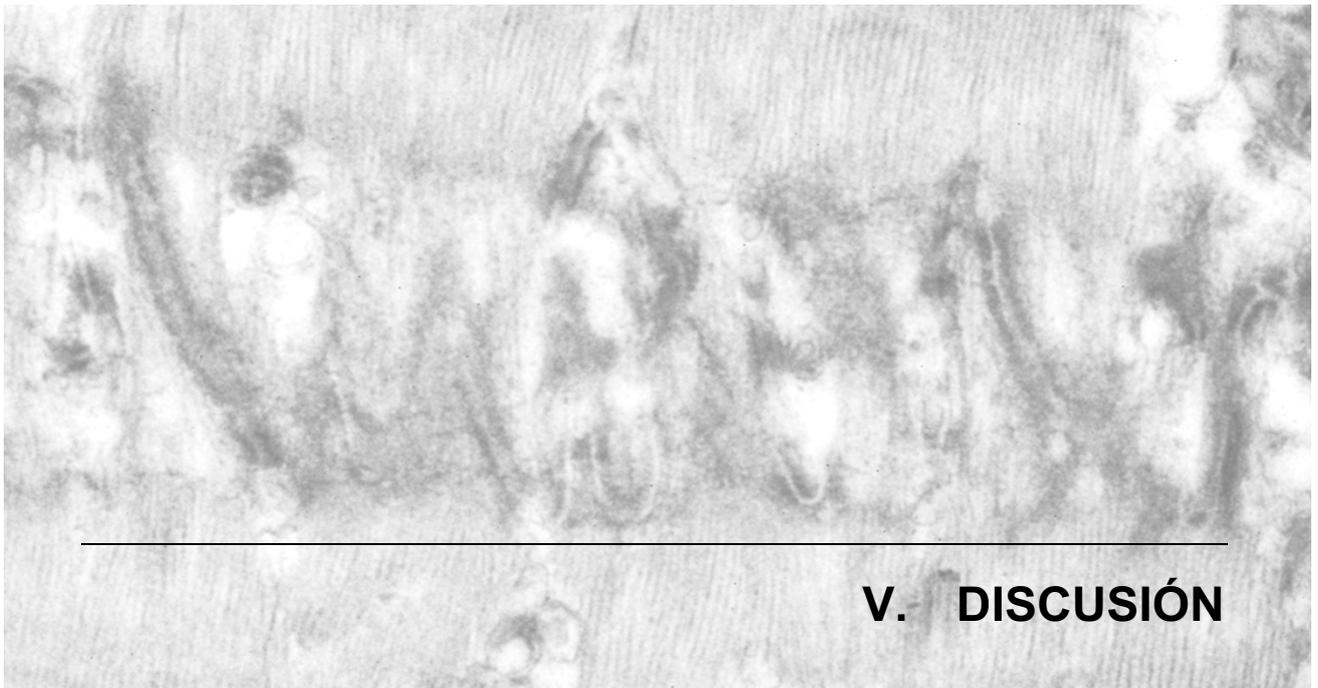
Para el grupo control se utilizaron 4 ratas OFA macho a las que se les realizó el mismo procedimiento farmacológico y quirúrgico que al resto, a excepción de la ligadura (SHAM). Los resultados mostraron que tras la cirugía, las medidas cardíacas habían variado produciéndose una disminución de la FA (valores normales considerados en torno al 45%, según (Gu et al. 2012) y un aumento de las cámaras cardíacas (Figura 42). Al mes del infarto crónico, se midió la FA que fue de $16.8 \pm 2.8\%$, y los diámetros ventriculares que fueron de 5.10 ± 0.79 mm (DSVI) y 6.17 ± 0.95 mm (DDVI). Estas medidas se mantuvieron hasta el sacrificio a los 5 meses post-infarto. Las ratas SHAM tenían una función cardíaca normal, con una FA de $31.3 \pm 8.6\%$ y



diámetros menores que las infartadas, de 2.57 ± 0.60 mm y 3.73 ± 0.63 mm (DSVI y DDVI respectivamente). En la Tabla 13 se muestran los parámetros analizados en todos los grupos de animales, obtenidos del estudio ecocardiográfico continuado y de las observaciones macroscópicas de los corazones post-mortem.

Tabla 13. Ejemplo de comparación de los parámetros analizados entre las ratas con IC (n=16) y las SHAM (n=4).

RATA	PESO PREVIO	PESO 5m POST-IM	FA PREVIA	FA 5m POST-IM	MORFOLOGÍA CARDIACA POST-EUTANASIA
<i>IAM1</i>	422 g	540 g	Normal	18%	Fibrosis, zonas pálidas
<i>IAM2</i>	373 g	511 g	Normal	19%	Zona infartada amplia
<i>IAM3</i>	350 g	502 g	Normal	17%	Paredes engrosadas, zonas de adherencias pericárdicas
<i>IAM4</i>	323 g	462 g	Normal	18%	Fibrosis, múltiples adherencias pericárdicas
<i>SHAM1</i>	288 g	402 g	Normal	Normal	Adherencias pericárdicas
<i>SHAM2</i>	346 g	439 g	Normal	Normal	Adherencias pericárdicas
<i>SHAM3</i>	328 g	449 g	Normal	Normal	Adherencias pericárdicas
<i>SHAM4</i>	297 g	406 g	Normal	Normal	Adherencias pericárdicas



V. DISCUSIÓN



1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE ARN

La insuficiencia cardiaca (IC) está caracterizada por una marcada activación fisiológica de distintos sistemas que conllevan una serie de cambios celulares para responder a las condiciones de la patología. Como resultado de los estudios previos realizados en muestras de pacientes con IC, en los cuales se observaron diversas alteraciones en el citoesqueleto (Herrer et al. 2014), canales iónicos (Ortega et al. 2015) matriz extracelular (Gil-Cayueta et al. 2015) y mitocondria (Roselló-Lletí et al. 2014), planteamos la hipótesis de que las adhesiones celulares deberían sufrir alteraciones en el miocardio de estos pacientes.

En este estudio, demostramos mediante RNA-seq las alteraciones en el perfil transcriptómico de los pacientes con IC de origen isquémico y dilatado. Esta técnica nos permitió encontrar diferencias más precisas en comparación a otras técnicas menos exactas (Mooney et al. 2013). Tras la clasificación en categorías funcionales del total de genes alterados, la adhesión celular resultó ser la tercera categoría más predominante. Por lo tanto, nos centramos en el estudio de las moléculas de adhesión celular, debido a los antecedentes que relacionaban las alteraciones en estas moléculas con patologías cardíacas.

Los resultados del análisis mostraron 42 genes alterados en MCI y 29 en la MCD, con una expresión génica claramente diferencial respecto a los CNT. Además de las alteraciones en los niveles de expresión, en estos pacientes se observaron relaciones entre los parámetros de función ventricular y el volumen sistólico con algunos de estos genes, revelando su importancia y posible implicación en el mecanismo patológico de la IC.

Ambas patologías cardíacas han mostrado alteraciones en prácticamente los mismos genes, pero sí hemos observado ciertas diferencias. En nuestro estudio, se han descrito nuevos genes implicados en la MCI que no habían sido asociados previamente a esta condición. Esto es debido a la mayor sensibilidad de la técnica RNA-seq, como se ha indicado, que permite identificar y cuantificar niveles de expresión de genes que quizá en otros estudios no han podido ser encontrados.

Las moléculas de adhesión median la formación de uniones entre células y uniones con la matriz extracelular (ECM), participando tanto en los procesos de organización tisular como en rutas de señalización (Aplin et al. 1998). En este estudio



se han descrito alteraciones en todos los tipos de uniones celulares que existen, desde moléculas del disco intercalar (DIC) a moléculas de adhesiones específicas. Las funciones del DIC incluyen el acoplamiento entre cardiomiocitos, para soportar el estrés mecánico del tejido y por otra parte permitir las conexiones celulares necesarias para otros procesos fisiológicos como la contracción miocárdica (Aregullo-Pascual et al. 2014). Los cambios producidos en la estructura del miocardio, así como los cambios en la ultraestructura del DIC y el resto de uniones, podrían tener un papel importante en el desarrollo de la IC y la progresión de su fisiopatología (Kucera et al. 2002).

Varios genes representativos de los desmosomas estaban alterados en los pacientes con IC de ambos grupos. Algunos destacados son *DSP*, *JUP*, *PKP2/4* y *DSC*, que expresan las proteínas de adhesión desmoplaquina, placoglobina, placofilina y desmocolina. Son importantes integrantes en la estructura del DIC, y son imprescindibles para el correcto funcionamiento del miocardio (Basso et al., 2006). La expresión de todos estos genes estaba notablemente disminuida respecto a los CNT en ambos grupos de pacientes con IC. Los resultados obtenidos en este estudio están en concordancia con los de estudios previos en los que se ha demostrado una disminución en la estructura del DIC y pérdida de funcionalidad en pacientes con IC, como ocurre en el caso de la cardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MCAVD) (Elliott et al. 2010; Bhonsale et al. 2015; Noorman et al. 2013; Alcalde et al. 2014; Lorenzon et al. 2015). Se han descrito previamente mutaciones en *DSP* y *PKP2* en este síndrome, así como en otras miocardiopatías arrítmicas (MCA) (Norgett et al. 2000; Bauce et al. 2005), pero en este estudio hemos demostrado las alteraciones de la expresión de éstos genes desmosomales en la miocardiopatía de origen isquémico, así como la adición de nuevos genes como *PKP4* que no habían sido asociados previamente con la IC.

La desmoplaquina es la molécula de adhesión más abundante en la estructura desmosomal (Zhang et al., 2015), y sus niveles de ARNm en los pacientes con IC estaban directamente relacionados con la fracción de eyección (FE) y con los diámetros ventriculares de forma significativa. Además de las relaciones con los parámetros funcionales, se encontraron hasta 13 genes diferentes que estaban relacionados con *DSP*, siendo el gen con mayor número de relaciones. Entre ellas destacaron las relaciones con *PKP2* y las integrinas *ITGA6* y *ITGAV*, genes con los que mostró un elevado índice de correlación. Estos hechos, junto con los resultados obtenidos en modelos animales, donde la ausencia de *DSP* produce defectos fatales



en el miocardio y pérdida de función ventricular (Yang et al. 2006), sugieren que la expresión reducida de *DSP* que hemos comprobado en los pacientes con IC de nuestro estudio, va a acompañar al empeoramiento de este síndrome.

Además de las alteraciones observadas en los componentes ya mencionados del DIC, los desmosomas, también encontramos cambios en la expresión de algunos componentes de las uniones tipo GAP. Estas uniones son muy importantes para mantener el acoplamiento eléctrico y metabólico entre cardiomiocitos y permiten un correcto bombeo cardiaco (Kanno et al. 2001). En el análisis transcriptómico de los pacientes con IC, encontramos alteraciones en dos genes que expresan conexinas, *GJC1* (conexina 45) y *GJA3* (conexina 46). Otras conexinas como la conexina 43 (*GJA1*), que es la más abundante en el músculo cardiaco, han sido relacionadas anteriormente con la IC (Wang y Gerdes 1999; Severs et al. 2004; Poelzing y Rosenbaum 2004; Hesketh et al. 2010; Bruce et al. 2008) y se ha determinado su expresión en tejido cardiaco en diversos estudios (Dupont et al. 2001; Soltysinska et al. 2009). En nuestro estudio, esta conexina no mostró cambios en los pacientes con MCD ni en la MCI a nivel transcriptómico, pero es posible que estas alteraciones que se han descrito en estudios anteriores se produzcan en las modificaciones post-traduccionales (D'hondt et al. 2013).

Por otra parte, debido a la sensibilidad de RNA-seq se han podido identificar otras conexinas menos estudiadas que sí aparecieron alteradas en nuestros pacientes. *GJA3* ha sido estudiado previamente en modelos animales, donde se le implica en las alteraciones de la conducción (Chi et al. 2010), pero no se han realizado estudios de este gen y ni de su expresión en pacientes con IC. En el caso de *GJC1*, no había sido descrito como un gen alterado en la MCI, siendo nuestro trabajo el primero que relaciona este gen con la patología de este síndrome. *GJA3* apareció infraexpresada mientras que *GJC1* estaba sobreexpresada en los dos grupos de pacientes, de acuerdo con los estudios a nivel proteico anteriores (Yamada et al. 2003). En cambio, solo en la MCD aparecieron relaciones entre *GJA3* y la función ventricular de los pacientes, además de ser el segundo gen de todos los analizados que más relaciones presentó con otros genes del estudio. La relación de *GJA3* con cadherinas desmosomales mostrada en este estudio apoya los hallazgos previos que sugieren una unión entre ambas familias, necesaria para la correcta organización del DIC (Lyon et al. 2014). Estos datos corroboran los resultados previos de una remodelación de las uniones GAP en la IC (Pinali et al. 2015), e indican que existen papeles importantes



que la conexina 45 desarrolla en su fisiopatología, los cuales hasta ahora no habían sido evidenciados.

Las uniones adherentes están compuestas por las familias de cadherinas y cateninas, las cuales también forman parte de los DIC (Ferreira-Cornwell et al. 2002). En este estudio, las uniones adherentes representaron el tipo de unión más alterado (38% del total de genes alterados en la MCD), ya que el número de genes de cadherinas y cateninas con cambios en la expresión era superior al del resto de familias. Del total de moléculas participantes en las uniones adherentes que estaban diferencialmente expresadas, la subfamilia de protocadherinas fue la más representada en los pacientes con MCI y MCD. Las cadherinas constituyen una gran familia de proteínas de adhesión célula-célula dependiente de calcio, cuya expresión se considera particularmente importante en el miocardio (Vite y Radice 2014). En cambio, las protocadherinas han sido estudiadas principalmente en el sistema nervioso, donde establecen conexiones neuronales específicas y median en las adheiones intercelulares y la señalización (Shapiro y Colman 1999).

En nuestro estudio, la expresión de varias protocadherinas estaba alterada, mostrando bien sobreexpresión, bien infraexpresión de forma significativa en ambos grupos de pacientes. Además, un miembro de esta familia (*PCDHGA3*), mostró relaciones de forma inversa con los principales parámetros funcionales en los pacientes con MCI, de manera que el aumento de su expresión está relacionado con una reducción en el volumen sistólico (VS) y la disfunción ventricular. Esta sobreexpresión se confirmó a nivel proteico en las muestras de miocardio de nuestros pacientes con MCI. En estudios realizados en el sistema nervioso, se ha mostrado que esta protocadherina parece estar implicada en el ensamblaje de las membranas celulares y las conexiones entre éstas (Hanson et al. 2010), aunque poco se sabe de sus funciones en el resto de tejidos. La función específica de *PCDHGA3* en el miocardio no es conocida actualmente, puesto que existen muy pocos estudios que describan su papel en patologías (Miller et al. 2011; Hanson et al 2010). Por lo tanto, entre todos los genes alterados en los pacientes con MCI, *PCDHGA3* fue el único que mostró relaciones con la hemodinámica (VS) y la función ventricular (FE) en un alto nivel de significación. Estos parámetros reflejan las alteraciones producidas en el miocardio como el remodelado y los fallos en la contractilidad, ambos procesos desarrollados en la MCI, y que a nivel molecular incluyen diversas rutas celulares como la fibrosis y la apoptosis (Piek et al 2016). A pesar de que se requieren más estudios al respecto, nuestros resultados sugieren un papel importante de *PCDHGA3*



en el mantenimiento de las interacciones entre cardiomiocitos, necesarias para el acoplamiento durante la contracción ventricular y que se encuentran alteradas en la IC.

La expresión alterada de otros genes de la subfamilia, como *PCDH1*, también podría asociarse a la progresión de la IC. Esta molécula ha sido implicada en la regulación de TGF- β en células epiteliales, un factor de crecimiento que participa en diversas rutas celulares como la activación de la transcripción de genes de la matriz extracelular (MEC) o la apoptosis (Faura Tellez et al. 2015). Ambos procesos están activados y presentes en la fisiopatología de la MCI (Elliott et al. 2008) , y los resultados en nuestro estudio muestran que los niveles de expresión de *PCDH1* están reducidos respecto a los CNT en ambos grupos. Existen estudios que relacionan a las cadherinas con el remodelado y organización de la MEC que se producen en la progresión de la fibrosis cardiaca (dos Santos et al. 2016; Bowen et al. 2015).

Teniendo en cuenta, por tanto, las diversas funciones celulares de la superfamilia de las cadherinas, nuestros resultados sugieren un vínculo entre la sobreexpresión de *PCDHGA3* y la disfunción ventricular. En este sentido, es posible que, en respuesta a los cambios producidos en la contractibilidad y elasticidad del miocardio patológico, se desarrolle un mecanismo de compensación para aumentar las adhesiones celulares. En el caso de los pacientes con MCI, se evidenció esta conexión mediante las relaciones que presentó *PCDHGA3* con los parámetros funcionales cardiacos. Por otra parte, la reducción en la expresión de *PCDH1* podría relacionarse con la fibrosis y remodelado que se produce en los pacientes con IC, regulada por TGF β - y que a su vez estaría regulada por la expresión de esta protocadherina. En resumen, nuestros resultados proponen nuevos roles para las protocadherinas e inician las bases para continuar el estudio de estas moléculas a nivel cardiaco.

Los componentes del desmosoma y las cadherinas interaccionan mediante las cateninas con elementos clave del citoesqueleto, como la actina. En estudios anteriores, se ha descrito la unión entre cateninas y desmosomas en el corazón (Goossens et al. 2007), y por otra parte, se han identificado cambios en el citoesqueleto en pacientes con IC (Soltysinska et al 2009). Por lo tanto, nos planteamos la posibilidad de que la disfunción ventricular de estos pacientes fuera debida tanto a cambios en moléculas de adhesión desmosomales como a las que se anclan al citoesqueleto. La expresión génica de las cateninas, mediadoras de la



adhesión célula-célula por uniones al citoesqueleto, estaba relacionada con las cadherinas en las muestras de nuestro estudio, confirmando las relaciones moleculares que las unen. Los niveles de ARNm de las cateninas alteradas que hemos analizado en nuestro estudio estaban disminuidos en ambos grupos de pacientes. Además, *CTNNA3*, gen que expresa la α T-catenina, mostró relaciones con la FE y los diámetros del VI en los pacientes con MCD, confirmando los resultados obtenidos en modelos animales, donde la pérdida de función de este gen conlleva un desarrollo de MCD temprana (Li et al. 2012).

Existen numerosos procesos reguladores de la transcripción y la traducción en las células, originando variaciones durante el conjunto de pasos que llevan a la expresión de un gen. Algunos de estos factores como el *splicing*, la degradación de ARN y las modificaciones post-traduccionales dificultan la tarea de relacionar directamente niveles de ARNm con niveles proteicos. En estudios proteómicos se han determinado diferentes modificaciones post-traduccionales en pacientes con IC de origen isquémico y no isquémico (Schechter et al. 2014). Por lo tanto, en el caso de las moléculas de adhesión, también deben existir otros mecanismos que regulen su expresión tanto en la MCI como la MCD.

Además de mostrar las relaciones existentes entre la expresión de cadherinas, cateninas, y proteínas desmosomales con la función ventricular de pacientes con IC, y evidenciar el elevado número de relaciones entre las distintas familias de moléculas de adhesión entre sí, hemos confirmado la comunicación y relación entre todas las adhesiones miocárdicas en un estado de IC crónica con muestras de trasplantes cardiacos. Se han evidenciado un elevado número de relaciones entre los distintos genes, destacando los genes desmosomales. Esto sugiere que, durante la progresión de la IC, los cambios en la expresión de unos genes de adhesiones celulares puedan afectar a los niveles de expresión de otros. Todos estos resultados sugieren fuertemente por tanto, la idea de un miocardio que actúa como una unidad de adhesión, donde todos los componentes (DIC, uniones célula-MEC, uniones dependientes de calcio...) se relacionan entre sí y se regulan mediante mecanismos implicados con los cambios ventriculares. Nuestro análisis establece por lo tanto las bases para futuros estudios enfocados en estos genes, incluyendo algunos nuevos genes cuya función en la IC todavía es desconocida.



2. ALTERACIONES EN LA ULTRAESTRUCTURA DEL MIOCARDIO Y EN LAS ZONAS DE ADHESIÓN EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

El análisis de la estructura del disco intercalar fue el siguiente paso en el estudio de las adhesiones celulares en la IC, y como se esperaba, la reducción en los niveles de las principales moléculas de adhesión que intervienen en este tipo de unión apareció asociada a una serie de importantes alteraciones estructurales. En estudios previos (Basso et al. 2006), se han identificado alteraciones en el DIC en pacientes con MCA como la MCAVD, y también se han estudiado en modelos animales de estas patologías arrítmicas (McCauley y Wehrens 2009). En las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de muestras de VI, observamos cambios en el DIC y la estructura de los desmosomas de pacientes con MCD, mientras que en el grupo de pacientes con MCI no se observaron estas alteraciones. El estudio ultraestructural del DIC mostró zonas de disolución, donde la unión intercelular pareció estar disminuida debido a la amplitud del espacio entre células. Se midió el índice de convolución del disco y los resultados también mostraron una reducción significativa de éste en las muestras del grupo de MCD. Los desmosomas aparecieron desorganizados, y las placas internas de estas uniones mostraron áreas de palidez, comparando con el grupo CNT. La importancia de estas observaciones radica en el origen de las muestras, provenientes de trasplantes de pacientes con IC, tanto de origen isquémico como dilatado, siendo un estudio hasta ahora no realizado en este tipo de muestras y cardiomiopatías.



3. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO ANIMAL DE INSUFICIENCIA CARDIACA CRÓNICA

En la investigación básica, se intentan reproducir los mecanismos de las patologías clínicas para evaluar nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento de los pacientes. A pesar del empleo de métodos alternativos *in vitro*, es necesario disponer de modelos animales para el estudio de ciertas enfermedades.

Aunque bien es cierta que la capacidad de los modelos animales para replicar la complejidad de las condiciones patológicas humanas es limitada, se han utilizado como herramientas útiles en la definición de los mecanismos patológicos de la IC. En el área cardiovascular existen diversos modelos animales, relacionados con miocardiopatías dilatada y arrítmica (Moncayo Arlandi y Javier 2016), infarto agudo de miocardio y reperfusión (Zaragoza et al. 2011), o modelos de isquemia permanente (Selye et al. 1960; Dewald et al. 2004). Estos últimos son modelos crónicos, ya que simulan una obstrucción coronaria por un proceso aterotrombótico mediante la oclusión permanente del vaso, y generan una serie de cambios miocárdicos que conducen a la IC. Durante el período posterior, se pueden analizar los cambios en el modelo, desde estructurales y funcionales a moleculares, pudiendo determinar un tratamiento que aplaque los mecanismos compensatorios y minimice o recupere las zonas dañadas. En el caso de nuestro estudio, se realizó la oclusión permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ACDAI), para producir en las ratas una IC crónica. De este modo, no es posible la recuperación espontánea de los animales, que tiene lugar en modelos de isquemia/reperfusión, debido a la gran capacidad regenerativa de los roedores.

La elección de la especie para llevar a cabo el infarto experimental es importante (Theroux et al. 1974; Schuleri et al. 2008), ya que existen diferencias entre mamíferos de gran tamaño y de pequeño tamaño. En este estudio se optó por mamífero inferior, debido a la facilidad de manejo de estos animales, al igual que los menores costes y dificultades de estabulación comparando con otros animales de mayor tamaño. Las ratas, ratones y cerdos, han sido ampliamente utilizados para el estudio de las patologías cardiovasculares, teniendo cada uno una serie de limitaciones. En los roedores, la destreza quirúrgica ha de ser mayor, debido a la dificultad de los procedimientos por el reducido tamaño del corazón, añadiendo además el error experimental debido a las imágenes ecocardiográficas que se obtienen, donde es muy complicado conseguir imágenes de gran calidad que permitan medir la función cardiaca tan claramente como en animales de mayor tamaño (Charuzi



et al. 1983; Buda et al. 1986). Por otro lado, los conejos se han utilizado en procedimientos quirúrgicos (Elsner y Riegger 1995), pero en esta especie existe una limitación de tipo fisiológico, ya que se trata de animales muy sensibles a los fármacos anestésicos y la recuperación posterior no es tan exitosa como en el resto de especies (Allweiler et al. 2010). En cuanto a los grandes animales, el cerdo ha sido el animal más utilizado por la facilidad para realizar los procedimientos (incluso sin toracotomía, con balón coronario mediante angiografía) y por su similitud con la anatomía y fisiología humana (Suzuki et al. 2011). Sin embargo, para un modelo de oclusión crónica es necesaria la apertura del tórax, con lo que conlleva esta cirugía en un animal tan grande y con los cambios producidos en el miocardio debido a la rotura pericárdica que podrían influir en el remodelado y en los procesos crónicos. El modelo porcino también cuenta con una elevada incidencia de fibrilaciones y taquicardias ventriculares, que suponen una tasa alta de mortalidad (Suzuki et al. 2011).

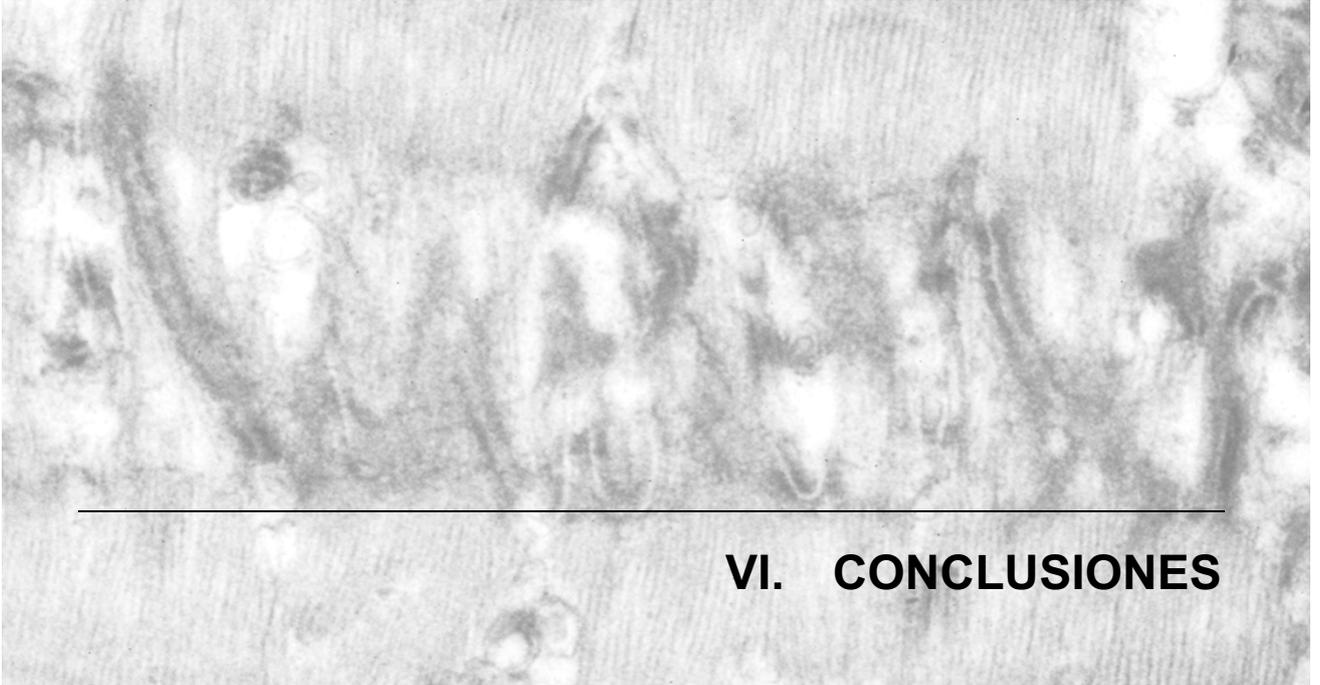
Tras realizar la técnica quirúrgica en las ratas, como se describe en los métodos, se evaluó la función cardíaca posterior a la ligadura permanente para compararla con la función basal previa al infarto. Los parámetros de la función ventricular están directamente relacionados con el remodelado cardíaco que ocurre tras el daño tisular en el miocardio (Chuang et al. 2000). Se observó una reducción en la FA cardíaca de un 35% en los animales sometidos al IAM, el cual es clínicamente relevante (Jensen et al. 2002), así como un aumento del tamaño ventricular y la existencia de zonas de disquinesia como consecuencia del infarto. El porcentaje de mortalidad no fue muy elevado al compararlo con el que suele ser habitual en estos procedimientos, entre el 27-50%, y la tasa de éxito post-infarto también se encontró en valores adecuados en nuestro estudio, ya que menos del 50% en otros estudios en ratas consiguen que se establezca la insuficiencia cardíaca (Olivares et al. 2012). Se observó una área infartada amplia tras la extracción de los corazones post-eutanasia, que en estudios anteriores se ha mostrado muy variable, oscilando desde un 4-59% en ratas (Ye et al. 1997). Los animales estuvieron estabulados durante 5 meses tras el procedimiento, siendo un tiempo considerablemente más largo que el utilizado habitualmente en modelos crónicos en rata (Zhao et al. 2013).

Nuestro modelo permite el estudio de los mecanismos de la IC a largo plazo, pudiendo evaluar más fácilmente el desarrollo de diferentes protocolos terapéuticos, por ejemplo la terapia génica, y los cambios en la estructura del tejido cardíaco o en la funcionalidad del órgano que originen. Una de las limitaciones de este estudio fue que debido a su elevado coste, no se pudieron realizar los tratamientos de silenciamiento



génico con vectores de los genes que se han visto alterados en las patologías cardíacas. Esperamos, no obstante, que en un futuro cercano este proyecto se pueda desarrollar. Con este modelo, por lo tanto, podríamos estudiar qué efectos tendrían las modificaciones en la expresión de moléculas de adhesión en la MCI y experimentalmente elaborar una opción terapéutica mediante el silenciamiento génico.

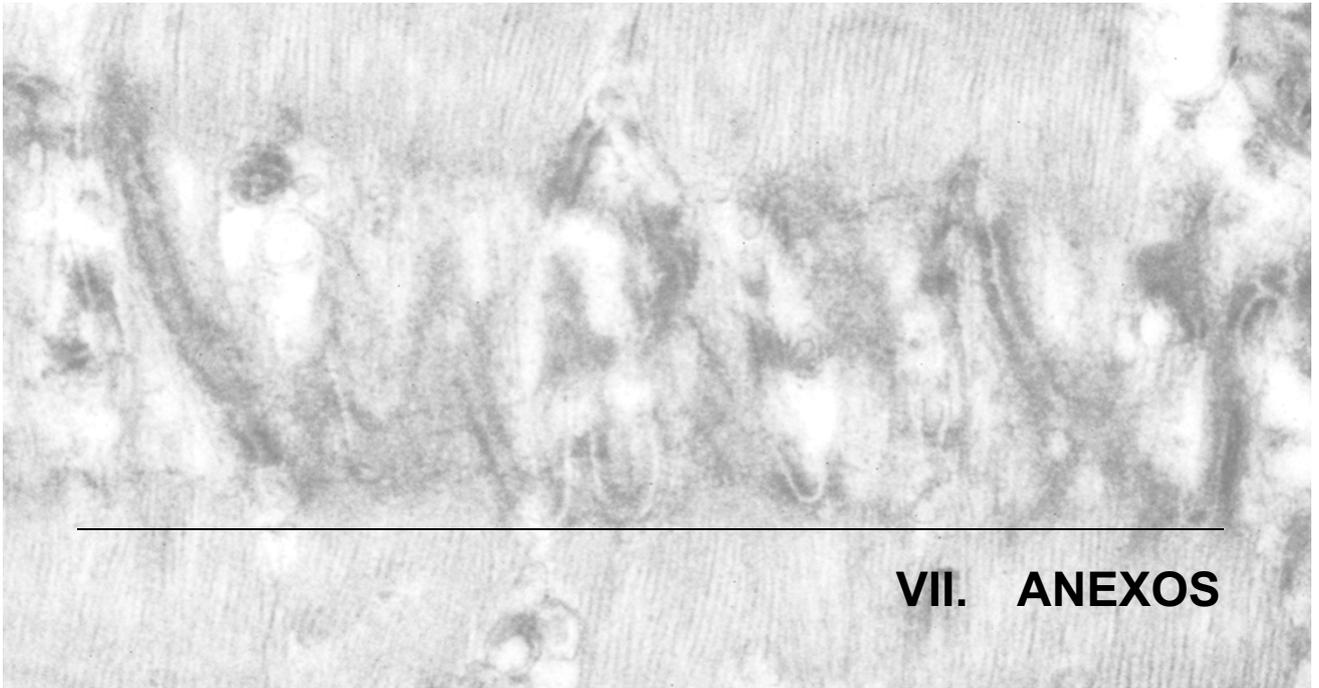
Aunque son necesarias más investigaciones, en este trabajo se han descrito moléculas potencialmente implicadas en el desarrollo de la patología de la IC. Las anomalías en la transcripción de las proteínas de adhesión desmosomales y cadherinas sugieren un efecto directo en la rotura de los discos intercalares y la dilatación del VI, mientras que las variaciones en las conexinas y sus relaciones representan los principales factores que pueden determinar los defectos eléctricos. Estos resultados en conjunto, nos ha permitido especular sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la IC y nos han llevado a realizar un modelo en el que confirmar estas hipótesis. Un análisis más intenso de estos mecanismos permitirá identificar la contribución de cada molécula de adhesión en las miocardiopatías dilatada e isquémica, así como nuevas estrategias terapéuticas.



VI. CONCLUSIONES



1. El transcriptoma de pacientes con insuficiencia cardiaca está alterado en un gran número de genes, entre los que destacan las familias de moléculas de adhesión, siendo la tercera categoría funcional más alterada.
2. En la miocardiopatía de origen isquémico, el aumento en los niveles de ARNm de *PCDGA3* se relacionan con la disfunción ventricular izquierda.
3. En la miocardiopatía dilatada, los niveles de ARNm de *CTNNA3*, *DSP* y *GJA3* están directamente relacionados con una mejor función ventricular.
4. La estructura del disco intercalar está interrumpida y las uniones entre cardiomiocitos están alteradas en pacientes con cardiomiopatía dilatada, mientras que estos cambios no se observan en la cardiomiopatía isquémica.
5. El establecimiento de un modelo animal de insuficiencia cardiaca permite el estudio crónico de los mecanismos y condiciones patológicas que se sufren en esta enfermedad y es una herramienta útil para el desarrollo de terapias génicas en estos pacientes.



VII. ANEXOS



Tabla 1. Relaciones entre los diferentes genes alterados de adhesiones celulares en pacientes con MCI y los parámetros hemodinámicos y de función ventricular.

Gen	Fracción Eyección	Fracción Acortamiento	DSVI	DDVI	Volumen latido
<i>CADM1</i>	$r = -0.534$ $P = 0.091$	$r = -0.553$ $P = 0.078$	$r = 0.517$ $P = 0.103$	$r = 0.460$ $P = 0.154$	$r = -0.340$ $P = 0.336$
<i>CDH6</i>	$r = -0.417$ $P = 0.202$	$r = -0.368$ $P = 0.266$	$r = -0.190$ $P = 0.575$	$r = -0.289$ $P = 0.388$	$r = -0.058$ $P = 0.874$
<i>CDH13</i>	$r = 0.283$ $P = 0.399$	$r = 0.368$ $P = 0.265$	$r = -0.171$ $P = 0.615$	$r = -0.096$ $P = 0.778$	$r = 0.526$ $P = 0.116$
<i>CDH26</i>	$r = -0.055$ $P = 0.876$	$r = -0.161$ $P = 0.637$	$r = -0.014$ $P = 0.967$	$r = -0.061$ $P = 0.859$	$r = -0.353$ $P = 0.318$
<i>CLDN9</i>	$r = -0.591$ $P = 0.072$	$r = -0.609$ $P = 0.062$	$r = 0.328$ $P = 0.354$	$r = 0.258$ $P = 0.473$	$r = -0.512$ $P = 0.159$
<i>CLDN12</i>	$r = 0.027$ $P = 0.936$	$r = 0.034$ $P = 0.922$	$r = 0.275$ $P = 0.414$	$r = 0.323$ $P = 0.332$	$r = 0.149$ $P = 0.681$
<i>CTNNA3</i>	$r = -0.028$ $P = 0.936$	$r = -0.057$ $P = 0.869$	$r = -0.092$ $P = 0.788$	$r = -0.118$ $P = 0.729$	$r = -0.195$ $P = 0.589$
<i>CTNND2</i>	$r = -0.515$ $P = 0.102$	$r = -0.412$ $P = 0.209$	$r = 0.181$ $P = 0.595$	$r = 0.088$ $P = 0.798$	$r = -0.316$ $P = 0.374$
<i>DSC2</i>	$r = -0.206$ $P = 0.544$	$r = -0.211$ $P = 0.533$	$r = 0.306$ $P = 0.360$	$r = 0.292$ $P = 0.383$	$r = -0.074$ $P = 0.838$
<i>DSP</i>	$r = 0.090$ $P = 0.792$	$r = 0.100$ $P = 0.769$	$r = -0.316$ $P = 0.344$	$r = -0.320$ $P = 0.337$	$r = -0.296$ $P = 0.407$
<i>FHOD1</i>	$r = 0.198$ $P = 0.559$	$r = 0.165$ $P = 0.629$	$r = 0.044$ $P = 0.899$	$r = 0.082$ $P = 0.811$	$r = -0.110$ $P = 0.763$
<i>GJA3</i>	$r = -0.117$ $P = 0.732$	$r = -0.100$ $P = 0.769$	$r = 0.113$ $P = 0.741$	$r = 0.114$ $P = 0.738$	$r = 0.015$ $P = 0.967$
<i>GJC1</i>	$r = 0.097$ $P = 0.778$	$r = 0.111$ $P = 0.745$	$r = 0.283$ $P = 0.398$	$r = 0.350$ $P = 0.292$	$r = 0.011$ $P = 0.976$
<i>ITGA1</i>	$r = 0.059$ $P = 0.863$	$r = 0.122$ $P = 0.721$	$r = -0.473$ $P = 0.142$	$r = -0.497$ $P = 0.120$	$r = -0.409$ $P = 0.240$
<i>ITGA6</i>	$r = 0.231$ $P = 0.495$	$r = 0.316$ $P = 0.344$	$r = -0.429$ $P = 0.188$	$r = -0.398$ $P = 0.226$	$r = 0.554$ $P = 0.096$
<i>ITGA9</i>	$r = 0.372$ $P = 0.260$	$r = 0.388$ $P = 0.239$	$r = -0.168$ $P = 0.621$	$r = -0.088$ $P = 0.797$	$r = 0.625$ $P = 0.053$
<i>ITGAE</i>	$r = -0.199$ $P = 0.558$	$r = -0.177$ $P = 0.602$	$r = 0.048$ $P = 0.888$	$r = 0.015$ $P = 0.966$	$r = 0.025$ $P = 0.946$



<i>ITGAM</i>	$r = -0.491$ $P = 0.150$	$r = -0.458$ $P = 0.183$	$r = 0.066$ $P = 0.856$	$r = -0.025$ $P = 0.945$	$r = -0.457$ $P = 0.216$
<i>ITGAV</i>	$r = 0.292$ $P = 0.414$	$r = 0.338$ $P = 0.340$	$r = -0.348$ $P = 0.325$	$r = -0.311$ $P = 0.381$	$r = 0.523$ $P = 0.148$
<i>JAM2</i>	$r = 0.260$ $P = 0.440$	$r = 0.311$ $P = 0.352$	$r = -0.548$ $P = 0.081$	$r = -0.541$ $P = 0.086$	$r = 0.544$ $P = 0.104$
<i>JUP</i>	$r = 0.109$ $P = 0.750$	$r = 0.144$ $P = 0.672$	$r = -0.049$ $P = 0.885$	$r = -0.023$ $P = 0.945$	$r = 0.101$ $P = 0.782$
<i>LIMS1</i>	$r = 0.130$ $P = 0.704$	$r = 0.200$ $P = 0.556$	$r = 0.020$ $P = 0.954$	$r = 0.074$ $P = 0.830$	$r = 0.358$ $P = 0.309$
<i>PCDH7</i>	$r = 0.031$ $P = 0.932$	$r = 0.023$ $P = 0.950$	$r = -0.274$ $P = 0.444$	$r = -0.287$ $P = 0.422$	$r = 0.246$ $P = 0.524$
<i>PCDH12</i>	$r = 0.176$ $P = 0.627$	$r = 0.234$ $P = 0.516$	$r = -0.471$ $P = 0.169$	$r = -0.453$ $P = 0.188$	$r = 0.542$ $P = 0.132$
<i>PCDH15</i>	$r = 0.112$ $P = 0.744$	$r = 0.033$ $P = 0.924$	$r = 0.083$ $P = 0.809$	$r = 0.088$ $P = 0.796$	$r = -0.121$ $P = 0.738$
<i>PCDHB4</i>	$r = 0.333$ $P = 0.347$	$r = 0.383$ $P = 0.275$	$r = -0.335$ $P = 0.344$	$r = -0.277$ $P = 0.439$	$r = 0.361$ $P = 0.340$
<i>PCDHB6</i>	$r = 0.258$ $P = 0.461$	$r = 0.284$ $P = 0.453$	$r = -0.266$ $P = 0.457$	$r = -0.128$ $P = 0.724$	$r = 0.374$ $P = 0.321$
<i>PCDHB10</i>	$r = 0.304$ $P = 0.426$	$r = 0.334$ $P = 0.380$	$r = -0.159$ $P = 0.682$	$r = -0.076$ $P = 0.847$	$r = 0.400$ $P = 0.326$
<i>PCDHB15</i>	$r = -0.068$ $P = 0.843$	$r = -0.191$ $P = 0.574$	$r = 0.534$ $P = 0.056$	$r = 0.541$ $P = 0.052$	$r = -0.454$ $P = 0.188$
<i>PCDHGA2</i>	$r = -0.307$ $P = 0.422$	$r = -0.278$ $P = 0.469$	$r = 0.443$ $P = 0.232$	$r = 0.436$ $P = 0.241$	$r = -0.435$ $P = 0.282$
<i>PCDHGA3</i>	$r = -0.793$ $P = 0.004$	$r = -0.822$ $P = 0.002$	$r = 0.867$ $P = 0.001$	$r = 0.781$ $P = 0.005$	$r = -0.826$ $P = 0.003$
<i>PCDHGA5</i>	$r = 0.160$ $P = 0.638$	$r = 0.197$ $P = 0.562$	$r = 0.182$ $P = 0.591$	$r = 0.268$ $P = 0.426$	$r = 0.321$ $P = 0.366$
<i>PCDHGA7</i>	$r = 0.361$ $P = 0.340$	$r = 0.284$ $P = 0.459$	$r = -0.161$ $P = 0.679$	$r = -0.114$ $P = 0.771$	$r = -0.100$ $P = 0.813$
<i>PCDHGB3</i>	$r = -0.448$ $P = 0.194$	$r = -0.503$ $P = 0.138$	$r = 0.609$ $P = 0.062$	$r = 0.563$ $P = 0.090$	$r = -0.579$ $P = 0.102$
<i>PCDHGB7</i>	$r = 0.265$ $P = 0.459$	$r = 0.309$ $P = 0.384$	$r = -0.538$ $P = 0.109$	$r = -0.539$ $P = 0.108$	$r = 0.146$ $P = 0.708$
<i>PCDHGC3</i>	$r = 0.065$ $P = 0.868$	$r = 0.053$ $P = 0.893$	$r = 0.202$ $P = 0.602$	$r = 0.255$ $P = 0.508$	$r = 0.421$ $P = 0.299$
<i>PKP2</i>	$r = -0.025$	$r = 0.091$	$r = -0.176$	$r = -0.191$	$r = 0.312$



	$P = 0.941$	$P = 0.790$	$P = 0.606$	$P = 0.574$	$P = 0.379$
<i>PKP4</i>	$r = -0.055$ $P = 0.873$	$r = -0.108$ $P = 0.752$	$r = 0.322$ $P = 0.334$	$r = 0.325$ $P = 0.329$	$r = -0.179$ $P = 0.621$
<i>PVRL3</i>	$r = 0.013$ $P = 0.972$	$r = 0.056$ $P = 0.878$	$r = -0.067$ $P = 0.854$	$r = -0.038$ $P = 0.916$	$r = 0.484$ $P = 0.187$
<i>SELP</i>	$r = -0.304$ $P = 0.363$	$r = -0.373$ $P = 0.259$	$r = 0.146$ $P = 0.668$	$r = 0.076$ $P = 0.825$	$r = -0.549$ $P = 0.100$
<i>VCL</i>	$r = 0.022$ $P = 0.949$	$r = 0.013$ $P = 0.971$	$r = 0.409$ $P = 0.211$	$r = 0.456$ $P = 0.159$	$r = -0.091$ $P = 0.803$
<i>VCAM1</i>	$r = -0.379$ $P = 0.251$	$r = -0.390$ $P = 0.236$	$r = 0.008$ $P = 0.981$	$r = -0.065$ $P = 0.849$	$r = -0.238$ $P = 0.507$



Tabla 2. Principales relaciones entre los genes de adhesiones alterados en la MCI.

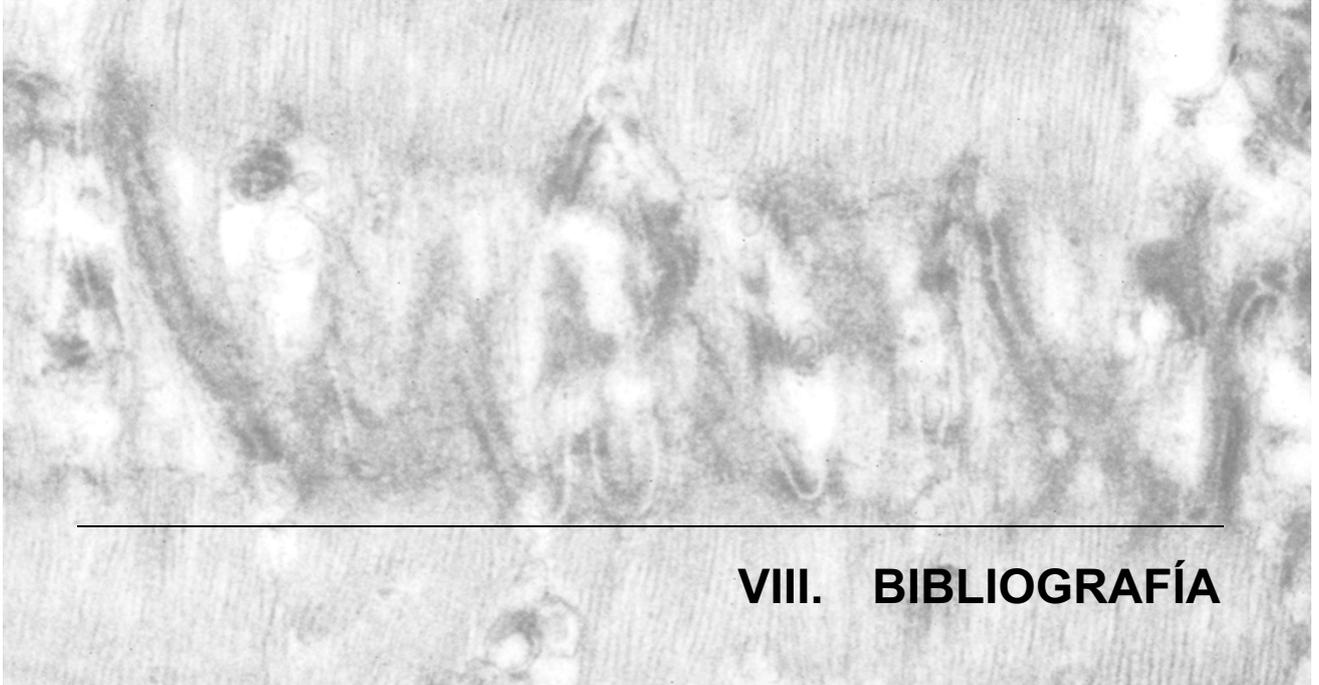
Gen	Fracción Eyección	Fracción Acortamiento	DSVI	DDVI	Volumen latido
<i>CADM1</i>	$r = -0.534$ $P = 0.091$	$r = -0.553$ $P = 0.078$	$r = 0.517$ $P = 0.103$	$r = 0.460$ $P = 0.154$	$r = -0.340$ $P = 0.336$
<i>CDH6</i>	$r = -0.417$ $P = 0.202$	$r = -0.368$ $P = 0.266$	$r = -0.190$ $P = 0.575$	$r = -0.289$ $P = 0.388$	$r = -0.058$ $P = 0.874$
<i>CDH13</i>	$r = 0.283$ $P = 0.399$	$r = 0.368$ $P = 0.265$	$r = -0.171$ $P = 0.615$	$r = -0.096$ $P = 0.778$	$r = 0.526$ $P = 0.116$
<i>CDH26</i>	$r = -0.055$ $P = 0.876$	$r = -0.161$ $P = 0.637$	$r = -0.014$ $P = 0.967$	$r = -0.061$ $P = 0.859$	$r = -0.353$ $P = 0.318$
<i>CLDN9</i>	$r = -0.591$ $P = 0.072$	$r = -0.609$ $P = 0.062$	$r = 0.328$ $P = 0.354$	$r = 0.258$ $P = 0.473$	$r = -0.512$ $P = 0.159$
<i>CLDN12</i>	$r = 0.027$ $P = 0.936$	$r = 0.034$ $P = 0.922$	$r = 0.275$ $P = 0.414$	$r = 0.323$ $P = 0.332$	$r = 0.149$ $P = 0.681$
<i>CTNNA3</i>	$r = -0.028$ $P = 0.936$	$r = -0.057$ $P = 0.869$	$r = -0.092$ $P = 0.788$	$r = -0.118$ $P = 0.729$	$r = -0.195$ $P = 0.589$
<i>CTNND2</i>	$r = -0.515$ $P = 0.102$	$r = -0.412$ $P = 0.209$	$r = 0.181$ $P = 0.595$	$r = 0.088$ $P = 0.798$	$r = -0.316$ $P = 0.374$
<i>DSC2</i>	$r = -0.206$ $P = 0.544$	$r = -0.211$ $P = 0.533$	$r = 0.306$ $P = 0.360$	$r = 0.292$ $P = 0.383$	$r = -0.074$ $P = 0.838$
<i>DSP</i>	$r = 0.090$ $P = 0.792$	$r = 0.100$ $P = 0.769$	$r = -0.316$ $P = 0.344$	$r = -0.320$ $P = 0.337$	$r = -0.296$ $P = 0.407$
<i>FHOD1</i>	$r = 0.198$ $P = 0.559$	$r = 0.165$ $P = 0.629$	$r = 0.044$ $P = 0.899$	$r = 0.082$ $P = 0.811$	$r = -0.110$ $P = 0.763$
<i>GJA3</i>	$r = -0.117$ $P = 0.732$	$r = -0.100$ $P = 0.769$	$r = 0.113$ $P = 0.741$	$r = 0.114$ $P = 0.738$	$r = 0.015$ $P = 0.967$
<i>GJC1</i>	$r = 0.097$ $P = 0.778$	$r = 0.111$ $P = 0.745$	$r = 0.283$ $P = 0.398$	$r = 0.350$ $P = 0.292$	$r = 0.011$ $P = 0.976$
<i>ITGA1</i>	$r = 0.059$ $P = 0.863$	$r = 0.122$ $P = 0.721$	$r = -0.473$ $P = 0.142$	$r = -0.497$ $P = 0.120$	$r = -0.409$ $P = 0.240$
<i>ITGA6</i>	$r = 0.231$ $P = 0.495$	$r = 0.316$ $P = 0.344$	$r = -0.429$ $P = 0.188$	$r = -0.398$ $P = 0.226$	$r = 0.554$ $P = 0.096$
<i>ITGA9</i>	$r = 0.372$ $P = 0.260$	$r = 0.388$ $P = 0.239$	$r = -0.168$ $P = 0.621$	$r = -0.088$ $P = 0.797$	$r = 0.625$ $P = 0.053$
<i>ITGAE</i>	$r = -0.199$ $P = 0.558$	$r = -0.177$ $P = 0.602$	$r = 0.048$ $P = 0.888$	$r = 0.015$ $P = 0.966$	$r = 0.025$ $P = 0.946$
<i>ITGAM</i>	$r = -0.491$	$r = -0.458$	$r = 0.066$	$r = -0.025$	$r = -0.457$



	$P = 0.150$	$P = 0.183$	$P = 0.856$	$P = 0.945$	$P = 0.216$
<i>ITGAV</i>	$r = 0.292$ $P = 0.414$	$r = 0.338$ $P = 0.340$	$r = -0.348$ $P = 0.325$	$r = -0.311$ $P = 0.381$	$r = 0.523$ $P = 0.148$
<i>JAM2</i>	$r = 0.260$ $P = 0.440$	$r = 0.311$ $P = 0.352$	$r = -0.548$ $P = 0.081$	$r = -0.541$ $P = 0.086$	$r = 0.544$ $P = 0.104$
<i>JUP</i>	$r = 0.109$ $P = 0.750$	$r = 0.144$ $P = 0.672$	$r = -0.049$ $P = 0.885$	$r = -0.023$ $P = 0.945$	$r = 0.101$ $P = 0.782$
<i>LIMS1</i>	$r = 0.130$ $P = 0.704$	$r = 0.200$ $P = 0.556$	$r = 0.020$ $P = 0.954$	$r = 0.074$ $P = 0.830$	$r = 0.358$ $P = 0.309$
<i>PCDH7</i>	$r = 0.031$ $P = 0.932$	$r = 0.023$ $P = 0.950$	$r = -0.274$ $P = 0.444$	$r = -0.287$ $P = 0.422$	$r = 0.246$ $P = 0.524$
<i>PCDH12</i>	$r = 0.176$ $P = 0.627$	$r = 0.234$ $P = 0.516$	$r = -0.471$ $P = 0.169$	$r = -0.453$ $P = 0.188$	$r = 0.542$ $P = 0.132$
<i>PCDH15</i>	$r = 0.112$ $P = 0.744$	$r = 0.033$ $P = 0.924$	$r = 0.083$ $P = 0.809$	$r = 0.088$ $P = 0.796$	$r = -0.121$ $P = 0.738$
<i>PCDHB4</i>	$r = 0.333$ $P = 0.347$	$r = 0.383$ $P = 0.275$	$r = -0.335$ $P = 0.344$	$r = -0.277$ $P = 0.439$	$r = 0.361$ $P = 0.340$
<i>PCDHB6</i>	$r = 0.258$ $P = 0.461$	$r = 0.284$ $P = 0.453$	$r = -0.266$ $P = 0.457$	$r = -0.128$ $P = 0.724$	$r = 0.374$ $P = 0.321$
<i>PCDHB10</i>	$r = 0.304$ $P = 0.426$	$r = 0.334$ $P = 0.380$	$r = -0.159$ $P = 0.682$	$r = -0.076$ $P = 0.847$	$r = 0.400$ $P = 0.326$
<i>PCDHB15</i>	$r = -0.068$ $P = 0.843$	$r = -0.191$ $P = 0.574$	$r = 0.534$ $P = 0.056$	$r = 0.541$ $P = 0.052$	$r = -0.454$ $P = 0.188$
<i>PCDHGA2</i>	$r = -0.307$ $P = 0.422$	$r = -0.278$ $P = 0.469$	$r = 0.443$ $P = 0.232$	$r = 0.436$ $P = 0.241$	$r = -0.435$ $P = 0.282$
<i>PCDHGA3</i>	$r = -0.793$ $P = 0.004$	$r = -0.822$ $P = 0.002$	$r = 0.867$ $P = 0.001$	$r = 0.781$ $P = 0.005$	$r = -0.826$ $P = 0.003$
<i>PCDHGA5</i>	$r = 0.160$ $P = 0.638$	$r = 0.197$ $P = 0.562$	$r = 0.182$ $P = 0.591$	$r = 0.268$ $P = 0.426$	$r = 0.321$ $P = 0.366$
<i>PCDHGA7</i>	$r = 0.361$ $P = 0.340$	$r = 0.284$ $P = 0.459$	$r = -0.161$ $P = 0.679$	$r = -0.114$ $P = 0.771$	$r = -0.100$ $P = 0.813$
<i>PCDHGB3</i>	$r = -0.448$ $P = 0.194$	$r = -0.503$ $P = 0.138$	$r = 0.609$ $P = 0.062$	$r = 0.563$ $P = 0.090$	$r = -0.579$ $P = 0.102$
<i>PCDHGB7</i>	$r = 0.265$ $P = 0.459$	$r = 0.309$ $P = 0.384$	$r = -0.538$ $P = 0.109$	$r = -0.539$ $P = 0.108$	$r = 0.146$ $P = 0.708$
<i>PCDHGC3</i>	$r = 0.065$ $P = 0.868$	$r = 0.053$ $P = 0.893$	$r = 0.202$ $P = 0.602$	$r = 0.255$ $P = 0.508$	$r = 0.421$ $P = 0.299$
<i>PKP2</i>	$r = -0.025$ $P = 0.941$	$r = 0.091$ $P = 0.790$	$r = -0.176$ $P = 0.606$	$r = -0.191$ $P = 0.574$	$r = 0.312$ $P = 0.379$



<i>PKP4</i>	$r = -0.055$ $P = 0.873$	$r = -0.108$ $P = 0.752$	$r = 0.322$ $P = 0.334$	$r = 0.325$ $P = 0.329$	$r = -0.179$ $P = 0.621$
<i>PVRL3</i>	$r = 0.013$ $P = 0.972$	$r = 0.056$ $P = 0.878$	$r = -0.067$ $P = 0.854$	$r = -0.038$ $P = 0.916$	$r = 0.484$ $P = 0.187$
<i>SELP</i>	$r = -0.304$ $P = 0.363$	$r = -0.373$ $P = 0.259$	$r = 0.146$ $P = 0.668$	$r = 0.076$ $P = 0.825$	$r = -0.549$ $P = 0.100$
<i>VCL</i>	$r = 0.022$ $P = 0.949$	$r = 0.013$ $P = 0.971$	$r = 0.409$ $P = 0.211$	$r = 0.456$ $P = 0.159$	$r = -0.091$ $P = 0.803$
<i>VCAM1</i>	$r = -0.379$ $P = 0.251$	$r = -0.390$ $P = 0.236$	$r = 0.008$ $P = 0.981$	$r = -0.065$ $P = 0.849$	$r = -0.238$ $P = 0.507$



VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ableser, M.J., Penuela, S., Lee, J., Shao, Q y Laird D.W. 2014. Connexin43 Reduces Melanoma Growth within a Keratinocyte Microenvironment and during Tumorigenesis in Vivo. *J Biol Chem*, 289(3), pp.1592-1603.
- Acehan, D., Petzold, C., Gumper, I., Sabatini, D.D., Müller, E. J., Cowin, P. y Stokes, D.L., 2008. Plakoglobin is required for effective intermediate filament anchorage to desmosomes. *J Invest Dermatol*, 128(11), pp.2665-75.
- Agullo-Pascual, E., Lin, X., Leo-Macias, A., Zhang, M., Liang, F.X., Li, Z., Pfenniger, A., Lübckemeier, I., Keegan, S., Fenyö, D., Willecke, K., Rothenberg, E. y Delmar, M., 2014. Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and NaV1.5 localization at the intercalated disc. *Cardiovasc Res*, 104(2), pp. 371-81.
- Ahmad, T., Fiuzat, M., Felker, G.M. y O'Connor, C., 2012. Novel biomarkers in chronic heart failure. *Nat Rev Cardiol*, 9(6), pp.347-359.
- Alcalde, M., Campuzano, O., Berne, P., García-PAVía, P., Doltra, A., Arbelo, E., Sarquella-Brugada, G., Iglesias, A., Alonso-Pulpon, L., Brugada, J. y Brugada, R., 2014. Stop-Gain Mutations in PKP2 Are Associated with a Later Age of Onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *PLoS ONE*, 9(6), p.e100560.
- Allweiler, S., Leach, M.C. y Flecknell, P.A., 2010. The use of propofol and sevoflurane for surgical anaesthesia in New Zealand White rabbits. *Lab Anim*, 44(2), pp.113-117.
- Ammar, K.A., Jacobsen, S.J., Mahoney, D.W., Kors, J.A., Redfield, M.M., Burnett, J.C. y Rodeheffer, R.J., 2007. Prevalence and prognostic significance of heart failure stages: application of the American College of Cardiology/American Heart Association heart failure staging criteria in the community. *Circulation*, 115(12), pp.1563-70.
- Anders, S., Pyl, P.T. y Huber, W., 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), pp.166-9.
- Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. y Juliano, R.L., 1998. Signal Transduction and

Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacol Rev*, 50(2), pp. 197-263.

Arbustini, E., Narula, N., Dec, G.W., Reddy, K.S., Greenberg, B., Kushwaha, S., Marwick, T., Pinney, S., Bellazzi, R., Favalli, V., Kramer, C., Roberts, R., Zoghbi, W.A., Bonow, R., Tavazzi, L., Fuster, V. y Narula, J., 2013. The MOGE(S) Classification for a Phenotype–Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation. *J Am Coll Cardiol*, 62(22), pp.2046-2072.

Awad, M.M., Calkins, H. y Judge, D.P., 2008. Mechanisms of Disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 5(5), pp. 258-67.

Basso, C., Bauce, B., Corrado, D. y Thiene, G., 2011. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*, 9(4), pp.223-233.

Basso, C., Czarnowska, E., Della Barbera, M., Bauce, B., Beffagna, G., Wlodarska, E.K., Pilichou, K., Ramondo, A., Lorenzon, A., Wozniak, O., Corrado, D., Daliento, L., Danieli, G.A., Valente, M., Nava, A., Thiene, G. y Rampazzo, A. 2006. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J*, 27(15), pp.1847-1854.

Bauce, B. Basso, C., Rampazzo, A., Beffagna, G., Daliento, L., Frigo, G., Malacrida, S., Settimo, L., Danieli, G., Thiene, G. y Nava, A., 2005. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations. *Eur Heart J*, 26(16), pp. 1666-75.

Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A. y Bauer, H.C., 2010. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *J Biomed Biotechnol*, 2010:402593 pp.1-11.

Bevilacqua, M.P. y Nelson, R.M., 1993. Selectins. *J Clin Invest*, 91(2), pp.379-87.

- Bhonsale, A., Groeneweg, J.A., James, C.A., Dooijes, D., Tichnell, C., Jongbloed, J.D., Murray, B., te Riele, A.S., van den Berg, M.P., Bikker, H., Atsma, D.E., de Groot, N.M., Houweling, A.C., van der Heijden, J.F., Russell, S.D., Doevendans, P.A., van Veen, T.A., Tandri, H., Wilde, A.A., Judge, D.P., van Tintelen, J.P., Calkins, H. y Hauer, R.N., 2015. Impact of genotype on clinical course in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated mutation carriers. *Eur Heart J*, 36(14), pp. 847-55.
- Boix Martínez, R., Almazán Isla, J. y Medrano Albero, M.J., 2002. Heart failure mortality in Spain, 1977-1998. *Rev Esp Cardiol*, 55(3), pp.219-26.
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B. y Wagner, D.D., 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 73(5), pp.1109-12.
- Borradori, L. y Sonnenberg, A., 1999. Structure and Function of Hemidesmosomes: More Than Simple Adhesion Complexes. *J Invest Dermatol*, 112(4), pp.411-418.
- Bowen, C.J. Zhou, J., Sung, D.C. y Butcher, J.T., 2015. Cadherin-11 coordinates cellular migration and extracellular matrix remodeling during aortic valve maturation. *Dev Biol*, 407(1), pp.145-57.
- Bruce, A.F., Rothery, S., Dupont, E. y Severs, N.J., 2008. Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc Res*, 77(4), pp.757-65.
- Buda, A.J., Zotz, R.J., Pace, D.P. y Krause, L.C., 1986. Comparison of two-dimensional echocardiographic wall motion and wall thickening abnormalities in relation to the myocardium at risk. *Am Heart J*, 111(3), pp.587-92.
- Buglioni, A. y Burnett, J.C., 2015. Pathophysiology and the cardiorenal connection in heart failure. Circulating hormones: biomarkers or mediators. *Clin Chim Acta*, 443, pp.3-8.
- Campuzano, O., Alcalde, M., Allegue, C., Iglesias, A., García-Pavía, P., Partemi, S., Oliva, A., Pascali, V.L., Berne, P., Sarquella-Brugada, G., Brugada, J., Brugada,

- P. y Brugada, R., 2013. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Med Genet*, 50(5) pp.280-289.
- Carvajal-Huerta, L., 1998. Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy. *J Am Acad Dermatol*, 39(3), pp.418-421.
- Castro Beiras, A., Monserrat, L. y Hermida, M., 2003. Familial dilated cardiomyopathy: current status and clinical benefits of basic research. *Rev Esp Cardiol*, 56 Suppl 1, pp.7-12.
- Charuzi, Y., Davidson, R.M., Barrett, M.J., Beeder, C., Marshall, L.A., Loh, I.K., Prause, J.A., Meerbaum, S. y Corday, E., 1983. Simultaneous assessment of segmental and global left ventricular function by two-dimensional echocardiography in acute myocardial infarction. *Clini Cardiol*, 6(6), pp.255-64.
- Chen, J., Bardes, E.E., Aronow, B.J. y Jegga, A.G., 2009. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res*, 37(Web Server issue), pp.W305-11.
- Chen, W. V. y Maniatis, T., 2013. Clustered protocadherins. *Development*, 140(16), pp.3297-3302.
- Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F. y Green, K.J., 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem*, 277(12), pp.10512-22.
- Chi, N.C., Bussen, M., Brand-Arzamendi, K., Ding, C., Olgin, J.E., Shaw, R.M., Martin, G.R. y Stainier, D.Y., 2010. Cardiac conduction is required to preserve cardiac chamber morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33), pp.14662-7.
- Chuang, M.L., Hibberd, M.G., Salton, C.J., Beaudin, R.A., Riley, M.F., Parker, R.A., Douglas, P.S. y Manning, W.J., 2000. Importance of imaging method over imaging modality in noninvasive determination of left ventricular volumes and ejection fraction: assessment by two- and three-dimensional echocardiography and magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*, 35(2), pp.477-84.

- Ciobanasiu, C., Faivre, B. y Le Clainche, C., 2014. Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin–vinculin complex reinforces actin anchoring. *Nat Commun*, 5:3095.
- Cortes, R., Rivera, M., Salvador, A., Bertomeu, V., de Burgos, F.G., Roselló-Lletí, E., Portolés, M., Payá, R., Martínez-Dolz, L. y Climent, V., 2007. Variability of NT-proBNP plasma and urine levels in patients with stable heart failure: a 2-year follow-up study. *Heart*, 93(8), pp.957-962.
- Cowie, M.R., Mosterd, A., Wood, D.A., Deckers, J.W., Poole-Wilson, P.A., Sutton, G.C. y Grobbee, D.E., 1997. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J*, 18 (2), pp.208-225.
- Cowie, M.R., Struthers, A.D., Wood, D.A., Coats, A.J., Thompson, S.G., Poole-Wilson, P.A. y Sutton, G.C., 1997. Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet*, 350(9088), pp.1349-1353.
- D'hondt, C., Iyyathurai, J., Vinken, M., Rogiers, V., Leybaert, L., Himpens, B. y Bultynck, G., 2013. Regulation of connexin- and pannexin-based channels by post-translational modifications. *Biol Cell*, 105(9), pp.373-398.
- Dao, L., Gonnermann, C. y Franz, C.M., 2013. Investigating differential cell-matrix adhesion by directly comparative single-cell force spectroscopy. *J Mol Recognit*, 26(11), pp.578-589.
- Delgado, J.F., Oliva, J., Llano, M., Pascual-Figal, D., Grillo, J.J., Comín-Colet, J., Díaz, B., Martínez de La Concha, L., Martí, B. y Peña, L.M., 2014. Health Care and Nonhealth Care Costs in the Treatment of Patients With Symptomatic Chronic Heart Failure in Spain. *Rev Esp Cardiol*, 67(8), pp 643-50.
- Denolin, H., Kuhn, H., Krayenbuehl, H.P., Loogen, F. y Reale, A., 1983. The definition of heart failure. *Eur Heart J*, 4(7), pp.445-8.
- Dewald, O., Frangogiannis, N.G., Zoerlein, M.P., Duerr, G.D., Taffet, G., Michael, L.H., Welz, A. y Entman, M.L., 2004. A Murine Model of Ischemic Cardiomyopathy Induced by Repetitive Ischemia and Reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg*, 52(5),

pp.305-311.

Ding, L., Lu, Z., Lu, Q. y Chen, Y.H., 2013. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. *Cancer Manag Res*, 5, pp.367-75.

Dupont, E., Matsushita, T., Kaba, R.A., Vozzi, C., Coppen, S.R., Khan, N., Kaprielian, R., Yacoub, M.H. y Severs, N.J., 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 33(2), pp.359-71.

Edgar, R., Domrachev, M. y Lash, A.E., 2002. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*, 30(1), pp.207-10.

Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühl, U., Maisch, B., McKenna, W.J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L. y Keren, A., 2008. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*, 29(2), pp.270-6.

Elliott, P., O'Mahony, C., Syrris, P., Evans, A., Rivera Sorensen, C., Sheppard, M.N., Carr-White, G., Pantazis, A. y McKenna, W.J., 2010. Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*, 3(4), pp.314-22.

Elliott, P.M., 2013. Classification of Cardiomyopathies Evolution or Revolution? *J Am Coll Cardiol*, 62(22), pp.2073-2074.

Elsner, D. y Riegger, G.A., 1995. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 10(3), pp.253-9.

Epstein, H.F., Aronow, B.J. y Harris, H.E., 1976. Myosin-paramyosin cofilaments: enzymatic interactions with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(9), pp.3015-9.

Fairley, J.A., Heintz, P.W., Neuburg, M., Diaz, L.A. y Giudice, G.J., 1995. Expression pattern of the bullous pemphigoid-180 antigen in normal and neoplastic epithelia.

Br J Dermatol, 133(3), pp.385-91.

Farhadifar, R., Röper, J.C., Aigouy, B., Eaton, S. y Jülicher, F., 2007. The Influence of Cell Mechanics, Cell-Cell Interactions, and Proliferation on Epithelial Packing. *Curr Biol*, 17(24), pp.2095-2104.

Faura Tellez, G., Vandepoele, K., Brouwer, U., Koning, H., Elderman, R.M., Hackett, T.L., Willemse, B.W., Holloway, J., Van Roy, F., Koppelman, G.H. y Nawijn, M.C., 2015. Protocadherin-1 binds to SMAD3 and suppresses TGF- β 1-induced gene transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309(7), pp.L725-L735.

Ferreira-Cornwell, M.C., Luo, Y., Narula, N., Lenox, J.M., Lieberman, M. y Radice, G.L., 2002. Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Sci*, 115(Pt 8), pp.1623-34.

Fine, J.D., 2014. Clinical and Immunological Factors Associated With Bullous Pemphigoid Relapse. *JAMA Dermatol*, 150(1), p.34.

Fogh, Betina S. , Mulhaupt, Hinke A.B. y Couchman, J.R., 2014. Protein Kinase C, Focal Adhesions and the Regulation of Cell Migration. *J Histochem Cytochem*, 62(3), pp.172-184.

Foty, R.A. y Steinberg, M.S., 2013. Differential adhesion in model systems. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(5), pp.631-645.

Fox, K.A., Anderson, F.A. Jr, Dabbous, O.H., Steg, P.G., López-Sendón, J., Van de Werf, F., Budaj, A., Gurfinkel, E.P., Goodman, S.G., Brieger, D. y GRACE investigators, 2005. Intervention in acute coronary syndromes: do patients undergo intervention on the basis of their risk characteristics? The Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Heart*, 93(2), pp.177-182.

Franke, W.W., 2009. Discovering the molecular components of intercellular junctions-- a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(3), p.a003061.

Freemont, A.J. y Hoyland, J.A., 1996. Cell adhesion molecules. *Clin Mol Pathol*, 49(6), pp.321-30.

- Friedl, P. Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5), pp.362-374.
- Garner, J., Watanabe, M. y Rutishauser, U., 1986. Rapid axonal transport of the neural cell adhesion molecule. *J Neurosci*, 6(11), pp.3242-9.
- Garrod, D. y Chidgey, M., 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), pp.572-87.
- Gil-Cayuela, C., Rivera, M., Ortega, A., Tarazón, E., Triviño, J.C., Lago, F., González-Juanatey, J.R., Almenar, L., Martínez-Dolz, L., Portolés, M., 2015. RNA Sequencing Analysis Identifies New Human Collagen Genes Involved in Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 65(12), pp.1265-1267.
- Godsel, L.M., Dubash, A.D., Bass-Zubek, A.E., Amargo, E.V., Klessner, J.L., Hobbs, R.P., Chen, X., Green, K.J., 2010. Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA. *Mol Biol Cell*, 21(16), pp.2844-59.
- Goossens, S., Janssens, B., Bonn e, S., De Rycke, R., Braet, F., van Hengel, J., van Roy, F., 2007. A unique and specific interaction between α T-catenin and plakophilin-2 in the area composita, the mixed-type junctional structure of cardiac intercalated discs. *J Cell Sci*, 120(12), pp.2126-36.
- Green, K.J. y Simpson, C.L., 2007. Desmosomes: New Perspectives on a Classic. *J Invest Dermatol*, 127, pp.2499-2515.
- Gr nig, E., Tasman, J.A., K cherer, H., Franz, W., K bler, W. y Katus, H.A., 1998. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 31(1), pp.186-94.
- Gu, R., Bai, J., Ling, L., Ding, L., Zhang, N., Ye, J., Ferro, A. y Xu, B., 2012. Increased Expression of Integrin-Linked Kinase Improves Cardiac Function and Decreases Mortality in Dilated Cardiomyopathy Model of Rats. *PLoS One*, 7(2), p.e31279.
- Guo, D., Kassiri, Z., Basu, R., Chow, F.L., Kandalam, V., Damilano, F., Liang, W., Izumo, S., Hirsch, E., Penninger, J.M., Backx, P.H. y Oudit, G.Y., 2010. Loss of

- PI3K γ enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress. *Circ Res*, 107(10), pp.1275-89.
- Gustafson-Wagner, E.A., Sinn, H.W., Chen, Y.L., Wang, D.Z., Reiter, R.S., Lin, J.L., Yang, B., Williamson, R.A., Chen, J., Lin, C.I. y Lin, J.J., 2007. Loss of mXin , an intercalated disk protein, results in cardiac hypertrophy and cardiomyopathy with conduction defects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(5), pp.H2680-92.
- Hanson, H.H., Kang, S., Fernández-Monreal, M., Oung, T., Yildirim, M., Lee, R., Suyama, K., Hazan, R.B. y Phillips, G.R., 2010. LC3-dependent intracellular membrane tubules induced by gamma-protocadherins A3 and B2: a role for intraluminal interactions. *J Biol Chem*, 285(27), pp.20982-92.
- Harmon, R.M. y Green, K.J., 2013. Structural and Functional Diversity of Desmosomes. *Cell Commun Adhes*, 20(6), pp.171-187.
- Harpaz, Y. y Chothia, C., 1994. Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol*, 238(4), pp.528-39.
- Hartsock, A. y Nelson, W.J., 2008. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), pp.660-9.
- Hasegawa, K., Lee, S.J., Jobe, S.M., Markham, B.E. y Kitsis, R.N., 1997. cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation*, 96(11), pp.3943-53.
- Hatzfeld, M., 2007. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta*, 1773(1), pp.69-77.
- Herrer, I., Roselló-Lletí, E., Rivera, M., Molina-Navarro, M.M., Tarazón, E., Ortega, A., Martínez-Dolz, L., Triviño, J.C., Lago, F., González-Juanatey, J.R., Bertomeu, V., Montero, J.A, Portolés, M., 2014. RNA-sequencing analysis reveals new alterations in cardiomyocyte cytoskeletal genes in patients with heart failure. *Lab Invest*, 94(6), pp.645-653.

- Hesketh, G.G., Shah, M.H., Halperin, V.L., Cooke, C.A., Akar, F.G., Yen, T.E., Kass, D.A., Machamer, C.E., Van Eyk, J.E. y Tomaselli, G.F., 2010. Ultrastructure and Regulation of Lateralized Connexin43 in the Failing Heart. *Circ Res*, 106(6), pp. 1153-63.
- Ho, K.K., Pinsky, J.L., Kannel, W.B., Levy, D., 1993. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*, 22(4 Suppl A), p.6A-13A.
- Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S. y Leube, R.E., 2007. Structure and Function of Desmosomes. *Int Rev Cytol*, 264, pp. 65-163.
- Hopkinson, S.B., Baker, S.E. y Jones, J.C., 1995. Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *J Cell Biol*, 130(1), pp.117-25.
- Horwitz, R. y Webb, D., 2003. Cell migration. *Curr Biol*, 13(19), pp.R756-9.
- Hoshiga, M., Alpers, C.E., Smith, L.L., Giachelli, C.M. y Schwartz, S.M., 1995. Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ Res*, 77(6), pp.1129-35.
- Hotulainen, P. y Lappalainen, P., 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Bio*, 173(3), pp.383-394.
- Indra, I., Hong, S., Troyanovsky, R., Kormos, B. y Troyanovsky, S., 2013. The Adherens Junction: A Mosaic of Cadherin and Nectin Clusters Bundled by Actin Filaments. *J Invest Dermatol*, 133(11), pp. 2546-54.
- Israeli-Rosenberg, S., Manso, A.M., Okada, H. y Ross, R.S., 2014. Integrins and Integrin-Associated Proteins in the Cardiac Myocyte. *Circ Res*, 114(3), pp.572-86.
- Ivanov, A.I. y Naydenov, N.G., 2013. Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 303, pp. 27-99.

- Jaakkola, K., Jalkanen, S., Kaunismäki, K., Vääntinen, E., Saukko, P., Alanen, K., Kallajoki, M., Voipio-Pulkki, L.M. y Salmi, M., 2000. Vascular adhesion protein-1, intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin mediate leukocyte binding to ischemic heart in humans. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36(1), pp. 122-9.
- Janssens, B., Mohapatra, B., Vatta, M., Goossens, S., Vanpoucke, G., Kools, P., Montoye, T., van Hengel, J., Bowles, N.E., van Roy, F., Towbin, J.A., 2003. Assessment of the CTNNA3 gene encoding human alpha T-catenin regarding its involvement in dilated cardiomyopathy. *Hum Genetics*, 112(3), pp.227-36.
- Jensen, B. V, Skovsgaard, T. y Nielsen, S.L., 2002. Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. *Ann Oncol*, 13(5), pp.699-709.
- Joffe, S.W., Webster, K., McManus, D.D., Kiernan, M.S., Lessard, D., Yarzebski, J., Darling, C., Gore, J.M. y Goldberg, R.J., 2013, Improved Survival After Heart Failure: A Community-Based Perspective. *J Am Heart Assoc*, 2 (3), e000053.
- Johnson, J.L., Najor, N.A. y Green, K.J., 2014. Desmosomes: Regulators of Cellular Signaling and Adhesion in Epidermal Health and Disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med*, 4(11), a015297.
- Johnson, R.P. y Craig, S.W., 1995. The Carboxy-Terminal Tail Domain of Vinculin Contains a Cryptic Binding Site for Acidic Phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun*, 210(1), pp.159-64.
- Kalli, A.C., Morgan, G. y Sansom, M.S.P., 2013. Interactions of the Auxilin-1 PTEN-like Domain with Model Membranes Result in Nanoclustering of Phosphatidyl Inositol Phosphates. *Biophys J*, 105(1), pp.137-45.
- Kang, Y.J. Forbes, K., Carver, J. y Aplin, J.D., 2014. The role of the osteopontin-integrin $\alpha v \beta 3$ interaction at implantation: functional analysis using three different in vitro models. *Hum Reprod*, 29(4), pp.739-49.
- Kanno, S., Saffitz, J.E., 2001. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol*, 10(4), pp.169-77.

- Kapplinger, J.D., Landstrom, A.P., Salisbury, B.A., Callis, T.E., Pollevick, G.D., Tester, D.J., Cox, M.G., Bhuiyan, Z., Bikker, H., Wiesfeld, A.C., Hauer, R.N., van Tintelen, J.P., Jongbloed, J.D., Calkins, H., Judge, D.P., Wilde, A.A. y Ackerman, M.J., 2011. Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise. *J Am Col Cardiol*, 57(23), pp. 2317-27.
- Kelder, J.C., Cramer, M.J., van Wijngaarden, J., van Tooren, R., Mosterd, A., Moons, K.G., Lammers, J.W., Cowie, M.R., Grobbee, D.E. y Hoes, A.W., 2011. The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation*, 124(25), pp. 2865-73.
- Kirkpatrick, J.N., Vannan, M.A., Narula, J. y Lang, R.M., 2007. Echocardiography in Heart Failure: Applications, Utility, and New Horizons. *J Am Coll Cardiol*, 50(5), pp.381-96.
- Kleber, A.G. y Saffitz, J.E., 2014. Role of the intercalated disc in cardiac propagation and arrhythmogenesis. *Front Physiol*, 5, pp.404.
- Kreidberg, J.A. y Symons, J.M., 2000. Integrins in kidney development, function, and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(2), pp.F233-42.
- Kucera, J.P., Rohr, S. y Rudy, Y., 2002. Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res*, 91(12), pp.1176-82.
- Kumar, V., Abbas, A., Aster, J. Robbins Patología Humana. 9ª edición. Elsevier. 2013.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-5.
- Levy, D., Kenchaiah, S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Kupka, M.J., Ho, K.K., Murabito, J.M., Vasan, R.S., 2002. Long-Term Trends in the Incidence of and Survival with Heart Failure. *N Engl J Med*, 347(18), pp.1397-1402.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R y 1000 Genome Project Data Processing Subgroup., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16),

pp.2078-9.

- Li, J., 2014. Alterations in cell adhesion proteins and cardiomyopathy. *World J Cardiol*, 6(5), 304-13.
- Li, J., Goossens, S., van Hengel, J., Gao, E., Cheng, L., Tyberghein, K., Shang, X., De Rycke, R., van Roy, F., Radice, G.L., 2012. Loss of α T-catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia. *J Cell Sci*, 125(4), 1058-67.
- Libby, P. y Li, H., 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest*, 92(2), pp.538-539.
- Litwin, S.E., Katz, S.E., Morgan, J.P. y Douglas, P.S., 1994. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 89(1), pp.345-54.
- Locascio, A. y Nieto, M.A., 2001. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev*, 11(4), pp.464-9.
- Lorenzon, A., Pilichou, K., Rigato, I., Vazza, G., De Bortoli, M., Calore, M., Occhi, G., Carturan, E., Lazzarini, E., Cason, M., Mazzotti, E., Poloni, G., Mostacciuolo, M.L., Daliento, L., Thiene, G., Corrado, D., Basso, C., Bauce, B. y Rampazzo, A., 2015. Homozygous Desmocollin-2 Mutations and Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 116(8), pp.1245-1251.
- Lucocq, J., 2008. Quantification of structures and gold labeling in transmission electron microscopy. *Methods Cell Biol*, 88, pp.59-82.
- Lyon, R.C., Mezzano, V., Wright, A.T., Pfeiffer, E., Chuang, J., Banares, K., Castaneda, A., Ouyang, K., Cui, L., Contu, R., Gu, Y., Evans, S.M., Omens, J.H., Peterson, K.L., McCulloch, A.D. y Sheikh, F., 2014. Connexin defects underlie arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in a novel mouse model. *Hum Mol Genet*, 23(5), pp.1134-50.
- Ma, X.L., Weyrich, A.S., Lefer, D.J., Buerke, M., Albertine, K.H., Kishimoto, T.K., Lefer,

- A.M., 1993. Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation*, 88(2), pp.649-58.
- Macrae, D.J., 2007. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) Guidelines on Ethics of Clinical Trials. *Proc Am Thorac Soc*, 4(2), pp.176-179.
- Maitre, J.L., Berthoumieux, H., Krens, S.F., Salbreux, G., Jülicher, F., Paluch, E., Heisenberg, C.P., 2012. Adhesion Functions in Cell Sorting by Mechanically Coupling the Cortices of Adhering Cells. *Science*, 338(6104), pp.253-256.
- Mao, Q., Lin, C., Gao, J., Liang, X., Gao, W., Shen, L., Kang, L., Xu, B., 2014. Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate left ventricular remodeling and improve cardiac function after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, 397(1-2), pp.203-214.
- Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E., Young, J.B., American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention, 2006. 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*, 113(14), pp. 1807-16.
- Massoumi, R. y Sjölander, A., 2001. Leukotriene D(4) affects localisation of vinculin in intestinal epithelial cells via distinct tyrosine kinase and protein kinase C controlled events. *J Cell Sci*, 114(Pt 10), pp.1925-34.
- Masuelli, L., Bei, R., Sacchetti, P., Scappaticci, I., Francalanci, P., Albonici, L., Coletti, A., Palumbo, C., Minieri, M., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., Fantini, C., Carosella, L., Modesti, A. y Di Nardo, P., 2003. Beta-catenin accumulates in intercalated disks of hypertrophic cardiomyopathic hearts. *Cardiovasc Res*, 60(2), pp.376-87.

- Mayor, R. y Theveneau, E., 2013. The neural crest. *Development*, 140(11), pp.2247-2251.
- McCauley, M.D. y Wehrens, X.H.T., 2009. Animal models of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Dis Model Mech*, 2(11-12), pp.563-570.
- McEver, R.P., 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107(3), pp.331-339.
- McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., Jaarsma, T., Køber, L., Lip, G.Y., Maggioni, A.P., Parkhomenko, A., Pieske, B.M., Popescu, B.A., Rønnevik, P.K., Rutten, F.H., Schwitler, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P.T., Voors, A.A., Zannad, F., Zeiher, A., Bax, J.J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B.A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P.A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., McDonagh, T., Sechtem, U., Bonnet, L.A., Avraamides, P., Ben Lamin, H.A., Brignole, M., Coca, A., Cowburn, P., Dargie, H., Elliott, P., Flachskampf, F.A., Guida, G.F., Hardman, S., Jung, B., Merkely, B., Mueller, C., Nanas, J.N., Nielsen, O.W., Orn, S., Parissis, J.T. y Ponikowski, P., 2012. ESC Committee for Practice Guidelines. et al., 2012. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*, 14(8), pp.803-869.
- Mickelson, J.K., Lakkis, N.M., Villarreal-Levy, G., Hughes, B.J., Smith, C.W., 1996. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*, 28(2), pp. 345-53.
- Miller, S., Rogers, H.A., Lyon, P., Rand, V., Adamowicz-Brice, M., Clifford, S.C., Hayden, J.T., Dyer, S., Pfister, S., Korshunov, A., Brundler, M.A., Lowe, J., Coyle, B. y Grundy, R.G., 2011. Genome-wide molecular characterization of central nervous system primitive neuroectodermal tumor and pineoblastoma. *Neuro Oncol*, 13(8), pp.866-79.

- Mittal, A., Pulina, M., Hou, S.Y., Astrof, S., 2013. Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis. *Dev Biol*, 381(1), pp.73-82.
- Moncayo Arlandi, J. , 2016. Bases fisiopatológicas y moleculares de la miocardiopatía arritmogénica en un modelo de ratón para placofilina-2 truncada. Universidad de Valencia.
- Mooney, M., Bond, J., Monks, N., Eugster, E., Cherba, D., Berlinski, P., Kamerling, S., Marotti, K., Simpson, H., Rusk, T., Tembe, W., Legendre, C., Benson, H., Liang, W., Webb, C.P., 2013. Comparative RNA-Seq and Microarray Analysis of Gene Expression Changes in B-Cell Lymphomas of *Canis familiaris*. *PLoS ONE*, 8(4), e61088.
- Morishita, H. y Yagi, T., 2007. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 19(5), pp.584-592.
- Mozaffarian, D. Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K., Blaha, M.J., Cushman, M., Das, S.R., de Ferranti, S., Després, J.P., Fullerton, H.J., Howard, V.J., Huffman, M.D., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Judd, S.E., Kissela, B.M., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Liu, S., Mackey, R.H., Magid, D.J., McGuire, D.K., Mohler, E.R., Moy, C.S., Muntner, P., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Nichol, G., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Rodriguez, C.J., Rosamond, W., Sorlie, P.D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T.N., Virani, S.S., Woo, D., Yeh, R.W., Turner, M.B., American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee, 2016. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 133(4), pp.447-454.
- Nekrasova, O. y Green, K.J., 2013. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*, 23(11), pp.537-46.
- Nelson, W.J. y Nusse, R., 2004. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*, 303(5663), pp.1483-7.
- Newman, P.J., 1997. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*, 100(11 Suppl), pp.S25-9.
- Niessen, C.M., 2007. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *J Invest Dermatol*, 127(11), pp.2525-2532.

- Noorman, M., Hakim, S., Asimaki, A., Vreeker, A., van Rijen, H.V., van der Heyden, M.A., de Jonge, N., de Weger, R.A., Hauer, R.N., Saffitz, J.E. y van Veen, T.A., 2013. Reduced plakoglobin immunoreactivity in arrhythmogenic cardiomyopathy: methodological considerations. *Cardiovasc Pathol*, 22(5), pp.314-318.
- Norgett, E.E., Hatsell, S.J., Carvajal-Huerta, L., Cabezas, J.C., Common, J., Purkis, P.E., Whittock, N., Leigh, I.M., Stevens, H.P., Kelsell, D.P., 2000. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Gen*, 9(18), pp.2761-6.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), pp.247-57.
- Olivares, G.R., Moran, S., Palacios, M., Apablaza, E., Godoy, I., Zalaquett, R., Ocaranza, M.P., 2012. Ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas. Técnica quirúrgica. *Rev Chil Cir*, 64, pp. 15-18.
- Ortega, A., Tarazón, E., Roselló-Lletí, E., Gil-Cayuela, C., Lago, F., González-Juanatey, J.R., Cinca, J., Jorge, E., Martínez-Dolz, L., Portolés, M., Rivera, M., 2015. 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*, 10(12), p.e0145518.
- Packer, M., 1992. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 20(1), pp.248-54.
- Pedrosa, E., Stefanescu, R., Margolis, B., Petruolo, O., Lo, Y., Nolan, K., Novak, T., Stopkova, P. y Lachman, H.M., 2008. Analysis of protocadherin alpha gene enhancer polymorphism in bipolar disorder and schizophrenia. *Schizophr Res*, 102(1-3), pp.210-9.
- de Pereda, J.M., Lillo, M.P. y Sonnenberg, A., 2009. Structural basis of the interaction between integrin $\alpha6\beta4$ and plectin at the hemidesmosomes. *EMBO J*, 28(8), pp.1180-1190.

- Perez-Moreno, M. y Fuchs, E., 2006. Catenins: Keeping Cells from Getting Their Signals Crossed. *Dev Cell*, 11(5), pp.601-612.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal biochem*, 83(2), pp.346-56.
- Pfister, R., Acksteiner, C., Baumgarth, J., Burst, V., Geissler, H.J., Margulies, K.B., Houser, S., Bloch, W., Flesch, M., 2007. Loss of β 1D-integrin function in human ischemic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, 102(3), pp.257-264.
- Pinali, C., Bennett, H.J., Davenport, J.B., Caldwell, J.L., Starborg, T., Trafford, A.W. y Kitmitto, A., 2015. Three-Dimensional Structure of the Intercalated Disc Reveals Plicate Domain and Gap Junction Remodeling in Heart Failure. *Biophys J*, 108(3), pp.498-507.
- Poelzing, S. y Rosenbaum, D.S., 2004. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(4), H1762-70.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G., Coats, A.J., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., van der Meer, P; Authors/Task Force Members, 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*, 37(27), pp.2129-2200.
- Portolés, M., Faura, M., Renau-Piqueras, J., Iborra, F.J., Saez, R., Guerri, C., Serratos, J., Rius, E. y Bachs, O., 1994. Nuclear calmodulin/62 kDa calmodulin-binding protein complexes in interphasic and mitotic cells. *J Cell Sci*, pp.3601-14.
- Purves, W. Life: the science of biology. 7ª edición. Sinauer Associates. 2004.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I., Nordet, P., 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies.

Circulation, 93(5), pp.841-2.

Rivera, M., Taléns-Visconti, R., Sirera, R., Bertomeu, V., Salvador, A., Cortés, R., García de Burgos, F., Climent, V., Payá, R., Martínez-Dolz, L., Sancho-Tello, M.J. y González-Molina, A., 2004. Soluble TNF- α and interleukin-6 receptors in the urine of heart failure patients. Their clinical value and relationship with plasma levels. *Eur J Heart Fail*, 6(7), pp.877-882.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J. y Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), pp.139-40.

Rodríguez-Artalejo, F., Guallar-Castillón, P., Banegas Banegas, J.R. y del Rey Calero, J., 1997. Trends in hospitalization and mortality for heart failure in Spain, 1980-1993. *Eur Heart J*, 18(18), pp.1771-9.

Rodríguez-Artalejo, F., Banegas Banegas, J.R. y Guallar-Castillón, P., 2004. Avances en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (I) Epidemiología de la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*, 57(2), pp.163-70.

Roger, V.L., 2013. Epidemiology of heart failure. *Circ Res*, 113(6), pp.646-59.

Roselló-Lletí, E., Tarazón, E., Barderas, M.G., Ortega, A., Otero, M., Molina-Navarro, M.M., Lago, F., González-Juanatey, J.R., Salvador, A., Portolés, M. y Rivera, M., 2014. Heart mitochondrial proteome study elucidates changes in cardiac energy metabolism and antioxidant PRDX3 in human dilated cardiomyopathy. *PLoS ONE*, 9(11), p.e112971.

Ruiz-Romero, V., Lorusso, N., Exposito, S., Paez-Pinto, J.M., Palmero-Palmero, C., Caballero-Delgado, G., Zapico, M.J. y Fernandez-Moyano, A., et al., 2016. Avoidable Hospital Admissions for Heart Failure, Spain. *Rev Esp Salud Publ*, 90, p.e1-11.

Sánchez-Lázaro, I.J., Almenar, L., Reganon, E., Vila, V., Martínez-Dolz, L., Martínez-Sales, V., Moro, J., Agüero, J., Ortiz-Martínez, V. y Salvador, A., 2008. Inflammatory markers in stable heart failure and their relationship with functional

class. *Int J Cardiol*, 129(3), pp.388-93.

dos Santos, D.O., Blefari, V., Prado, F.P., Silva, C.A., Fazan, R., Salgado, H.C., Ramos, S.G. y Prado, C.M., 2016. Reduced expression of adherens and gap junction proteins can have a fundamental role in the development of heart failure following cardiac hypertrophy in rats. *Exp Mol Pathol*, 100(1), pp.167-176.

Sayago-Silva, I.S., García-López, F. y Segovia-Cubero, J., 2013. Epidemiología de la enfermedad cardiovascular en España en los últimos 20 años. *Rev Esp Cardiol*, 66 pp. 649-56.

Schaapveld, R.Q., Borradori, L., Geerts, D., van Leusden, M.R., Kuikman, .I, Nievers, M.G., Niessen, C.M., Steenbergen, R.D., Snijders, P.J. y Sonnenberg, A., 1998. Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol*, 142(1), pp.271-84.

Schäfer, R., Abraham, D., Paulus, P., Blumer, R., Grimm, M., Wojta, J. y Aharinejad, S., 2003. Impaired VE-cadherin/beta-catenin expression mediates endothelial cell degeneration in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 108(13), pp. 1585-91.

Schaper, J., Froede, R., Hein, S., Buck, A., Hashizume, H., Speiser, B., Friedl, A., Bleese, N., 1991. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 83(2), pp.504-14.

Schechter, M.A., Hsieh, M.K., Njoroge, L.W., Thompson, J.W., Soderblom, E.J., Feger, B.J., Troupes, C.D., Hershberger, K.A., Ilkayeva, O.R., Nagel, W.L., Landinez, G.P., Shah, K.M., Burns, V.A., Santacruz, L., Hirschey, M.D., Foster, M.W., Milano, C.A., Moseley, M.A., Piacentino, V. y Bowles, D.E., 2014. Phosphoproteomic Profiling of Human Myocardial Tissues Distinguishes Ischemic from Non-Ischemic End Stage Heart Failure. *PLoS ONE*, 9(8), p.e104157.

Schuleri, K.H., Boyle, A.J., Centola, M., Amado, L.C., Evers, R., Zimmet, J.M., Evers, K.S., Ostbye, K.M., Scorpio, D.G., Hare, J.M. y Lardo, A.C, 2008. The adult Göttingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction:

- focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies. *Comp Med*, 58(6), pp.568-79.
- Segovia Cubero, J., Alonso-Pulpón, L., Pereira, R. y Silva, L., 2004. Etiología y evaluación diagnóstica en la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*, 57(3), pp.250-259.
- Seltmann, K., Roth, W., Kröger, C., Loschke, F., Lederer, M., Hüttelmaier, S. y Magin, T.M., 2013. Keratins Mediate Localization of Hemidesmosomes and Repress Cell Motility. *J Invest Dermatol*, 133(1), pp.181-190.
- Selye, H., Bajusz, E., Grasso, S. y Mendell, P., 1960. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, 11, pp.398-407.
- Severs, N.J., Coppén, S.R., Dupont, E., Yeh, H.I., Ko, Y.S. y Matsushita, T., 2004. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res*, 62(2), pp. 368-77.
- Shapiro, L. y Colman, D.R., 1999. The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron*, 23(3), pp.427-30.
- Solís, C., Barrero, S.C., García, A.S., Ojeda M.A., 2005. Índice de Barthel (IB): Un instrumento esencial para la evaluación funcional y la rehabilitación. *Plast Rest Neurol*, 4, pp.81-85.
- Soltysinska, E., Olesen, S.P., Christ, T., Wettwer, E., Varró, A., Grunnet, M., Jespersen, T., 2009. Transmural expression of ion channels and transporters in human nondiseased and end-stage failing hearts. *Pflugers Arch*, 459(1), pp.11-23.
- Springer, T.A., 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76(2), pp.301-14.
- Sutor, B. y Hagerty, T., 2005. Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochim Biophys Acta*, 1719(1-2), pp.59-68.
- Suzuki, Y., Yeung, A.C. y Ikeno, F., 2011. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotech*, 2011, p.195483.

- Swedberg, K., Cleland, J., Dargie, H., Drexler, H., Follath, F., Komajda, M., Tavazzi, L., Smiseth, O.A., Gavazzi, A., Haverich, A., Hoes, A., Jaarsma, T., Korewicki, J., Lévy, S., Linde, C., López-Sendón, J.L., Nieminen, M.S., Piérard, L., Remme, W.J.; Grupo de Trabajo de Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Cardíaca Crónica de la Sociedad Europea de Cardiología; Comité de la ESC para la elaboración de las Guías de Práctica Clínica, 2005. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure: executive summary (update 2005). *Rev Esp Cardiol*, 58(9), pp.1062-92.
- Takeda, Y., Kazarov, A.R., Butterfield, C.E., Hopkins, B.D., Benjamin, L.E., Kaipainen, A. y Hemler, M.E., 2007. Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood*, 109(4), pp.1524-32.
- Takeichi, M., 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251(5000), pp.1451-5.
- Takeichi, M., 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4), pp.639-55.
- Tanai, E. y Frantz, S., 2015. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol*, 6(1), pp. 187-214.
- Tavazzi, L., 2001. Towards a more precise definition of heart failure aetiology. *Eur Heart J*, 22(3), pp.192-5.
- Terry, S., Maillé, P., Baaddi, H., Kheuang, L., Soyeux, P., Nicolaiew, N., Ceraline, J., Firlej, V., Beltran, H., Allory, Y., de la Taille, A., Vacherot, F., 2013. Cross modulation between the androgen receptor axis and protocadherin-PC in mediating neuroendocrine transdifferentiation and therapeutic resistance of prostate cancer. *Neoplasia*, 15(7), pp.761-72.
- Theroux, P., Franklin, D., Ross, J. Jr., Kemper, W.S., 1974. Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog. *Circ Res*, 35(6), pp.896-908.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from

- polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Ac Sci U S A*, 76(9), pp.4350-4.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. y Pachter, L., 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 28(5), pp.511-5.
- Verheule, S. y Kaese, S., 2013. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. *Front Pharmacol*, 4, p.81.
- Vite, A. y Radice, G.L., 2014. N-Cadherin/Catenin Complex as a Master Regulator of Intercalated Disc Function. *Cell Comm Adhes*, 21(3), pp.169-179.
- Vivaldi, M.T., Kloner, R.A. y Schoen, F.J., 1985. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol*, 121(3), pp.522-30.
- Walko, G., Castañón, M.J. y Wiche, G., 2015. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res*, 360(3), pp.529-44.
- Walsh, F.S. y Doherty, P., 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance. *An Rev Cell Dev Biol*, 13(1), pp.425-56.
- Wang, X. y Gerdes, A.M., 1999. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 31(2), pp.333-43.
- Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev Gen*, 10(1), pp.57-63.
- Willerson, J.T. y Ridker, P.M., 2004. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*, 109(21 Suppl 1), p.II2-10.
- Winters, A.L. y Minchin, F.R., 2005. Modification of the Lowry assay to measure

- proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem*, 346(1), pp.43-48.
- Yagi, T. y Takeichi, M., 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Gen Dev*, 14(10), pp.1169-80.
- Yamada, K.A., Rogers, J.G., Sundset, R., Steinberg, T.H. y Saffitz, J., 2003. Up-regulation of connexin45 in heart failure. *J Cardiovasc Electrophys*, 14(11), pp.1205-12.
- Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E. Jr, Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., Januzzi, J.L., Johnson, M.R., Kasper, E.K., Levy, W.C., Masoudi, F.A., McBride, P.E., McMurray, J.J., Mitchell, J.E., Peterson, P.N., Riegel, B., Sam, F., Stevenson, L.W., Tang, W.H., Tsai, E.J. y Wilkoff, B.L., 2013. 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*, 62(16), pp.e147-239.
- Yang, Z., Bowles, N.E., Scherer, S.E., Taylor, M.D., Kearney, D.L., Ge, S., Nadvoretzkiy, V.V., DeFreitas, G., Carabello, B., Brandon, L.I., Godsel, L.M., Green, K.J., Saffitz, J.E., Li, H., Danieli, G.A., Calkins, H., Marcus, F. y Towbin, J.A., 2006. Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Res*, 99(6), pp.646-55.
- Yap, A.S., Brieher, W.M. y Gumbiner, B.M., 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *An Rev Cell Dev Biol*, 13(1), pp.119-146.
- Ye, J., Yang, L., Sethi, R., Copps, J., Ramjiawan, B. y Summers, R., 1997. A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. *Mol Cell Biochem.*, 176(1-2), pp.227-33.
- Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A. y Egido, J., 2011. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*, 2011, p.497841.

- Zemljic-Harpf, A.E., Miller, J.C., Henderson, S.A., Wright, A.T., Manso, A.M., Elsherif, L., Dalton, N.D., Thor, A.K., Perkins, G.A., McCulloch, A.D. y Ross, R.S., 2007. Cardiac-Myocyte-Specific Excision of the Vinculin Gene Disrupts Cellular Junctions, Causing Sudden Death or Dilated Cardiomyopathy. *Mol Cell Biol*, 27(21), pp.7522-37.
- Zhang, Z., Stroud, M.J., Zhang, J., Fang, X., Ouyang, K., Kimura, K., Mu, Y., Dalton, N.D., Gu, Y., Bradford, W.H., Peterson, K.L., Cheng, H., Zhou, X., Chen, J., 2015. Normalization of Naxos plakoglobin levels restores cardiac function in mice. *J Clin Invest*, 125(4), pp.1708-12.
- Zhao, Q., Zeng, F., Liu, J.B., He, Y., Li, B., Jiang, Z.F., Wu, T.G., Wang, L.X., 2013. Upregulation of β -Adrenergic Receptor Expression in the Atrium of Rats With Chronic Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol Therap*, 18(2), pp.133-37.