

Departament de Farmacologia
Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**Papel de eNOS, nNOS y NT-3 en patología
cardiovascular y angiogénesis**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Diana Vicente Miralles

Valencia, 2013



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia

Pilar D'Ocon Navaza, Catedrática de Farmacología de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada: **“Papel de eNOS, nNOS y NT-3 en patología cardiovascular y angiogénesis”**, realizada por la Licenciada en Farmacia **Diana Vicente Miralles**, ha sido llevada a cabo en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València, bajo mi dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizo su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Valencia, 2013

Dña. Pilar D'Ocon Navaza

“Si te lo propones en serio puedes conseguir todo lo que te propongas sin agotarte ni agobiarte demasiado”

“El verdadero éxito se alcanza cuando estás segura de ti misma”

“Tú puedes, claro que puedes, eres tenaz”

“Cree en ti”

“Disfrutando del camino, la carrera hacia la meta será más fácil”

“No pienses en lo que te queda para mañana, piensa en lo que puedes adelantar hoy”

La vida está llena de pequeñas carreras cuyas metas debemos ir alcanzando, algunas cuestan más, otras un poquito menos, pero el factor común para superar cada una de ellas, es la ilusión de ver que se puede. Y tú te declaras ganador cada vez que cruzas la meta y, mientras estas cruzándola, ya estas pensando en cual será tu siguiente objetivo, tu siguiente carrera. Los objetivos se consiguen, y las carreras se superan.

Una puede correr sola hacia su objetivo pero si se rodea de gente que le da pequeños empujoncitos, terminará la carrera orgullosa de ella y contenta de tener a su alrededor gente que quiere compartir el éxito junto a ella.

Hoy termina una carrera que empecé hace 6 años. La carrera comenzó sin saber como iba a ser el recorrido, sin conocer los tramos más o menos fáciles, con la incertidumbre de saber si alguien me iba a empujar para hacerla más fácil, pero con la ilusión y convicción de saber que, seguro seguro, iba a llegar a la meta. Tras estos 6 años, la carrera la he terminado, no sé si tendré medalla, pero me llevo el premio de haberme convertido en mejor investigadora, mejor persona y de saber que a mi alrededor tengo a gente que corre conmigo, que me empuja hacia la meta ignorantes o no del que es mi objetivo, la Tesis Doctoral.

Para superar esta carrera, mi “familia investigadora” ha sido parte imprescindible. Es un orgullo para mí haber tenido como directora de tesis a Pilar, gracias por ayudarme a iniciar la carrera, hacerme el recorrido más fácil y por darme el último empujón para terminarla. A Loles y Marian, por sus consejos, su ayuda y su comprensión. A Domingo y Fran por su ayuda y disponibilidad. Y, por supuesto a mis compis de laboratorio. A mi costilla Lit, por esas confesiones, esas fiestas, esos momentazos. Al “meu germanet” Fermí, por su hospitalidad y su optimismo. A Rosa, por hacerme ver que la vida es de colores. A Vanessa por confiar en mí y ser mi amiga tantos años. A Edu y Miguel por ayudarme cada vez que lo he necesitado, a su amistad y profesionalidad. A Nicla por ser un ejemplo de humanidad y a Cris por sus ganas de luchar. Al resto de compis de “Inflamación” por esas fiestas y el compañerismo que demostráis, los que estuvieron Nuria, Javier, Maria, Isabel G, Anna, y los que continúan Julia, Rita, Jorge, Victor, Carmen, y a sus profesores Marisa, Carmen M,

Isabel G, M.Carmen T, gracias por dejarme ser una más de vuestros grupos y por abrirme siempre los brazos para todo. Gracias a Miguel P por luchar contra viento y marea para que me concedieran la beca. A Mamen, Raquel, Irene, Carlos y Ángel por toda su ayuda. A Isabel F y Ana D por dejarme colaborar con ellas. A Mercedes S y a todo su grupo por hacerme la estancia en Madrid tan cómoda y por enseñarme un poquito más de investigación. Finalmente a Nuria, por resolverme todos los problemas informáticos pidiéndome sólo a cambio un “parte”.

Palabras de un profundo agradecimiento para mi familia y mi gente de toda la vida. A mis padres Vicente y Divi, por enseñarme a tener espíritu de superación, por valorarme, por quererme y por apoyarme en cada paso que doy en mi vida. A mi hermana Bea, Alberto y Ariadna, por ser mis amigos y mi aliento para continuar. A Luis, por su paciencia y por todo lo que sabes. A mis fieles amigas Maria D, Marta e Inma por escribirme, sufrirme, animarme, achucharme, escucharme, regañarme y demás, siempre con la finalidad de hacerme el camino más fácil. Y, finalmente a todos mis amigos valencianos y almedijanos por estar ahí.

Gracias a todos por empujarme, gracias por animarme, gracias por ayudarme a conseguir mis objetivos y, en definitiva, gracias por hacerme feliz.

Diana

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de las siguientes ayudas:

PROYECTOS:

- ❖ *“Diferencias en función del género en la expresión y funcionalidad de adrenoceptores y GRKs en patología cardiovascular”*
Financiado por el Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (PI070509)

- ❖ *“Diferencias en la expresión y funcionalidad de eNOS y nNOS en patología cardiovascular”* Ayudas para grupos Generalitat Valenciana (GVACOMP2009/261)

BECAS

- ❖ Beca pre-doctoral del programa nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (AP-2008-02765)

Los trabajos publicados durante el desarrollo de la Tesis Doctoral han sido:

- ❖ Agüero J, Almenar L, D'Ocon P, Oliver E, Montó F, Rueda J, **Vicente D**, Martínez-Dolz L, Salvador A. (2009) "Myocardial and peripheral lymphocytic transcriptomic dissociation of beta-adrenoceptors and G protein-coupled receptor kinases in heart transplantation" *Heart Lung Transplant*. 28(11):1166-1171
- ❖ Agüero J, Almenar L, Montó F, Oliver E, Sánchez-Lázaro I, **Vicente D**, Martínez-Dolz L, D'Ocon P, Rueda J, Salvador A. (2012) "Myocardial G protein receptor-coupled kinase expression correlates with functional parameters and clinical severity in advanced heart failure" *J Card Fail*. 18(1):53-61
- ❖ Montó F, Oliver E, **Vicente D**, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Baretino D, D'Ocon P (2012) "Changes in GRKs, α 1 and β -adrenoceptors depend on the ethiology of heart failure and correlates to clinical variables" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 303(3):H368-76
- ❖ **Vicente D**, Montó F, Oliver E, Buendía F, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Baretino D, D'Ocon P (2013) "Myocardial and lymphocytic expression of eNOS and nNOS before and after heart transplantation: relationship to clinical status" *Life Sci*. 93(2-3):108-15
- ❖ Delgado AC, Ferron SR, **Vicente D**, Porlan E, Pérez-Villalba A, Trujillo MC, D'Ocon P, Fariñas I (2013) "Vascular neurotrophin-3 supports long-term maintenance of neural stem cells by NO induction" *Nature* (en revisión)

ABREVIATURAS

A-	Ausencia de adventicia
A+	Presencia de adventicia
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Akt	Proteína serina/treonina quinasa
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Adrenoceptores
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BAECs	Células endoteliales de aorta bovina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca	Calcio
CaM	Calmodulina
CAM	Membrana corioalantoidea
CaM-KIIα	Proteína quinasa dependiente del complejo calcio-CaM
CcO	Citocromo <i>c</i> oxidasa
CCR	Curva concentración-respuesta
CE	Células endoteliales

CI	Cardiopatía isquémica
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
cNOS	Sintasa de óxido nítrico constitutiva
CPAECs	Células endoteliales de arteria pulmonar de ternero
Ct	Ciclo umbral
CVECs	Células endoteliales venulares coronarias
DAG	Diacilglicerol
DBVd	Diámetro basal del Vd
DEPC	Dietilpirocarbonato
DETA-NO	Dietilentriamina /aducto de NO
DGXI	Dirección General del Medio Ambiente
DMECs	Células endoteliales microvasculares dérmicas
DMEM / F12	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> con Factor 12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMVd	Diámetro medio del Vd
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
DTdVi	Diámetro tele-diastólico del Vi
DTsVi	Diámetro tele-sistólico del Vi
DVi	Diámetro del Vi
E-	Ausencia de endotelio
E+	Presencia de endotelio
EBM-MV2	<i>Endothelial cell basal medium</i> MV2
EC₅₀	Concentración molar del agonista necesaria para producir el 50 % del efecto máximo
EDRF	Factor relajante dependiente de endotelio

EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
e.e.m. (S.E.M.)	Error estándar de la media (<i>Standard error of the mean</i>)
E_{máx}	Efecto máximo
eNOS / NOS 3	NOS endotelial
EPCs	Células progenitoras endoteliales
ERK	Quinasa de respuesta extracelular
FAD	Flavinadenina dinucleótido
FC	Factores de crecimiento
FCS	Suero bovino fetal
Fe	(R)-(-) fenilefrina hidrocloreuro
FEVd	Fracción de eyección del Vd
FEVi	Fracción de eyección del Vi
FMN	Flavin mononucleótido
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GC	Gasto cardíaco
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GOT	Transaminasa glutámico oxalacética
GPT	Transaminasa glutámico pirúvica
GRK	Quinasa acoplada a proteína G
hbFGF	bFGF humano
hEGF	Factor de crecimiento epidérmico humano
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos

HIF	Factor inducido por hipoxia
HP	Hipertensión pulmonar (PAP > 35 mmHg)
HPCs	Células progenitoras hematopoyéticas
HSCs	Células madre hematopoyéticas
Hsp90	Proteína de choque térmico
HTA	Hipertensión arterial
HUVECs	Células endoteliales de cordón umbilical humano
hVEGF	VEGF humano
IC	Insuficiencia cardiaca
IECAs	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IgG	Inmunoglobulina G
IMC	Índice de masa corporal
iNOS / NOS 2	NOS inducible
IOD	Proteína inmunodetectable
IP	Insuficiencia pulmonar
IP3	Inositol trifosfato
JNK	Quinasa N-terminal de c-Jun
L	Lavados
L-NAME	N _ω -nitro-L-arginina metil éster
MAPA	Monitorización Ambulatoria de Presión Arterial
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MB	Medio basal (EBM-MV2 adicionado con FCS)
MCD	Miocardiopatía dilatada
MMP	Metaloproteinasa de matriz

mNOS	NOS mitocondrial
MPCs	Células progenitoras musculares
MS	Muerte súbita
MSCs	Células madre mesenquimales
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NHP	Ausencia de hipertensión pulmonar (PAP < 35 mmHg)
nNOS / NOS 1	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
NT	Neurotrofina
NTG	Nitroglicerina
NT-proBNP	Precursor amino terminal del péptido natriurético tipo B
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OA-NOS	NOS Osteoartrítica
O₂⁻	Anión superóxido
ODQ	1H [1,2,4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalín-1-one
P	Coefficiente de Pearson
P75^{NTR}	Receptor de NT p75
PA	Presión arterial
PAd	Presión de la aurícula derecha
PAD	Presión arterial diastólica
PAPd	Presión arterial pulmonar diastólica

PAPm	Presión arterial pulmonar media
PAPs	Presión arterial pulmonar sistólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS adicionado con <i>Tween 20</i>
PCP	Presión capilar pulmonar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-ECGF	Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas
pEC₅₀	-log de EC ₅₀
PGE2	Prostaglandina E2
PHD2	Enzima prolilhidroxilasa
PI3K	Quinasa de fosfoinositida 3
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PKA	Proteín quinasa dependiente de AMPc
PKB	Proteín quinasa tipo B
PKC	Proteín quinasa tipo C
PKG	Proteín quinasa tipo G
PLC	Fosfolipasa C
PM	Peso molecular
PTdVd	Presión tele-diastólica del Vd
PTsVd	Presión tele-sistólica del Vd
PVDF	Fluoruro de polivinildieno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
r	Coefficiente de correlación

R3IGF-1	Factor de crecimiento dependiente de insulina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RQI	Indicador de la calidad del RNA
RT	Transcripción reversa
RVP	Resistencia vascular pulmonar
RyR	Receptor para la rianodina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SMTC	S-metil-L-citrulina
SNAG	S-nitroso-N-acetil glutatión
SNAP	S-nitroso-N-acetil penicilamina
TC	Trasplante cardiaco
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TrK	Receptor de tirosín quinasa
TVCP	Taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica
Vd	Ventrículo derecho
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Vi	Ventrículo izquierdo

ÍNDICE

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	17
1.1 Hipertensión arterial (HTA)	17
1.2 Insuficiencia cardiaca (IC)	19
1.3 Insuficiencia pulmonar (IP)	22
1.4 Muerte súbita (MS)	23
2. ANGIOGÉNESIS.....	24
2.1 Definición.....	24
2.2 Estructura de los vasos sanguíneos	25
2.3 Etapas de la angiogénesis.....	26
3. ÓXIDO NÍTRICO	29
3.1 Historia del NO	29
3.2 Biosíntesis del NO.....	30
3.3 Características de las isoformas de la NOS.....	32
3.4 Actividad de NOS.....	35
3.5 Óxido nítrico y angiogénesis.....	38
3.6 Óxido nítrico y enfermedades cardiovasculares	42
4. NEUROTROFINA-3	49
4.1 Historia de las neurotrofinas	49
4.2 Biosíntesis de neurotrofinas.....	50
4.3 Características de los receptores para neurotrofina-3.....	51
4.4 Actividad de neurotrofina-3	52
4.5 Neurotrofina-3 y enfermedades cardiovasculares	53
OBJETIVOS	57

MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. MODELOS ANIMALES	63
1.1 Animales de experimentación	63
1.1.1 Ratas control (Wistar)	63
1.1.2 Ratas espontáneamente hipertensas (SHR).....	63
1.1.3 Ratas con síndrome metabólico (Zucker)	64
1.2 Sacrificio y obtención de muestras.....	64
2. MODELOS HUMANOS	65
2.1 Población de estudio y criterios de inclusión	65
2.2 Obtención de muestras biológicas	68
2.2.1 Miocardio humano.....	68
2.2.2 Linfocitos humanos	68
3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (RT-PCR A TIEMPO REAL)	69
3.1 Extracción y análisis cualitativo/cuantitativo del ARN total	70
3.2 Transcripción reversa (RT) – Síntesis de ADNc	71
3.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)	71
3.4 Análisis de los resultados.....	74
4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA (WESTERN BLOT).....	74
4.1 Extracción y cuantificación del contenido proteico.....	75
4.2 Inmunodetección de proteínas (Western Blot).....	75
4.3 Análisis de los resultados.....	77
5. ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR (ÓRGANO AISLADO)	77
5.1 Fármacos utilizados	78
5.2 Montaje del tejido	78
5.3 Protocolos experimentales.....	79
5.3.1 Meseta de contracción con KCl (80 mM)	79

5.3.2	Determinación de la presencia de endotelio vascular	79
5.3.3	Curvas concentración-respuesta de determinación de concentraciones de L-NAME y SMTC	80
5.3.4	Curvas concentración-respuesta de determinación de concentraciones de DETA-NO y Nitroglicerina	81
5.4	Análisis de los resultados.....	83
6.	ANGIOGÉNESIS.....	83
6.1	Fármacos utilizados	84
6.2	Protocolos experimentales.....	84
6.2.1	Protocolo general de estimulación	84
6.2.2	Eliminación de capa endotelial y adventicia	85
6.2.3	Formación de anillos quiescentes	86
6.2.4	Cambios en la expresión génica durante el crecimiento angiogénico	87
6.2.5	Adquisición y análisis de imágenes	88
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
	RESULTADOS.....	91
	NOS y NT-3 en la enfermedad cardiovascular humana.....	93
1.	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	93
1.1	Hipertensión arterial (HTA)	94
1.2	Insuficiencia cardiaca (IC)	95
1.3	Trasplante cardiaco (TC).....	97
1.4	Insuficiencia pulmonar (IP).....	98
1.5	Muerte súbita (MS)	99

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE eNOS, nNOS, NT-3 y TrkC EN MIOCARDIO Y LINFOCITOS HUMANOS.....	99
2.1 Cambios de la expresión en patologías cardiovasculares	99
2.1.1 Expresión de eNOS.....	99
2.1.2 Expresión de nNOS.....	103
2.1.3 Expresión de NT-3	105
2.1.4 Expresión de TrkC.....	109
2.2 Cambios en la expresión génica en función del tratamiento farmacológico	110
2.2.1 Miocardio	111
2.2.2 Linfocitos circulantes	112
3. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTOS GENES EXPRESADOS EN UN MISMO TERRITORIO	113
3.1 Ventrículo izquierdo	113
3.2 Ventrículo derecho	115
3.3 Linfocitos circulantes.....	116
3.4 Días postrasplante	118
4. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS CARACTERÍSTICAS DE CADA PATOLOGÍA	119
4.1 Correlación con variables antropométricas	119
4.2 Correlaciones con variables clínicas	120
4.2.1 Hipertensión arterial (HTA).....	120
4.2.2 Insuficiencia cardiaca (IC).....	120
4.2.3 Trasplante cardiaco (TC)	127
4.2.4 Insuficiencia pulmonar (IP)	127

NOS Y NT-3 en angiogénesis 128

1. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE ANGIOGÉNESIS128

 1.1 Medio de cultivo y factores de crecimiento128

 1.2 Seguimiento del crecimiento de nuevos vasos129

 1.3 Determinación de la capacidad angiogénica de distintos vasos132

 1.4 Influencia de las capas endotelial y adventicia132

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE eNOS, nNOS Y NT-3 DURANTE EL PROCESO ANGIOGÉNICO136

3. MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS POR EL ÓXIDO NÍTRICO (NO).....142

 3.1 Determinación del rango de concentración de los inhibidores de NOS y donadores de NO142

 3.1.1 Determinación de la concentración de SMTC.....143

 3.1.2 Determinación de las concentraciones de DETA-NO y Nitroglicerina145

 3.2 Efecto del L-NAME y SMTC en la angiogénesis.....146

 3.3 Efecto de DETA-NO y Nitroglicerina en la angiogénesis.....148

 3.4 Angiogénesis y NO en modelos animales con patologías cardiovasculares153

DISCUSIÓN..... 155

1. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE NOS Y NT-3 EN PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES157

 1.1 Expresión en miocardio y su significación fisiopatológica.....157

 1.1.1 Cambios en la expresión génica y proteica157

 1.1.2 Correlación entre distintos genes160

 1.1.3 Relevancia clínica de la expresión de eNOS, nNOS y NT-3 en miocardio de pacientes insuficientes y trasplantados.....162

 1.1.4 Corazón trasplantado y reinervación cardiaca.....168

Índice

1.2	Expresión en linfocitos circulantes y su significación fisiopatológica.....	171
1.2.1	Cambios en la expresión genética	171
1.2.2	Transcendencia fisiopatológica de los cambios observados en linfocitos.....	175
2.	ANGIOGÉNESIS.....	176
2.1	Puesta a punto de la técnica	176
2.2	Implicación de las capas vasculares en angiogénesis.....	178
2.3	Angiogénesis y expresión de eNOS, nNOS y NT-3	179
2.4	Angiogénesis, enfermedades cardiovasculares y NO	181
	CONCLUSIONES.....	187
	RESUMEN	191
	BIBLIOGRAFIA	197

Revisión bibliográfica

1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

1.1 Hipertensión arterial (HTA)

La hipertensión arterial (HTA) es un importante factor de riesgo cardiovascular que afecta al 30 – 45% de la población europea según la Sociedad Española de Cardiología, y constituye uno de los motivos de consulta más comunes en las sociedades civilizadas.

Aunque la HTA se conoce desde hace más de 100 años, todavía se debate qué niveles de presión arterial deben ser considerados “normales”. Esto se debe a que la presión arterial es una variable cuantitativa continua sin un determinado valor que permita separar a la población normal de la hipertensa. Actualmente, la HTA se define, por consenso, como la elevación crónica y anormal de los niveles de presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) por encima de los 140/90 mmHg respectivamente. Este problema cardiovascular tiene un origen multifactorial que se caracteriza por la disfunción de los mecanismos vasculares, cardiogénicos, renales, neurogénicos y endocrinos encargados de regular la PA, lo que conduce a la elevación crónica de las cifras de tensión arterial por encima de los límites considerados normales (Kaplan, 2005). La mayor importancia de esta enfermedad viene dada por el riesgo asociado de enfermedad cardiovascular. Tanto la PAS como la PAD muestran una estrecha relación con la insuficiencia cardíaca, la arteriopatía periférica y la nefropatía terminal, y, por tanto, la HTA se considera un factor de riesgo cardiovascular de gran relevancia.

- Etiología

A pesar del elevado número de posibles etiologías de la HTA, en más del 95% de los pacientes hipertensos no se descubre ninguna causa responsable de la elevación de la PA, por lo que cuando aparece se le denomina HTA esencial, HTA primaria o de etiología desconocida. Existen múltiples causas responsables de la PA en el 5% restante de los pacientes (HTA secundaria), entre las que se encuentran causas renales (glomerulonefritis), endocrinas, neurógenas, por interferencias mecánicas con el flujo y diversos agentes exógenos como venenos, fármacos y regaliz.

- Clasificación

Existen numerosos criterios a tener en cuenta para clasificar la HTA. La clasificación más reciente fue propuesta por el “Grupo de trabajo para el manejo de la HTA” (Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología) en su guía publicada en 2007. Este grupo clasifica los valores de PA en 7 niveles diferentes (Mancia y cols., 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los niveles de presión arterial (PA) (mmHg) (Mancia y cols., 2007)

Categoría	PAS	PAD
Óptima	< 120	< 80
Normal	120 – 129	80 – 84
Límite alto de normalidad	130 – 139	85 – 89
HTA Grado 1 (Leve)	140 – 159	90 – 99
HTA Grado 2 (Moderada)	160 – 179	100 – 109
HTA Grado 3 (Grave)	≥ 180	≥ 110
HTA sistólica aislada	≥ 140	< 90

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; HTA, hipertensión arterial. Tabla extraída y modificada de la “Guía para el manejo de la HTA”.

1.2 Insuficiencia cardiaca (IC)

La insuficiencia cardiaca (IC) se define como la situación que se da cuando el corazón es incapaz de mantener una perfusión adecuada a las necesidades metabólicas tisulares y/o cuando para mantenerla se necesita una elevación de la presión de llenado ventricular por encima de los niveles normales. Es un síndrome clínico que, aunque puede tener múltiples etiologías, presenta una base fisiopatológica común. Puede desencadenarse por diferentes mecanismos, siempre que se produzca una disminución del gasto cardíaco, tanto por una disminución extrema de la frecuencia cardiaca y/o disminución del volumen sistólico. Pero aun cuando el gasto cardiaco sea normal, o incluso elevado, puede producirse una IC si el incremento en la demanda metabólica de los tejidos es de tal cuantía que el corazón es incapaz de superarlo.

En la presente tesis se ha trabajado con pacientes cuya etiología de la IC cursa con alteraciones de la contractilidad. Concretamente los mecanismos implicados son la cardiopatía isquémica y la miocardiopatía dilatada. En el caso de la cardiopatía isquémica, en las zonas isquémicas o necrosadas existe una alteración localizada de la contractilidad miocárdica. En cuanto a la miocardiopatía dilatada, ésta cursa con una disminución difusa de la contractilidad miocárdica que da lugar a una incapacidad para aumentar el volumen sistólico o, en fases avanzadas, para mantenerlo en límites normales.

Existen diversos criterios para la clasificación de la IC. En función del curso de la enfermedad, la IC se puede clasificar en aguda o crónica. La IC aguda se desencadena en horas o días y sus causas se instauran de forma más o menos brusca sin permitir el desarrollo de mecanismos compensatorios a largo plazo, por lo que suele ser más grave que la IC crónica. En cambio, la IC crónica se desarrolla

gradualmente en el transcurso de meses o años y sus causas son de instauración paulatina.

Clínicamente, la IC puede clasificarse como compensada o descompensada. Si la IC se desarrolla lentamente se establecen mecanismos compensadores cardiovasculares, de modo que, si la demanda es limitada, pueden satisfacer inicialmente las necesidades del organismo y el sujeto no presenta manifestaciones clínicas aunque su reserva cardiaca esté disminuida. En este caso hablamos de IC compensada. En cambio, cuando ya no hay reserva cardiaca, bien porque se ha deteriorado una IC previamente compensada o porque ha aparecido una IC aguda, los mecanismos compensadores resultan ineficaces y aparecen manifestaciones clínicas. Se habla entonces de IC descompensada.

Según el criterio hemodinámico, la IC puede ser de alto o bajo gasto. La más frecuente es la IC con bajo gasto cardiaco. La anomalía fisiológica primaria en la IC de alto gasto es el incremento de las demandas circulatorias periféricas o una comunicación arteriovenosa que aumenta el retorno, en ambos casos la sobrecarga cardiaca se produce por el aumento del flujo de retorno. Entre las IC de alto gasto se incluyen las desencadenadas o debidas a anemia, fístulas arteriovenosas, beri-beri, hipertiroidismo, embarazo o enfermedad ósea de Paget.

Anatómicamente, la IC puede clasificarse en izquierda, derecha o global. La IC izquierda da lugar a congestión y edema pulmonares que causan disnea y ortopnea. Cuando falla el ventrículo derecho la congestión venosa es sistémica, sus manifestaciones más frecuentes son el edema periférico, la hepatomegalia y la ingurgitación yugular. Si se dan ambos tipos de manifestaciones se habla de IC global.

Según el criterio fisiopatológico, la IC puede ser anterógrada o retrógrada. Ambos tipos suelen coincidir en un mismo paciente. La IC anterógrada se produce como consecuencia de una disminución del volumen sistólico, y sus manifestaciones son debidas a la hipoperfusión tisular. Por el contrario, la IC retrógrada se produce por la dificultad en el llenado o vaciamiento ventricular y se manifiesta con una congestión pasiva de los tejidos.

Fisiológicamente, la IC puede ser sistólica o diastólica. Ya se ha visto que algunas de las causas de IC afectan sobretodo a la función sistólica, es decir, cursan con una disminución del volumen sistólico aunque el llenado diastólico sea normal; la IC sistólica constituye el prototipo de la anterógrada, pues sus manifestaciones dependen del déficit de bombeo de sangre a las arterias pulmonar y aorta. Por otro lado, un trastorno del llenado diastólico, sea por resistencia al flujo de entrada al ventrículo (estenosis de las válvulas auriculoventriculares), por disminución de la capacidad diastólica (enfermedades pericárdicas, cardiopatías restrictivas) o por disminución de la relajación ventricular (hipertrofias ventriculares, isquemia), origina una insuficiencia retrógrada por aumento de las presiones de llenado.

Finalmente, una de las clasificaciones más empleadas para definir la gravedad de la IC se basa en los síntomas y en la capacidad de realizar ejercicio o de poder soportar una actividad física más o menos normal, esta clasificación funcional es la clasificación que propone la Asociación del Corazón de Nueva York (*New York Heart Association*, NYHA), muy útil en la práctica clínica y utilizada de forma rutinaria en la mayoría de los ensayos clínicos de distribución aleatoria. Según este criterio, la IC puede clasificarse como:

- *Clase I:* sin limitación de la actividad física; el ejercicio normal no causa alteraciones.
- *Clase II:* ligera limitación de la actividad física, sin síntomas en reposo; la actividad física normal causa fatiga, palpitaciones o disnea.
- *Clase III:* acusada limitación de la actividad física, sin síntomas en reposo; cualquier actividad física provoca aparición de los síntomas.
- *Clase IV:* incapacidad de realizar actividad física; los síntomas están presentes incluso en reposo y aumentan con cualquier actividad física.

Esta última clasificación es la que se tendrá en cuenta en los resultados expuestos de la presente tesis.

1.3 Insuficiencia pulmonar (IP)

La insuficiencia pulmonar (IP) es una valvulopatía caracterizada por la incompetencia de la válvula pulmonar para evitar el reflujo sanguíneo desde la arteria pulmonar hacia el ventrículo derecho.

La causa más frecuente de IP es la dilatación del anillo valvular secundaria a hipertensión pulmonar de cualquier etiología. A diferencia de la estenosis pulmonar, la IP raramente es de origen congénito y puede manifestarse por una dilatación idiopática de la arteria pulmonar. También puede ser originada por una conectivopatía, como el síndrome de Marfan. La endocarditis infecciosa puede ocasionar IP aguda, sobre todo en personas adictas a drogas por vía intravenosa y constituye la segunda causa más prevalente tras la hipertensión pulmonar. Por otra parte, la IP y la dilatación ventricular derecha son complicaciones que se presentan a largo plazo entre los pacientes con cardiopatía congénita tipo Fallot (50 %) corregida quirúrgicamente, la cardiopatía cianótica más frecuente en la edad pediátrica, y estenosis pulmonares intervenidas (30 %) (Martínez-Quintana

y cols., 2008). Como ya se ha comentado, en la IP refluye la sangre durante la diástole hacia el ventrículo derecho a causa de la insuficiente oclusión valvular, la sobrecarga de volumen que supone este hecho cursa con dilatación e hipertrofia ventricular derecha. Otras causas menos frecuentes de IP corresponden a la afectación reumática, tuberculosis, traumatismo torácico y síndrome carcinoide (Pellikka y cols., 1993; Waller y cols., 1995; Moysakis y cols., 1997).

1.4 Muerte súbita (MS)

En la actualidad, no existe una definición universal para la muerte súbita (MS). Generalmente se define como una forma de muerte natural debida a causas cardíacas, inesperada en el tiempo y en su forma de presentación (Marrugat y cols., 1999). Los sujetos que la sufren no presentan ningún tipo de sintomatología previa.

Entre las principales causas de MS se encuentran la insuficiencia cardíaca isquémica (50-60%) y las miocardiopatías (30-40%). Se han realizado estudios donde se ha asociado esta patología con diversas mutaciones (Síndrome de QT largo) (Yoshida, 2009). Además, la MS también se ha visto asociada a la Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (TVCP), una cardiopatía hereditaria caracterizada por la aparición de taquicardia ventricular polimórfica durante el esfuerzo, las emociones o la perfusión de catecolaminas que puede cursar asintomática, con palpitaciones, síncope o MS (Priori y cols., 2002; Liu y cols., 2008). Pertenece a las llamadas enfermedades raras (prevalencia 1/10000) y es responsable de un porcentaje de MS que se producen en individuos jóvenes (<20 años) (van der Werf y Wilde, 2013).

2. ANGIOGÉNESIS

2.1 Definición

Existen tres mecanismos principales implicados en la formación y remodelado del sistema vascular: vasculogénesis, angiogénesis y arteriogénesis (Carmeliet, 2003). La vasculogénesis se define como la formación *in situ* de nuevos vasos a partir de células progenitoras endoteliales (EPCs), las cuales migran hasta los lugares de vascularización donde se diferencian a células endoteliales uniéndose para formar el nuevo plexo vascular (Risau y Flamme, 1995; Carmeliet, 2003). Por otro lado se encuentra la angiogénesis que es la formación de nuevos vasos a partir de otros ya existentes que implica la migración y proliferación de las células endoteliales ya diferenciadas. El tercer mecanismo es la arteriogénesis la cual consiste en el remodelado de un vaso ya existente para incrementar el diámetro luminal como respuesta a un incremento en el flujo sanguíneo (Heil y cols., 2006). La angiogénesis y vasculogénesis son responsables del desarrollo del sistema vascular en el embrión y en el adulto y están mediadas por factores de crecimiento, los cuales actúan a través de la unión a un grupo de receptores pertenecientes a las tirosín-quinasa que se encuentran localizados en la membrana de las células endoteliales (Freedman e Isner, 2001).

La angiogénesis es un proceso muy importante que está implicado en el desarrollo embrionario y en numerosos mecanismos de reparación fisiológica como la cicatrización de heridas, la isquemia producida por oclusión arterial y, a nivel del endometrio, durante el ciclo menstrual. Cuando el crecimiento de nuevos vasos es desproporcionado, puede influir en el desarrollo de enfermedades neoplásicas como el crecimiento tumoral, o no-neoplásicas como la retinopatía diabética, psoriasis, aterosclerosis o artritis reumatoide. Por el

contrario, la inhibición del crecimiento de nuevos vasos puede dar lugar a desórdenes como la atresia intestinal, la atrofia facial unilateral o la hipertensión arterial (le Noble y cols., 1998). Algunos estudios dirigen la terapia angiogénica como una estrategia complementaria para el tratamiento de enfermedades que cursan con insuficiencia vascular (Freedman e Isner, 2001).

La angiogénesis comienza con la destrucción local de la pared de los vasos sanguíneos preexistentes y con la activación, proliferación y migración de las células endoteliales. Éstas comienzan a formar estructuras tubulares alrededor de las paredes de los vasos que en ese momento se están formando. Durante la maduración del lecho vascular, los capilares se convierten en grandes vasos, arterias y venas.

2.2 Estructura de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos están compuestos principalmente por 3 capas (Imagen 1):

- Capa íntima: es la capa más interna del vaso formada por endotelio y tejido conjuntivo subendotelial. La liberación de una serie de factores endoteliales permite mantener las condiciones físicas de la sangre impidiendo su coagulación y regular la actividad contráctil del músculo liso.
- Capa media de músculo liso: delimitada en algunos vasos por dos membranas elásticas cuyo grosor depende del tipo de vaso. Las células musculares de los vasos hacen posible, gracias a su contracción y relajación, el cambio del calibre arteriolar de los vasos de resistencia, lo que determina el grado de perfusión de un tejido y el nivel de presión arterial.
- Capa adventicia: es la capa más externa y contiene la mayoría de los elementos elásticos como fibras de colágeno.

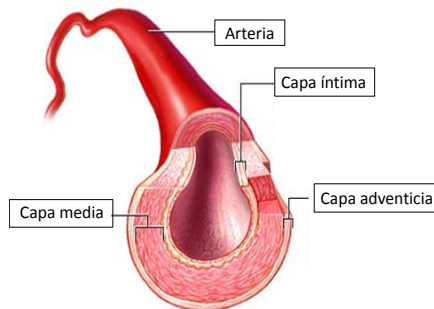


Imagen 1. Estructura de los vasos sanguíneos. Imagen adaptada de www.clinicadam.com/imagenes-de-salud/19194.html (08.10.13).

2.3 Etapas de la angiogénesis

Como muchos otros procesos biológicos, la angiogénesis es el resultado de complejas interacciones entre diferentes moléculas. Para facilitar su análisis, podemos dividir la angiogénesis en cuatro fases (Imagen 2):

1. Activación de las células endoteliales (CE) por una señal angiogénica

La angiogénesis comienza con la activación de las células endoteliales bajo la acción de diversos mediadores fisiológicos. Entre los factores promotores de la angiogénesis y que se encuentran mejor caracterizados destacan el bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos), PlGF (factor de crecimiento placentario), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y PD-ECGF (factor de crecimiento de CE derivado de plaquetas). Además, moléculas de señalización como el NO, factores de transcripción como el factor inducido por hipoxia (HIF-1) y diversas células progenitoras también participan en la formación de nuevos vasos (Bir y cols., 2012).

2. Síntesis y liberación de enzimas degradativas

Una vez las CE se activan por acción del estímulo angiogénico, se produce la liberación de una serie de proteasas que les permitirán disolver su membrana basal. Aunque se han implicado proteasas de diversas familias en el proceso angiogénico, las que parecen tener un papel más importante son los activadores de plasminógeno y las metaloproteinasas de matriz (MMPs). El factor VEGF también estimula la producción por las células endoteliales de los activadores de plasminógeno y sus inhibidores (Pepper y cols., 1991; Pepper y cols., 1992; Unemori y cols., 1992; Mandriota y cols., 1995).

3. Proliferación y migración de las células endoteliales

En respuesta al estímulo angiogénico, las CE comienzan a proliferar y migrar hacia los vasos cuya pared se está degradando. Moléculas de adhesión como las integrinas sirven como punto de anclaje a partir del cual irán apareciendo los nuevos brotes y, a partir de éstos, los nuevos vasos (Bir y cols., 2012). Además, existe una señal quimiotáctica o gradiente que atrae y guía las CE hacia su diana.

4. Elongación, remodelado y formación tubular

A medida que el tubo crece, el tejido de alrededor se va remodelando. En el remodelado vascular participan activamente diversos estímulos mecánicos como la tensión de la pared o la fuerza de cizallamiento (Bir y cols., 2012). Las CE comienzan a rodar a través del túbulo que se está formando para ir aumentando el tamaño del mismo y los nuevos túbulos formados comienzan a conectar unos con otros mediante bucles para que pueda circular la sangre a través de ellos. Finalmente, la estabilización y maduración de los nuevos vasos tiene lugar por la

acción de células como los pericitos o moléculas como la angiopoyetina o el PD-ECGF.

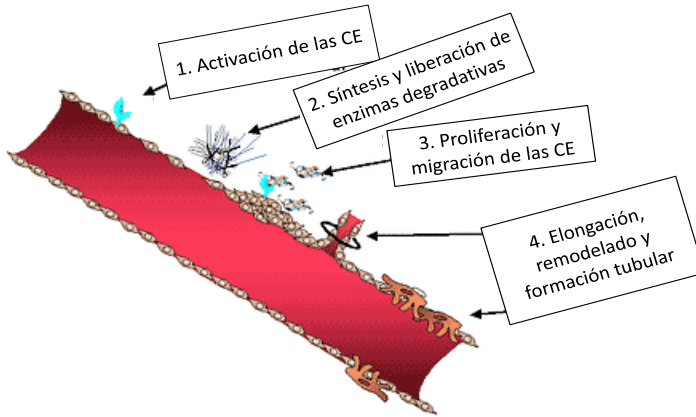


Imagen 2. Etapas de la angiogénesis; 1. Activación de las CE y unión de los factores pro-angiogénicos (bFGF, VEGF, PIEGF, HGF, PD-ECGF, NO) a sus receptores en la superficie vascular; 2. Síntesis y liberación de las enzimas degradativas (MMPs); 3. Proliferación y migración de las CE (Integrinas); 4. Elongación, remodelado (tensión vascular, fuerza de cizallamiento) y formación tubular (pericitos, angiopoyetina, PD-ECGF). Imagen adaptada de la presentación de Carlos Arteaga, MD titulada "Role of de receptor tyrosine kinase in neoplastic transformation (Focus on HER axis and VEGF)" (04.10.13). *bFGF*, factor básico de crecimiento de fibroblastos; *VEGF*, factor de crecimiento endotelial vascular; *PIEGF*, factor de crecimiento placentario; *HGF*, factor de crecimiento de los hepatocitos; *PD-ECGF*, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas; *NO*, óxido nítrico; *MMPs*, metaloproteinasas de matriz; *CE*, células endoteliales.

3. ÓXIDO NÍTRICO

En la actualidad, el óxido nítrico (NO) es un compuesto muy importante para la fisiología de nuestro organismo debido a la gran cantidad de funciones que desarrolla.

3.1 Historia del NO

La historia del descubrimiento del NO comenzó en 1980 cuando RF Furchgott y JV Zawadzki demostraron la capacidad de las células endoteliales para liberar un agente vasodilatador capaz de modular de forma rápida y transitoria determinadas respuestas vasodilatadoras, a este agente le denominaron “factor relajante dependiente del endotelio” (EDRF) (Furchgott y Zawadzki, 1980).

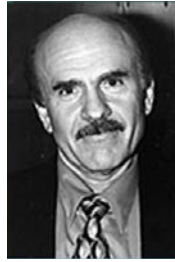
Durante varios años se determinaron las diferentes propiedades químicas y biológicas del compuesto sin conseguir identificarlo. El hecho de que el NO también produjera una relajación transitoria en anillos de aorta de conejo similar a la relajación causada por el EDRF, y que ambas relajaciones se inhibieran de forma semejante por la hemoglobina y se potenciaran por superóxido dismutasa, captadores de NO y del anión superóxido (O_2^-), respectivamente (Furchgott, 1988; Moncada y cols., 1991), confirmó que el EDRF y el NO parecían la misma sustancia. Otros experimentos también apoyaron esta hipótesis, es decir, que el EDRF y el NO son indistinguibles farmacológicamente y con vida media similar (Palmer y cols., 1987; Moncada y cols., 1991). Todos estos hallazgos permitieron concluir definitivamente que el EDRF era NO. En 1992 el NO fue nombrada molécula del año, y en 1998 la importancia de los estudios realizados con esta molécula fue reconocida con la concesión del premio Nobel a RF Furchgott, L Ignarro y F Murad.



S. Moncada



RF. Furchgott



L. Ignarro



F. Murad

Posteriormente, diversos estudios demostraron el papel del NO como regulador fisiológico de la presión arterial (Amezcuca y cols., 1989; Rees y cols., 1989a; Rees y cols., 1989b). Además, se observó que el NO está presente en la mayoría de los tejidos del organismo, no solamente en el territorio vascular. Por ello, esta molécula se encuentra implicada en múltiples procesos fisiológicos relacionados con la vasculatura a nivel cardiovascular, gastrointestinal y del sistema nervioso (Garthwaite y cols., 1988; Bult y cols., 1990).

3.2 Biosíntesis del NO

El NO es un gas lipófilo que se encuentra en forma de radical libre que reacciona con diversas moléculas con el fin de participar en múltiples procesos biológicos como el control del tono vascular, remodelado cardiaco, agregación plaquetaria, angiogénesis y proliferación de las células de músculo liso vascular (Ignarro y cols., 1999). El NO es generado por una familia de enzimas denominadas sintasas de óxido nítrico (NOS) que promueven la transformación del aminoácido L-arginina en L-citrulina junto a NO. La enzima tiene 3 isoformas distintas: neuronal (nNOS o NOS 1), inducible (iNOS o NOS 2) y endotelial (eNOS o NOS 3). Todas ellas requieren el mismo sustrato (L-Arginina), cosustratos como O₂

molecular y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), y distintos cofactores como flavinmononucleótido (FMN), flavinadenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH_4) y el grupo hemo tipo citocromo P450 (Alderton y cols., 2001; Pechanova y Simko, 2007), además del complejo calcio-calmodulina (Calcio-CaM), para llevar a cabo su actividad (Alderton y cols., 2001).

Para desarrollar su actividad enzimática, la NOS debe unirse a los cofactores y dimerizar. Cada monómero contiene un dominio oxigenasa amino-terminal (N-terminal) y un dominio reductasa carboxi-terminal (C-terminal). El dominio oxigenasa contiene los sitios de unión para el sustrato L-arginina, BH_4 y para el grupo hemo. Por el contrario, el dominio reductasa contiene los sitios de unión para las distintas flavinas (FMN y FAD) y NADPH. Los dos monómeros son dimerizados y, tras la formación del complejo calcio-CaM que facilita la transferencia de un electrón desde el dominio reductasa C-terminal hasta el dominio N-terminal al cuál se ha unido el grupo hemo, las NOSs producen NO (Dawson y cols., 1994; Ghafourifar y Richter, 1999; Liu y Huang, 2008; Zhang y Casadei, 2012) (Imagen 3).

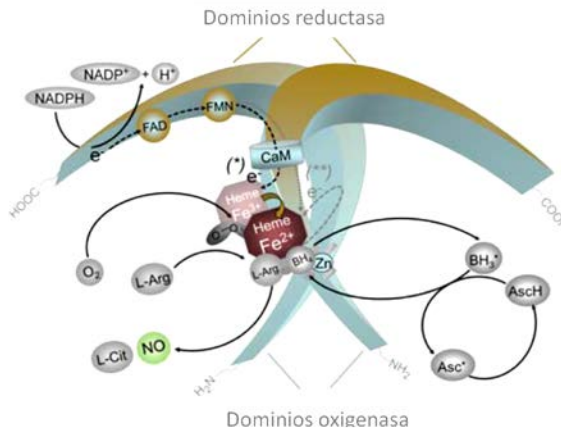


Imagen 3. Actividad de NOS y biosíntesis de NO. Imagen adaptada de Förstermann, 2012.

3.3 Características de las isoformas de la NOS

La nomenclatura inicial para las isoformas de la NOS reflejaba la observación de que la síntesis de NO no se producía en las células inflamatorias, a menos que fuera inducida por inmunoactivación, por ello, el término aplicado fue el de iNOS (Óxido Nítrico Sintasa Inducible). Esta enzima “inducible” fue contrastada con la actividad de una enzima “constitutiva” (cNOS), la cual se expresaba constitutivamente en diversos tipos celulares, incluyendo neuronas (nNOS) y células endoteliales (eNOS) (Michel, 1999).

En la Tabla 2 se resumen las principales características de las tres isoformas de NOS. Actualmente se conoce que la expresión génica de la isoforma endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) podría también inducirse bajo diversas condiciones fisiológicas y que, la función de iNOS podría considerarse como constitutiva bajo determinadas condiciones fisiológicas en algunas células (Guo y cols., 1995). Se ha postulado también la existencia de otras isoformas como NOS

mitocondrial (mNOS) o NOS osteoartrítica (OA-NOS). En el caso de mNOS, parece que se trata de una isoforma de iNOS asociada a la membrana de la mitocondria (Eissa y cols., 1996). Por lo que respecta a OA-NOS, podría ser una isoforma de nNOS presente en los condrocitos y cartílago de pacientes osteoartríticos (Amin y cols., 1995).

Por una parte, nNOS se expresa, predominantemente, en neuronas, pero también en músculo liso vascular, cardíaco y esquelético (Sears y cols., 2004). Por otra parte, eNOS se expresa en mayor medida en células endoteliales, aunque también se encuentra en cardiomiocitos, células mesangiales renales, osteoblastos y osteoclastos y, en pequeñas cantidades en las plaquetas (Sears y cols., 2004; Liu y Huang, 2008). Por lo que respecta a iNOS, su expresión se induce tras la acción de distintos mediadores inflamatorios (Liu y Huang, 2008). Gran variedad de tipos celulares expresan estas isoformas y, a su vez, muchos tejidos son capaces de expresar más de una isoforma diferente (Liu y Huang, 2008). Tanto nNOS como eNOS son expresadas constitutivamente y su actividad está regulada por los niveles de calcio intracelular, ya que es necesario un incremento de éste para su unión a la CaM y la posterior síntesis de NO mediada por estas isoformas constitutivas. Sin embargo, la expresión de iNOS es inducida en macrófagos activados como parte de una respuesta inmune (Liu y Huang, 2008) y, por tanto, su acción es independiente de los niveles de calcio intracelular.

Se conoce la localización de las distintas isoformas de NOS tanto en forma soluble en el citosol de las células, como asociada a las caveolas de las membranas. En cuanto a eNOS es la única entre todas las isoformas de NOS que se encuentra doblemente acilada por los ácidos grasos miristato y palmitato (Sase y Michel, 1997; Alderton y cols., 2001). Estas acilaciones se requieren para la localización subcelular de eNOS en sus regiones específicas en las caveolas del

plasmalema, que están presentes en la membrana de las células endoteliales y también se encuentran de forma abundante en los miocitos cardiacos y otras células (Anderson, 1993; Feron y cols., 1996). La miristoilación de eNOS tiene lugar en un residuo glicina N-terminal en posición 2 dentro de una secuencia específica que no tiene lugar ni en nNOS ni en iNOS. La palmitoilación tiene lugar en dos residuos de cisteína en las posiciones 15 y 26, lo que hace es estabilizar la asociación de la enzima con la membrana. A diferencia de la miristoilación que es irreversible, la palmitoilación es reversible y agonistas como la bradicinina promueven esta reacción de forma inversa. La isoforma endotelial (eNOS) requiere ser doblemente acilada para poder dirigirse a la caveola de la membrana plasmática e interactuar con la caveolina (caveolina-1 en células endoteliales y caveolina-3 en cardiomiocitos) (Feron y cols., 1996). La relevancia funcional de la interacción caveolina-eNOS fue inicialmente establecida en miocitos cardiacos intactos (Sase y Michel, 1997) y en el endotelio “*in vivo*” (Ignarro, 1990) donde se observó que cambios en la cantidad de caveolina modulaban la frecuencia cardiaca y la permeabilidad vascular.

Por lo que respecta a nNOS, en condiciones normales se encuentra en el retículo sarcoplásmico de los cardiomiocitos y en terminaciones nerviosas vagales y simpáticas cuya localización está mediada por el dominio PDZ (Alderton y cols., 2001; Sears y cols., 2004).

Tabla 2. Características de las isoformas de la NOS (Liu y Huang, 2008)

	nNOS	iNOS	eNOS
Otros nombres	NOS-1, NOSI, Tipo I NOS	NOS-2, NOSII, Tipo II NOS	NOS-3, NOSIII, Tipo III NOS
Localización cromosómica humana	12q24.2-12q24.3	17 cen-q11.2	7q35-7q36
Estructura génica y tamaño	29 exones >200 kbp	26 exones 37 kbp	26 exones 21-22 kbp
Tamaño monómeros humanos	161 kDa	131 kDa	133 kDa
Lugar predominante de expresión	Neuronas	Macrófagos	Células endoteliales
Otros lugares de expresión	Músculo liso y esquelético	Músculo liso y células hepáticas	Músculo liso y plaquetas
Expresión génica	Constitutiva e inducible	Inducible	Constitutiva e inducible
Dependencia de niveles de calcio	Ca ⁺² -dependiente	Ca ⁺² -independiente	Ca ⁺² -dependiente
Modificaciones covalentes	Fosforilación		Miristoilación, palmitoilación y fosforilación
Interacción con proteínas	Hsp 90, caveolina, NOSIP		Hsp 90, caveolina
Localización subcelular	Uniones neuromusculares, citosol (soluble), retículo sarcoplásmico	Citosol	Caveola
Rango de producción de NO	Moderado (nM a μM)	Alto (μM)	Bajo (pM a nM)

3.4 Actividad de NOS

Como ya se ha comentado anteriormente, en condiciones normales, eNOS se encuentra asociada a la caveolina en las caveolas del plasmalema en su forma inactiva (Massion y Balligand, 2003; Liu y Huang, 2008). Cuando el rozamiento, la presión hidrostática, la alteración del tono pulsátil o la liberación de mediadores como acetilcolina, bradicinina, histamina, sustancia P,... actúan sobre sus receptores en el endotelio, se produce la activación de la proteína G acoplada a ese receptor, lo que da lugar a la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) que, a través de la síntesis de segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) y el

inositol trifosfato (IP₃), dará lugar a un aumento del calcio intracelular que lleva a la formación del complejo calcio-CaM. Esto provoca la disociación del complejo eNOS-caveolina y la formación del complejo calcio-CaM-eNOS al cual se une la Hsp90 (proteína de choque térmico) identificada como un regulador de la actividad de eNOS, posiblemente como modulador alostérico (García-Cardena y cols., 1998; Piech y cols., 2003). Este complejo, junto con el resto de cofactores y sustratos, dará lugar a la síntesis de NO. Una vez formado el complejo, eNOS también es susceptible de ser fosforilada por una vía de activación independiente de los niveles de calcio. La principal regulación postrascricional de eNOS tiene lugar a través de la fosforilación de la serina 1177, la cuál se produce por la acción de proteínas quinasas B (PKB, Akt), A (PKA), C (PKC) y G (PKG), que aumentan su actividad (Brouet y cols., 2001; Mount y cols., 2006; Tamargo y cols., 2006). La fosforilación en serina 617 y serina 635 producidas por PKA y PKB también activa la eNOS, mientras que la fosforilación de treonina 495 producida por PKC y PKA la inactiva (Michel y cols., 2002; Mount y cols., 2006; Zhang y Casadei, 2012).

Por lo que respecta a nNOS, ésta enzima se localiza, por un lado en el retículo sarcoplásmico, donde físicamente se encuentra interaccionando con el receptor de la rianodina (RyR2) (Barouch y cols., 2002; Damy y cols., 2004), y, por otro lado también podemos verla en el sarcolema, donde interacciona con la caveolina-3. Su separación tanto de la rianodina como de la caveolina-3, hará que la enzima se active y desarrolle su acción (Loyer y cols., 2007). La enzima nNOS también es susceptible de ser fosforilada. Por un lado, se puede fosforilar en serina 847 por la acción de una proteína quinasa dependiente del complejo calcio-CaM (CaM-KII α), la que dará lugar a su inactivación (Mount y cols., 2006; Tamargo y cols., 2006; Seddon y cols., 2007; Osuka y cols., 2013). Por otro lado, la fosforilación se puede llevar a cabo en serina 1412 por la acción de la PKA, lo que

se postuló que podría aumentar la actividad de nNOS, aunque su acción no está claramente determinada (Mount y cols., 2006; Osuka y cols., 2013).

Tanto eNOS como nNOS pueden translocarse a diferentes compartimentos subcelulares en respuesta a distintos estímulos externos o en presencia de procesos patológicos como la insuficiencia cardíaca. Un ejemplo de esto es la translocación de nNOS desde el retículo sarcoplásmico hasta la caveola del plasmalema donde se asocia a la caveolina como respuesta a la isquemia/reperfusión o al daño en el ventrículo izquierdo (Damy y cols., 2004; Umar y van der Laarse, 2010; Zhang y Casadei, 2012), mientras que eNOS se transloca desde la cara citoplasmática de la caveola a dominios intracelulares como el complejo de Golgi, el núcleo o el receptor para la rianodina (RyR) (Papapetropoulos y cols., 1999; Zhang y Casadei, 2012). Por todo ello, las localizaciones específicas de cada isoforma permitirían una diferente regulación de la función cardíaca por cada una de ellas.

El NO sintetizado puede seguir diferentes rutas dependiendo de las condiciones fisiológicas. En numerosos procesos celulares la diana fisiológica del NO es la enzima guanilato ciclasa, la cuál, tras activarse, promueve la formación de GMPc que, a su vez, activa la enzima proteína quinasa G (PKG) provocando, la relajación del músculo vascular (Hare y Colucci, 1995), gastrointestinal, urinario y respiratorio (Liu y Huang, 2008). Por otra parte, el NO puede unirse a grupos sulfidril en determinadas proteínas para dar lugar a nitrosotioles (Liu y Huang 2008; Zhang y Casadei, 2012). Además, también puede unirse al grupo hemo de proteínas como la hemoglobina o la enzima citocromo c oxidasa (CcO) (Liu y Huang, 2008). Además, el NO puede reaccionar con aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y formar peroxinitritos, principales responsables del estrés oxidativo (Takimoto y cols., 2005; Liu y Huang, 2008; Dobutovic y cols., 2011). Finalmente, elevadas

cantidades de NO, inhiben los complejos mitocondriales I y IV y, como consecuencia, la respiración mitocondrial (Liu y Huang, 2008; Zhang y Casadei, 2012). Generalmente, la activación de la enzima guanilato ciclasa y la unión del NO a grupos sulfidril median numerosas rutas de señalización. En cambio, la formación de peroxinitritos y la inhibición de la respiración mitocondrial dan lugar a efectos tóxicos del NO.

3.5 Óxido nítrico y angiogénesis

Numerosos son los estudios que relacionan la angiogénesis con el NO, sin embargo, los resultados obtenidos son discordantes.

Diversos autores trabajan con la hipótesis de que el NO es capaz de favorecer la angiogénesis a través de distintos mecanismos (Cooke, 2003; Bir y cols., 2012).

- Existen evidencias de que la angiogénesis requiere la síntesis de NO endotelial. De hecho, numerosos factores angiogénicos (VEGF, bFGF) incrementan la expresión de eNOS y estimulan la liberación de NO derivado del endotelio (Ziche y Morbidelli, 2000; Parenti y cols., 2001; Cooke, 2003). Además, la formación de nuevos capilares (*in vitro* e *in vivo*) inducida por estos factores se inhibe en presencia de L-NAME (Cooke, 2003). Sin embargo, las condiciones experimentales determinan esta actividad pues, como describen Babaei y cols. (1998), la incubación con bFGF de células endoteliales en matrices de fibrina favorece la angiogénesis a través de un aumento en la expresión de eNOS y la producción de NO. Sin embargo, cuando no se incuban en esta matriz, el NO produce el efecto contrario.

- NO es un factor de supervivencia endotelial, inhibe la apoptosis y aumenta la proliferación y migración endotelial, un efecto que puede estar

mediado, al menos en parte, por la capacidad del NO para activar la podoquinesis. Además, NO aumenta la interacción entre las células endoteliales y la matriz al inducir la expresión de $\alpha v\beta 3$, un ligando de la matriz extracelular que induce el crecimiento de nuevos vasos (Cooke, 2003; Bir y cols., 2012).

- La angiogénesis está alterada cuando la actividad del NO se atenúa o desaparece. Así, la hipercolesterolemia, que altera la síntesis y actividad del NO endotelial, también interfiere con el proceso angiogénico (Chen y cols., 1997; Jang y cols., 2000). Además, en ratones deficientes en eNOS, la respuesta angiogénica a la isquemia de las extremidades posteriores también está alterada, un efecto que no se revierte por acción del VEGF (Murohara y cols., 1998). Además, también se ha visto que la angiogénesis se encuentra alterada y/o disminuida en situaciones patológicas como hipertensión arterial (le Noble y cols., 1998) o en procesos isquémicos (Bir y cols., 2012). Y también, alguno de estos autores relacionan dicha alteración en el crecimiento de nuevos vasos con la biodisponibilidad de NO (Kiefer y cols., 2002; Bir y cols., 2012).

Los trabajos realizados *in vitro* con células endoteliales de distinto origen (CE de cordón umbilical humano (HUVECs), CE de aorta bovina (BAECs) y CE microvasculares dérmicas (DMECs)) cultivadas en matrices tridimensionales han demostrado la potenciación del crecimiento de nuevos vasos mediada por GMPc (Isenberg y cols., 2005; Pyriochou y cols., 2006). Además, otros autores han demostrado que el cultivo de HUVECs en presencia de prostaglandina E2 (PGE2) (activador de la síntesis de NO), también potencia el proceso (Namkoong y cols., 2005). Además, el cultivo de CE venulares coronarias (CVECs) utilizando la bradicinina como activador de eNOS, demostró que la potenciación de la angiogénesis se producía a través del bFGF (Parenti y cols., 2001). Por último, otros estudios con HUVECs y BAECs, demuestran que el NO es capaz de potenciar

la proliferación y/o migración de las células endoteliales (Murohara y cols., 1999; Isenberg y cols., 2005). Es importante señalar que en estos trabajos se analizan fundamentalmente los fenómenos de proliferación y migración más que el crecimiento angiogénico propiamente dicho.

Por lo que respecta a los ensayos *ex vivo*, cabe destacar que existen muy pocos grupos que hayan determinado la implicación del NO en este sistema y, además, existe gran variabilidad de condiciones experimentales. Se ha visto que en aortas de ratas de 5 - 6 semanas estimuladas con PGE2 y cultivadas en Matrigel™ reducido en factores de crecimiento y en ausencia de suero bovino fetal, el NO potencia la angiogénesis por medio de la enzima GCs (Namkoong y cols., 2005). Por otro lado, se determinó que en los ratones eNOS^{-/-} caveolina^{+/+}, o en el eNOS^{+/+} caveolina^{-/-}, el crecimiento angiogénico está inhibido lo que indica que existe una compleja interacción entre eNOS y caveolina para regular dicho crecimiento (Morais y cols., 2012).

Además de la acción directa del NO sobre la angiogénesis, algunos autores relacionan su actividad vasodilatadora con la estimulación del crecimiento, así, se ha observado que el aumento local del flujo sanguíneo en la microcirculación del musculo esquelético aumenta la proliferación de las células endoteliales de los capilares (Hudlicka, 1998) el cuál se ve potenciado por la adición de VEGF o bFGF.

Por otro lado, diversos estudios alegan un efecto antiangiogénico del NO cuando sus concentraciones son elevadas. Por un lado, los estudios realizados *in vitro* con HUVECs tanto en Matrigel™ (Pipili-Synetos y cols., 1994) o matriz de fibrina (Babaei y cols., 1998), como en cultivo tradicional (Powell y cols., 2000) a los que se adicionaron diferentes donadores de NO (S-nitroso-N-acetil penicilamina (SNAP) o S-nitroso-N-acetil glutatión (SNAG), nitroprusiato sódico),

demuestran una acción inhibitoria del NO sobre la angiogénesis. Además, cuando se indujo la formación de NO en membrana corioalantoidea (CAM), a través de IL-2 (Sakkoula y cols., 1997) o se induce la iNOS en células endoteliales murinas (Cartwright y cols., 2000), se inhibe el proceso angiogénico. Esta inhibición fue revertida por L-NAME (Pipili-Synetos, 1994; Powell y cols., 2000). Además, como ya hemos mencionado, otros estudios vieron como el SNAP adicionado al cultivo de HUVECs y CPAECs (CE de arteria pulmonar de ternero) en una matriz de fibrina inhibía el proceso angiogénico en ausencia de bFGF, y en presencia de bFGF, lo potenciaba (Babaei y cols., 1998).

Los ensayos *in vivo* realizados en CAM con donadores de NO o inducción de su síntesis demostraron, nuevamente, la capacidad del NO para inhibir el proceso (Pipili-Synetos y cols., 1994; Sakkoula y cols., 1997; Pipili-Synetos y cols., 2000; Powell y cols., 2000) y, en su caso, la capacidad del L-NAME para revertirlas (Pipili-Synetos y cols., 1994; Sakkoula y cols., 1997; Pipili-Synetos y cols., 2000). Otros estudios realizados en músculo esquelético han corroborado que el NO puede interrumpir el proceso de crecimiento de nuevos vasos (Williams y cols., 2006). Sin embargo, la ruta mediante la cual tiene lugar estos efectos antiangiogénicos no se ha aclarado.

En condiciones en las que existe hipoxia (Ziche y Morbidelli, 2000; Bir y cols., 2012; Kruzliak y cols., 2012) se ha visto que se produce un aumento en el crecimiento de nuevos vasos (en parte estimulado por el NO) y las rutas implicadas pueden ser varias, incluida la estabilización del HIF-1 α (Bir y cols., 2012). A este nivel, el NO tiene un papel dual. Por una parte, diversos estudios han confirmado que existe una competición del NO con el O₂ por su unión a la enzima citocromo c oxidasa (CcO) la cual da lugar a la disminución del consumo del O₂ mitocondrial y posterior redistribución a los tejidos que lo necesitan (Victor

y cols, 2009; Larsen y cols., 2012). Esto implica que, en hipoxia, cuando aumenta la afinidad del NO por la CcO mitocondrial, el NO endógeno inhibe el consumo de O₂ por la mitocondria y lo redistribuye en la célula permitiendo la degradación del HIF-1 α (Hagen y cols., 2003; Victor y cols., 2009; Fraisl, 2013) lo que podría dar lugar a la supresión del proceso angiogénico. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, el NO cuando se encuentra a elevadas concentraciones, es capaz de estabilizar el HIF-1 α por un mecanismo independiente de la mitocondria (Mateo y cols., 2003) y la consecuencia sería un aumento del proceso angiogénico (Oriowo y cols., 2013).

Con todo ello, la implicación del NO en la angiogénesis, es distinta en función de la concentración y de las distintas rutas en las que puede estar implicado el mediador (Hare y Colucci, 1995; Liu y Huang, 2008; Zhang y Casadei, 2012).

3.6 Óxido nítrico y enfermedades cardiovasculares

En el sistema cardiovascular, el NO juega un papel esencial en la regulación de la contracción y en el transporte del calcio en los cardiomiocitos y células del músculo liso vascular, de manera que la producción constitutiva de NO, parece estar implicada en la regulación de la inotropía y cronotropía cardiacas (Zhang y Casadei, 2012). Además, enfermedades como isquemia cerebral, aterosclerosis, hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, insuficiencia cardiaca, trombosis o infarto de miocardio se encuentran relacionadas con anomalías en la señalización de NO (Liu y Huang, 2008; Umar y van der Laarse, 2010).

El desarrollo de enfermedades cardiovasculares se ha asociado a alteraciones en la ruta de síntesis del NO, lo cual dará lugar a cambios en procesos

clave fisiológicos como la vasodilatación, función plaquetaria, angiogénesis, apoptosis y proliferación de células de músculo liso vascular (Naseem, 2005). Entre los mecanismos responsables de la alteración de dicha ruta se encuentran: 1) cambios en la expresión génica o proteica de NOS (Liu y Huang, 2008); 2) alteración en la biodisponibilidad del sustrato L-arginina (Naseem, 2005; Liu y Huang, 2008; Zhang y Casadei, 2012); 3) alteración en la biodisponibilidad del cofactor BH₄ que dará lugar al desacoplamiento de la enzima (Liu y Huang, 2008; Zhang y Casadei, 2012) ; 4) modificaciones en la localización subcelular de NOS (Liu y Huang, 2008); 5) fosforilación activadora o inhibidora de NOS (Zhang y Casadei, 2012) y 6) reacción del NO con radicales superóxido (ROS), dando lugar a peroxinitritos y, como consecuencia, a estrés oxidativo (Naseem, 2005; Dobutovic y cols., 2011; Zhang y Casadei, 2012). Además, niveles elevados de NO procedentes de la activación, principalmente, de iNOS son los responsables de la hipotensión severa que caracteriza el síndrome del shock tóxico o la insuficiencia cardíaca crónica (Dobutovic y cols., 2011).

Con el fin de clarificar el papel del NO en patologías cardiovasculares, diversos autores han utilizado ratones *knockout* carentes de una o varias isoformas de NOS. El fenotipo más aparente en los ratones que carecen de la expresión de nNOS (nNOS^{-/-}) es la distensión estomacal, demostrando un papel de nNOS en la relajación muscular del esfínter pilórico. Estos ratones son resistentes a la isquemia cerebral. Además, son fértiles y viables, aunque los machos son más agresivos que sus controles. Finalmente, son ratones con estenosis pilórica y con anormalidades endocrinas (Papapetropoulos y cols., 1999; Sears y cols., 2004; Liu y Huang, 2008). Los ratones eNOS^{-/-} también son viables, fértiles y, además, no muestran anormalidades anatómicas graves. Sin embargo, padecen alteraciones en la relajación vascular, regulación de la presión arterial y contractilidad cardíaca.

Constituyen un modelo animal útil para estudiar la disfunción endotelial (Papapetropoulos y cols., 1999; Liu y Huang, 2008).

Cabe destacar que cuando existe carencia de una determinada isoforma de NOS, existen mecanismos compensadores de las otras isoformas presentes (Papapetropoulos y cols., 1999; Tsutsui y cols., 2010). Un ejemplo es que en los ratones eNOS^{-/-} se evidencia una regulación al alza de nNOS (Huang y cols., 2002; Lamping y cols., 2000; Takaki y cols., 2008). Por ello, Tsutsui y cols., trabajaron con ratones a los que se les habían suprimido las tres isoformas de NOS (n/i/eNOS^{-/-}). Estos ratones presentan numerosos fenotipos cardiovasculares, incluyendo arterioesclerosis/aterosclerosis, infarto de miocardio y dislipemia (Tsutsui y cols., 2010), además de niveles elevados de presión arterial y ligera bradicardia.

Por todo ello, el NO es una molécula implicada en diversas funciones a nivel cardiovascular (Tabla 3).

Tabla 3. Funciones fisiológicas y patologías asociadas al NO (Jugdutt, 2002)

Funciones fisiológicas	
-	Mantenimiento de la relajación del músculo liso vascular
-	Regulación del tono vascular
-	Regulación del aporte de flujo sanguíneo a los distintos tejidos
-	Regulación de la presión sanguínea
-	Regulación de la contractilidad miocárdica
-	Regulación de la integridad y permeabilidad vascular
-	Regulación de la proliferación de las células vasculares
-	Regulación de la interacción endotelio-leucocito
-	Inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria
-	Efecto antiaterogénico
Patologías cardiovasculares	
-	Enfermedad isquémica cardiaca
-	Hipertensión arterial
-	Hipercolesterolemia
-	Aterosclerosis
-	Diabetes mellitus
-	Isquemia-reperusión
-	Estenosis arterial
-	Insuficiencia cardiaca
-	Shock séptico
Otras patologías	
-	Enfermedades cerebrovasculares e infarto
-	Impotencia
-	Hipertensión pulmonar

- **Óxido nítrico e HTA**

Existen numerosos reguladores homeostáticos de la presión arterial, entre ellos se incluyen el sistema renina-angiotensina, el sistema nervioso autónomo y mediadores locales como el NO (Liu y Huang, 2008).

La hipertensión arterial es la consecuencia de cambios en el flujo sanguíneo causados a su vez por disfunción de la capa interna de los vasos sanguíneos (capa endotelial) y el remodelado de la pared de las arteriolas de resistencia, que son las responsables de mantener el tono vascular periférico (Giles y cols., 2012).

Uno de los principales mecanismos implicados en la vasodilatación es el NO. El NO juega un papel muy importante en la regulación de la resistencia vascular, relajación arterial y distensibilidad. Por ello, muchos de los tratamientos farmacológicos administrados para combatir las enfermedades cardiovasculares afectan a la producción de NO, varios ejemplos de algunos de ellos son las estatinas, donadores de NO y antihipertensivos como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs). Otros tratamientos se utilizan para regular la enzima guanilato ciclasa y otros son agentes vasodilatadores que actúan por otros mecanismos como los β -bloqueantes (Giles y cols, 2012).

En el caso de la HTA se ha comprobado que la inhibición de la síntesis de NO incrementa la rigidez de las arterias. Por otro lado, la disminución de la biodisponibilidad de NO a causa del estrés oxidativo o por procesos inflamatorios da lugar a una disfunción endotelial que está directamente relacionada con el desarrollo de la enfermedad (Giles y cols, 2012). Además se ha visto que en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) la producción de $O_2^{\cdot -}$ se encuentra elevada dirigiendo a un incremento en la oxidación de NO dando lugar a una disminución en la vasodilatación (Naseem, 2005).

- **Óxido Nítrico e IC**

En la última década diversos estudios han demostrado que se requiere eNOS para el desarrollo del corazón (Bloch y cols., 1999). Concretamente, la carencia de eNOS da lugar a defectos congénitos, hipertrofia cardiaca e insuficiencia cardiaca postnatal. Además, eNOS es muy importante en la morfogénesis de las arterias coronarias y el desarrollo miocárdico capilar.

La producción de NO procedente de eNOS regula los canales de calcio tipo L en los cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario y se ha demostrado que

el NO promueve la cardiomiogénesis en células madre embrionicas de ratón (Bloch y cols., 1999; Ji y cols., 1999; Kanno y cols., 2004). De las tres isoformas, eNOS es la que parece tener un papel mas relevante, pues nNOS e iNOS se expresan durante la cardiogénesis pero los animales que carecen de ellas tienen un fenotipo cardiaco normal.

Además, eNOS promueve la maduración cardiaca postnatal (Lepic y cols., 2006) y participa en la formación de nuevos capilares (Zhao y cols., 2002), además de regular la correcta formación de las válvulas aórticas (Lee y cols., 2000; Fernandez y cols., 2009).

Existen numerosos estudios acerca de la implicación del NO en la IC. Como se ha comentado anteriormente, los estudios realizados con ratones modificados genéticamente han demostrado que eNOS y nNOS poseen una actividad cardioprotectora, aunque los mecanismos a través de los cuales desarrollan esta cardioprotección no se han determinado (Shimokawa y Tsutsui, 2010; Tamargo y cols., 2010; Umar y van der Laarse, 2010; Manoury y cols., 2012; Zhang y Casadei, 2012).

Se sabe que el NO derivado de las isoformas constitutivas eNOS y nNOS tiene distintos efectos inhibitorios sobre el miocardio como la facilidad de disminuir la capacidad cardiaca contráctil, acelerar la relajación del músculo, incrementar la distensibilidad de los cardiomiocitos, inhibir ligeramente la respiración mitocondrial y mejorar la eficiencia del consumo de oxígeno cardiaco (Yue y Yu, 2011). Sin embargo, existen muchas contradicciones acerca de la expresión y actividad de eNOS y nNOS en el corazón insuficiente. Algunos autores describen una disminución de la expresión de ambas enzimas en pacientes con IC (Drexler y cols., 1998; Damy y cols., 2004; Chen y cols., 2006), mientras que otros refieren un aumento de la expresión tanto de eNOS (Stein y cols., 1998; Fukuchi y

cols., 1998) como de nNOS (Damy y cols., 2004), pero el papel beneficioso que juega cada isoforma constitutiva no ha sido completamente dilucidado.

En ratones, la sobreexpresión de eNOS se encuentra asociada a una mejoría en la función sistólica y diastólica tras el síndrome de isquemia/reperfusión y a una mejora en la hipertrofia y fibrosis intersticial tras el infarto de miocardio. Por otro lado y también en ratones, la sobreexpresión de nNOS se encuentra asociada a un incremento en el grosor de la pared del Vi (Zhang y Casadei, 2012). Sin embargo, concentraciones elevadas de NO semejantes a las encontradas en el corazón insuficiente (Ferdinandy y cols., 2000; Pacher y cols., 2005) pueden dar lugar a una reducción del consumo de O₂ y posterior estrés oxidativo que tendrá como consecuencia la inhibición de la capacidad contráctil de los cardiomiocitos (Dobutovic y cols., 2011). Este aumento en la concentración de NO se debe, principalmente, a la inducción de iNOS, aunque eNOS también se encuentra implicada (Chen y cols., 2002).

Además de todo esto, también se ha demostrado el efecto negativo que tiene el NO sobre la respuesta β -adrenérgica que se encuentra incrementada en el corazón insuficiente (Barouch y cols., 2002; Dobutovic y cols., 2011).

Por lo que respecta a nNOS, no está claramente determinada su función en la contractilidad en el corazón humano. Sin embargo, se ha visto que en numerosos modelos de enfermedad cardíaca, incluida la insuficiencia cardíaca, la expresión de esta isoforma se relaciona con una disminución de la contractilidad (Khan y cols., 2003; Dawson y cols., 2005; Casadei, 2006; Seddon y cols., 2007).

Dada la relevante implicación del NO en la IC, muchos de los tratamientos administrados a los pacientes con esta patología intervienen de manera directa o indirecta sobre el mecanismo de acción de éste mediador. Así pues cabe destacar

que los tratamientos de elección para pacientes con IC son los IECAs asociados o no a β -bloqueantes como el carvedilol (Krum y Driscoll, 2013). En el caso de los IECAs se ha encontrado sus efectos beneficiosos sobre la enfermedad por la capacidad para restablecer los niveles de NO y mejorar la función y estructura cardiaca (Macdonald y cols., 1996). Otros agentes como el carvedilol administrado junto con fármacos potenciadores de la acción de NOS a nivel post-transcripcional han resultado ser también muy beneficiosos (Tousoulis y cols., 2012).

4. NEUROTROFINA-3

Las neurotrofinas (NTs) fueron identificadas como moléculas promotoras de la supervivencia neuronal, pero en la actualidad se sabe que regulan muchos aspectos del desarrollo y función neuronal, incluyendo la diferenciación y plasticidad sináptica (Caporali y Emanuelli, 2009).

4.1 Historia de las neurotrofinas

La primera neurotrofina identificada fue el factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado por su habilidad para estimular el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las neuronas durante el desarrollo y tras daño neuronal. La segunda neurotrofina identificada fue el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Finalmente, se clonó el tercer miembro de esta familia, denominado neurotrofina-3 (NT-3). En la actualidad se conocen cuatro neurotrofinas en mamíferos (NGF, BDNF, NT-3 y NT-4) y dos más en peces (NT-6 y NT-7), que no parecen tener ortólogos en mamíferos (Caporali y Emanuelli, 2009).

4.2 Biosíntesis de neurotrofinas

Tanto las neurotrofinas como sus genes comparten una estrecha homología. La proteína producto de cada gen incluye una secuencia señal y un pro-dominio, seguido de la secuencia de la proteína madura. Estos precursores pre-pro-neurotrofinas, de aproximadamente 30-35 kDa, son procesados por proteólisis hasta dar lugar a las proteínas maduras de 12-13 kDa. Cuando el péptido señal se separa, las pro-neurotrofinas forman de manera espontánea homodímeros, unidos no covalentemente, en el retículo endoplasmático y transitan al aparato de Golgi a través de dos tipos de vesículas de secreción. Finalmente, las pro-neurotrofinas son convertidas en neurotrofinas maduras por proteasas. Cada neurotrofina puede ser almacenada en gránulos cuya exocitosis puede estar regulada por distintas señales, incluyendo la movilización de calcio. Son escasos los estudios acerca de los procesos que regulan la secreción de neurotrofinas pero se sabe que NGF y NT-3 utilizan una vía de secreción constitutiva mientras que BDNF es secretado mediante un proceso regulado (Mowla y cols., 2001). También se ha demostrado que NT-3 es liberada por despolarización o potenciales de acción espontáneos en algunas neuronas, y depende de la activación de canales de calcio (Blondel y cols., 2000; Boukhaddaoui y cols., 2001).

El procesamiento intracelular de las pro-neurotrofinas no siempre es eficiente y se ha observado secreción de pro-neurotrofinas (Chao y Bothwell, 2002) que también tienen capacidad para unirse selectivamente a los receptores dando lugar a acciones diferentes (Bruno y Cuello, 2006). Además, las pro-neurotrofinas pueden ser procesadas en el compartimento extracelular (Lee y cols., 2001). La regulación de la maduración de las neurotrofinas será por tanto un factor clave en el control post-transcripcional que modula sus acciones.

4.3 Características de los receptores para neurotrofina-3

Las neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores: uno de alta afinidad perteneciente a la familia de receptores de tirosin quinasa (Trk), de los que se han descrito tres subtipos TrkA, TrkB y TrkC, y otro de baja afinidad denominado p75^{NTR}.

- Receptores Trk

Los receptores TrkA, TrkB y TrkC son representantes clásicos de los receptores tirosin quinasa y a ellos se unen las neurotrofinas con distinta afinidad: NGF se une preferentemente al subtipo TrkA, BDNF y NT-4 al subtipo TrkB y NT-3 al subtipo TrkC. Sin embargo, aunque con menos eficiencia, NT-3 también señala a través de los subtipos TrkA y TrkB (Caporali y Emanuelli, 2009). Los receptores Trk interactúan con las neurotrofinas maduras, no con las pro-neurotrofinas, por lo que los procesos que regulan la maduración también regulan la activación de estos receptores (Lee y cols., 2001). Se han descrito diferentes isoformas de los tres receptores Trk, incluso algunas que carecen del dominio tirosin quinasa y que afectan a la difusión y transducción de la señal de las neurotrofinas. También se regula la función del receptor Trk por la presencia del p75^{NTR}, bien inhibiendo o bien favoreciendo la señalización, según los casos (Caporali y Emanuelli, 2009).

Los receptores Trk, tras la interacción con las neurotrofinas maduras, se activan por dimerización y fosforilación. El dominio citoplasmático de estos receptores contiene 5 tirosinas esenciales para la señalización. Además, una vez fosforiladas, las tirosinas constituyen lugares de unión para proteínas adaptadoras que actúan como intermediarios en las cascadas de señalización. Las vías de señalización activadas son Ras/ERK, PI3K/Akt, y PLC- γ /DAG+IP3/calcio (Huang y Reichardt, 2003).

- **Receptor p75^{NTR}**

Es un miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral, con una estructura semejante al receptor TNF- α p55 que exhibe un dominio citoplasmático que incluye un dominio “muerte” similar al presente en otros miembros de esta familia. Todas las neurotrofinas se unen a este receptor con una afinidad baja y equivalente pero, a diferencia de los Trk, a él pueden unirse también las pro-neurotrofinas e iniciar una señalización apoptótica. En las neuronas, p75^{NTR} y Trk se encuentran con frecuencia co-expresados y forman un complejo que puede ser inmunoprecipitado. Como hemos comentado, esta interacción modula la unión de las neurotrofinas a sus receptores Trk (Caporali y Emanuelli, 2009).

4.4 Actividad de neurotrofina-3

Clásicamente se considera que los factores neurotróficos, y entre ellos las neurotrofinas, son secretados en los tejidos diana y mantienen la supervivencia y diferenciación de las neuronas que inervan esa diana. Teniendo en cuenta esta teoría, es de esperar que las neurotrofinas sean expresadas por células no neurales, así como por el soma y las dendritas de neuronas sobre las cuales terminan los axones. Después de la secreción, se unen a los receptores Trk, y el complejo neurotrofina-receptor es endocitado y transportado en endosomas de manera retrógrada desde el axón hasta el soma. Tanto en el axón como en el soma, las neurotrofinas activan distintas vías de señalización como ERK y PI3K (Heerssen y Segal, 2002). Este mecanismo, que está bien demostrado para NGF, no se ha observado de forma tan clara en el caso de NT-3.

NT-3 se expresa en gran proporción en las regiones donde se está produciendo el crecimiento de los axones de neuronas simpáticas y los ratones

deficientes en NT-3 poseen un número inferior de axones simpáticos respecto a sus controles (Howe y Mobley, 2005). Se ha observado también que las neuronas simpáticas postganglionares, extienden sus axones a través de regiones productoras de NT-3 como los vasos. En este contexto, están bien establecidas desde hace tiempo las funciones de NT-3 en el desarrollo y la maduración del sistema nervioso que son: diferenciación neuronal, crecimiento de las prolongaciones neurales, supervivencia neuronal, muerte celular programada o control de la transmisión sináptica (Zhou y Rush, 1996). No se conoce si, además, NT-3 puede jugar también un papel relevante sobre otros tipos celulares presentes en los vasos o el corazón aunque evidencias recientes sugieren una acción de NT-3 en células endoteliales, cardiomiocitos o células de músculo liso vascular, que expresan el receptor TrkC.

4.5 Neurotrofina-3 y enfermedades cardiovasculares

Las neurotrofinas fueron descubiertas por investigadores que trabajaban en el ámbito de las neurociencias, y la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se encuadran en este campo. Por eso, las acciones mejor contrastadas de la NT-3 se refieren a su capacidad para modular el desarrollo y la supervivencia neuronal, en especial de las neuronas simpáticas. Sin embargo, aun focalizando la atención en este campo, se ha descrito que el lecho vascular produce gran cantidad de NT-3 que facilita el crecimiento de los axones, y se sabe que las neurotrofinas y sus receptores juegan un papel clave no sólo en el desarrollo de la innervación cardiovascular, sino en el proceso de formación del corazón y los vasos durante la etapa embrionaria (Caporali y Emanuelli, 2009). Pocos estudios se han llevado a cabo para determinar el papel de NT-3 a nivel cardiovascular. Se ha visto que los ratones que sobreexpresan una isoforma truncada del receptor para NT-3, TrkC, presentan diversas anomalías cardíacas (Palko y cols., 1999). Por

lo que respecta a animales adultos, se ha visto que NT-3 y TrkC se expresan en corazón y vasos, pero, a diferencia de lo que ocurre en el sistema nervioso central donde NT-3 se expresa en abundancia durante el desarrollo embrionario pero su expresión disminuye en la madurez quedando reducida a determinadas áreas (Vigers y cols., 2000), en el sistema cardiovascular la expresión se mantiene constante (Scarlsbrick y cols., 1993; Kawaguchi-Manabe y cols. 2007). Llama la atención que la expresión de p75^{NTR} se induce en situaciones patológicas como isquemia, aterosclerosis y diabetes (Caporali y Emanuelli, 2009), sin embargo, no están bien estudiadas las consecuencias de su activación a este nivel.

Existen trabajos que describen una acción directa y aguda de NT-3 sobre el endotelio vascular (Meuchel y cols, 2011), concretamente en arteria pulmonar humana. La NT-3 exógena libera NO y aumenta el GMPc en células endoteliales aisladas de arteria pulmonar humana, en una proporción semejante a la acetilcolina, dando lugar a una vasodilatación rápida y dosis-dependiente. Además, tanto en aorta de rata como en células madre neurales, NT-3 produce NO a través de la fosforilación de Akt y eNOS. La liberación de NO mediada por NT-3 modula la proliferación de las células madre neurales y mantiene una población quiescente de estas células (Delgado y cols., 2013). A estas evidencias que sugieren un papel relevante de la NT-3 en el desarrollo y función del sistema cardiovascular, habría que añadir datos sobre su relación con situaciones patológicas en el sistema cardiovascular maduro.

- **NT-3 e HTA**

Estudios previos han demostrado que NT-3 se encuentra aumentada en corazón y arteria mesentérica procedentes de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con respecto a los animales control (Zhang y Rush, 2001).

- **NT-3 e IC**

Muy pocos trabajos se han publicado acerca del posible papel de NT-3 en la IC. Algunos de ellos describen en cultivos de cardiomiocitos de rata que la NT-3 exógena o endógena ejerce una acción hipertrófica activando MAPKs (p38, ERK 1/2, y JNK) a la vez que aumenta la expresión de marcadores de hipertrofia y el tamaño de los cardiomiocitos (Kawaguchi-Manabe y cols. 2007; Saygili y cols, 2010). Se ha analizado el papel de NT-3 tras un proceso de isquemia cerebral, observándose una disminución en su expresión a la vez que una acción protectora cuando se aporta de forma exógena (Lindvall y cols., 1992; Zhang y cols., 1999; Galvin y Oorschot, 2003), pero no se ha prestado el mismo nivel de atención en procesos isquémicos cardiacos.

- **NT-3 e IP**

Sabiendo que la IP objeto de estudio en la presente tesis es una complicación que se produce como consecuencia de la intervención quirúrgica de pacientes con Tetralogía de Fallot, cabe destacar que se han realizado estudios con ratones NT-3 *knockout* (NT-3^{-/-}), que mueren al nacer y presentan severas anomalías cardiacas semejantes a la Tetralogía de Fallot (Donovan y cols., 1996). Por ello, llama poderosamente la atención que, hasta el momento, no se haya abordado ningún estudio en pacientes con Tetralogía de Fallot para determinar si se producen cambios en la expresión y/o funcionalidad de NT-3/TrkC en estos pacientes.

Objetivos

OBJETIVOS

El óxido nítrico es un mediador implicado en el desarrollo de la patología cardiovascular, la principal causa de mortalidad en nuestro entorno, pero su papel no ha sido completamente esclarecido. Recientemente, se ha establecido el mecanismo a través del cual actúa la NT-3 liberada en el endotelio vascular y se ha demostrado su capacidad para, a través de la activación de su receptor TrkC, fosforilar la eNOS y, como consecuencia, aumentar la síntesis de NO en las células que expresan este receptor junto con eNOS. A su vez, también se ha demostrado recientemente la implicación de la otra isoforma constitutiva de la NOS, la nNOS, en la homeostasis cardiovascular.

Ante estas evidencias, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar el papel de NT-3, eNOS y nNOS en la patología cardiovascular humana, focalizando la atención en el proceso angiogénico por ser un factor clave tanto en el desarrollo como en la recuperación de los trastornos cardiovasculares. Dada la extensión de este objetivo, en la presente Tesis se analizan dos aspectos concretos: por una parte, y en colaboración con la Unidad de Hipertensión del Hospital La Ribera de Alzira y el Servicio de Cardiología del Hospital La Fe de Valencia, se estudian los cambios de expresión y/o funcionalidad tanto de las enzimas constitutivas encargadas de la síntesis de óxido nítrico (eNOS, nNOS), como de la neurotrofina-3 (NT-3) en muestras humanas de corazón y linfocitos circulantes procedentes de sujetos sanos y de pacientes con distintas patologías cardiovasculares; por otra parte, en animal de experimentación, se analiza el papel de estos mediadores en el proceso angiogénico, seleccionando para ello un

modelo “*ex vivo*” que permite el crecimiento de nuevos vasos a partir de un anillo de aorta de rata incubado en una matriz tridimensional.

A partir de estos objetivos generales, los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral han sido:

1. Analizar los cambios de expresión de eNOS, nNOS y NT-3 que se producen en miocardio y linfocitos de pacientes con diversas patologías cardiovasculares como hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca o pulmonar, trasplante cardiaco o antecedentes de muerte súbita por taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica, y relacionarlos con los distintos tratamientos farmacológicos y con variables demográficas, antropométricas y clínicas determinadas en esos pacientes.
2. Analizar la posible relación entre genes como un indicador indirecto de su relación funcional: eNOS/NT-3 que participan en una vía de señalización común y nNOS/NT-3, dos genes estrechamente implicados en el desarrollo y función neuronal que, por tanto, pueden estar relacionados con el proceso de reinervación cardiaca tras el trasplante.
3. Determinar las condiciones experimentales más adecuadas para realizar los estudios de angiogénesis y analizar si, durante el proceso se producen cambios de expresión de eNOS, nNOS y NT-3.
4. Determinar la capacidad del NO como modulador de la angiogénesis en condiciones normales y en distintas patologías cardiovasculares (hipertensión arterial o síndrome metabólico).

Material y métodos

1. MODELOS ANIMALES

1.1 Animales de experimentación

El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación española recogida en el Real Decreto 1201 / 2005, de 10 de Octubre, sobre “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos” (ratificación de la Directiva Europea 86 / 609 / CEE), y según Decreto 13 / 2007, de 26 de Enero, del Consell en la Comunitat Valenciana. Los protocolos utilizados han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia.

Todos los animales fueron estabulados hasta su sacrificio, siguiendo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiental de 22°C y 60 % de humedad; con alimentación artificial y agua de bebida ad libitum.

1.1.1 Ratas control (Wistar)

Se utilizaron como control ratas Wistar macho (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) de 16 semanas de edad (250-300 g).

1.1.2 Ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) son un modelo de hipertensión arterial animal desarrollado por Okamoto y Aoki a partir de ratas macho de la cepa Wistar-Kyoto que, de manera espontánea habían desarrollado hipertensión arterial. Estos machos fueron cruzados con hembras de la misma cepa que previamente se habían seleccionado con cifras elevadas de presión arterial; de modo que generación tras generación estas ratas desarrollarían la enfermedad de manera espontánea a la edad adulta. Para nuestro estudio se emplearon ratas SHR macho (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) de 17 semanas de edad (400-450 g).

1.1.3 Ratas con síndrome metabólico (Zucker)

Las ratas obesas Zucker (fa/fa) son un modelo animal con síndrome metabólico que desarrollan obesidad, hiperlipemia e hipercolesterolemia. La mutación en el gen *Lep^{r^{fa}}* fue descubierta en 1961 por Lois y Theodore Zucker en la población de ratas consanguíneas 13 M. En el presente estudio se emplearon ratas Zucker macho (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) de 15 semanas de edad (500-520 g).

1.2 Sacrificio y obtención de muestras

El sacrificio de los animales se realizó por decapitación y posterior exanguinación, previa anestesia, usando el anestésico inhalatorio volátil isoflurano (IsoFlo®, Esteve), teniendo en cuenta las recomendaciones para la eutanasia de los animales, de la Dirección general de medio ambiente (DGXI) de la Comisión Europea, para el sacrificio con el mínimo sufrimiento físico y mental del animal (Close y cols., 1996).

El tejido de elección utilizado fue la aorta torácica de rata para cuya extracción se realizó una toracotomía y se extrajo la arteria diseccionándola desde el cayado aórtico hasta el diafragma. A partir de este momento, la aorta se mantuvo en todo momento en líquido nutritivo. Además, del trozo extraído fue eliminada la capa de grasa perivasculosa y la aorta quedó disponible para su utilización. Cabe destacar la utilización en experimentos aislados de aorta de ratón y arteria mesentérica de rata. Para la extracción de ésta última, se realizó una laparotomía mediante incisión a nivel abdominal, se extrajo el intestino y se puso en una placa con líquido nutritivo. El intestino se esparció con cuidado utilizando unas pinzas para visualizar mejor el tejido adiposo y conectivo que se encuentra adherido a la vasculatura esplácnica. La separación de dichas

adherencias mediante el uso de material especial quirúrgico permitió visualizar la arteria mesentérica superior y sus ramas. A continuación, con la ayuda de una lupa de disección (Leica S6E), se aislaron las 2ª y 3ª ramas de las arterias mesentéricas de resistencia.

2. MODELOS HUMANOS

La selección de los pacientes incluida en el estudio fue realizada en la Unidad de Hipertensión del Servicio de Medicina Interna del Hospital de la Ribera (Alzira, España) y en la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario “La Fe” (Valencia, España). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valencia, así como por los correspondientes comités de los hospitales en colaboración, obteniendo en cada caso, el consentimiento informado de los pacientes.

2.1 Población de estudio y criterios de inclusión

En la presente tesis se trabajó con muestras de miocardio y sangre obtenidas de pacientes con diferentes patologías cardiovasculares, además de con muestras obtenidas de voluntarios sanos.

En el caso del miocardio, en el estudio fueron incluidos un total de 4 voluntarios sanos, 32 pacientes con insuficiencia cardíaca en fase terminal (IC), 17 pacientes sometidos a trasplante cardíaco (TC) y 9 pacientes con insuficiencia pulmonar (IP).

En cuanto a las muestras de linfocitos procedentes de sangre humana, en el estudio fueron incluidos un total de 20 voluntarios sanos , 10 pacientes con hipertensión arterial (HTA), 22 pacientes con insuficiencia pulmonar (IP), 13

pacientes con insuficiencia cardiaca (IC), 17 pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC) y 7 individuos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS).

A todos los sujetos se les determinaron variables antropométricas, hemodinámicas y perfiles bioquímicos en suero. Los voluntarios sanos o grupo control fueron individuos normotensos, sin ningún tipo de enfermedad cardiovascular diagnosticada y con un perfil bioquímico dentro de la normalidad.

En el grupo de sujetos con IC, se incluyeron pacientes en situación funcional avanzada con deterioro grave de la contractilidad miocárdica, clase IV en la escala NYHA de evaluación de la Insuficiencia Cardiaca (*The criteria committee of the NYHA, 1994*), recibiendo terapia para el tratamiento de la enfermedad (estimulantes cardiacos como dopamina, noradrenalina y dobutamina; β -bloqueantes como carvedilol; reguladores de la presión arterial como IECAs; o fármacos antiarrítmicos como amiodarona y digoxina). Se excluyeron pacientes con enfermedades concomitantes graves que contraindicaran la realización del trasplante cardiaco. En el caso de pacientes ya sometidos a trasplante cardiaco (TC), se incluyeron pacientes en un rango de 14 a 471 días tras el trasplante que recibieron tratamiento inmunosupresor en diferente grado según el tiempo transcurrido desde el trasplante, y que poseían un corazón funcionalmente normal según los datos clínicos evaluados en su momento; se excluyeron los pacientes inestables desde el punto de vista clínico, los tratados con fármacos antihipertensivos, los que presentaban algún tipo de evidencia eco-cardiográfica de hipertrofia ventricular izquierda o de disfunción sistólica / diastólica de acuerdo con las directrices actuales de IC, las biopsias con algún grado de rechazo confirmado en el momento de la recogida del tejido y las muestras con resultados positivos de enfermedad coronaria angiográfica o vasculopatía del injerto cardiaco determinadas por ecocardiografía intravascular.

Tanto en el grupo de pacientes con IC como en el grupo de pacientes sometidos a trasplante cardiaco, se obtuvieron datos clínicos procedentes del estudio ecocardiográfico (grosor de paredes, diámetros ventriculares y función biventricular) con menos de 24 horas de diferencia con respecto a la toma de muestras, y un registro hemodinámico (presiones del ventrículo y aurícula derecha) que se realizó en ese mismo momento previo a la toma de muestra.

Los pacientes con HTA no habían tomado previamente ninguna terapia antihipertensiva. A todos los pacientes, incluidos los voluntarios sanos, se les midió la presión arterial en consulta y se realizó una monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) durante 24 horas, con un monitor oscilométrico (Spacelabs 90202 o 90207), diferenciando periodos de día y noche. Los pacientes con HTA cursaron con valores elevados de presión arterial en consulta y MAPA. Fueron excluidos del estudio los pacientes con enfermedades cardiovasculares y/o renales asociadas. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones de la *British Hypertension Society* (Williams y cols., 2004).

Los pacientes con IP son sujetos con patologías congénitas como Tetralogía de Fallot o agenesia/estenosis pulmonar, entre otras, que fueron operados en la infancia y, como secuela a esa cirugía, han desarrollado una regurgitación grave de la válvula pulmonar dando lugar a una dilatación del ventrículo derecho que ha comenzado a ser disfuncional.

Además, en este estudio se obtuvieron muestras de pacientes con una alteración genética que les predispone a padecer arritmias cardiacas muy graves que pueden derivar en muerte súbita (MS). Éste tipo de cardiopatía es conocida como taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica, ya que depende, en gran parte, de estímulos catecolaminérgicos.

2.2 Obtención de muestras biológicas

2.2.1 Miocardio humano

En el caso de los individuos sanos e insuficientes (IC), las muestras transmurales fueron obtenidas de la parte posterior del ventrículo izquierdo adyacente al septum interventricular. Con respecto al ventrículo derecho las muestras fueron obtenidas de la pared anterior ventricular derecha. En ambos casos, las áreas que contenían tejido visiblemente cicatrizado fueron excluidas.

Las biopsias endomiocárdicas de ventrículo derecho procedentes de pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC) se obtuvieron por cateterización vía femoral. El área elegida fue el septum interventricular cercano al ápice.

En el caso de las muestras miocárdicas de pacientes con insuficiencia pulmonar (IP), éstas se obtuvieron durante la cirugía cardiaca y fueron extraídas del tracto de salida del ventrículo derecho.

2.2.2 Linfocitos humanos

Las muestras de sangre necesarias para la analítica y el aislamiento de linfocitos circulantes fueron obtenidas entre 2 y 3 horas antes del trasplante para los pacientes con IC. En el caso de los pacientes trasplantados (TC), las muestras se obtuvieron en un rango de días diferentes tras el trasplante coincidiendo con la evaluación del injerto. Las muestras de sangre de pacientes con IP y sujetos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS) fueron obtenidas de forma ambulatoria durante revisiones cardiológicas programadas, estando los pacientes clínicamente estables.

El aislamiento de linfocitos se realizó por venopunción de la vena basilica con los pacientes en ayunas de al menos 12 h. Se utilizaron 10 ml de sangre

previamente recogidos en un tubo estandarizado de recogida, conteniendo EDTA como anticoagulante.

Las muestras de sangre de los individuos sanos y con HTA se procesaron en los laboratorios del área de diagnóstico biológico del Hospital de La Ribera. Los linfocitos fueron aislados utilizando el reactivo Lymphoprep™, reactivo estéril y libre de endotoxinas diseñado para el aislamiento puro de linfocitos por gradiente de densidad, basado en métodos anteriores (Boyum, 1964; Thorsby y Bratlie, 1970) y siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Axis-Shield). Parte de los linfocitos procedentes de individuos sanos, junto con las muestras pertenecientes a los pacientes de los grupos de IC, TC, IP y MS fueron procesadas en la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante del Hospital La Fe (Valencia) utilizando el reactivo Ficoll-paque Plus (GE Healthcare).

Tras la obtención de todas las muestras de miocardio y linfocitos, se congelaron y almacenaron a -80°C y se mantuvieron en esas condiciones hasta su análisis.

3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (RT-PCR A TIEMPO REAL)

El análisis cuantitativo de la expresión de los diferentes genes objeto de estudio se realizó con la técnica de RT-PCR a tiempo real. Esta técnica consta de varios pasos, entre los que se encuentran extracción y análisis cualitativo / cuantitativo de los niveles de ARNm, transcripción reversa (RT) y amplificación (qPCR). Todos ellos se detallan a continuación.

3.1 Extracción y análisis cualitativo /cuantitativo del ARN total

El protocolo de extracción del ARN total varió ligeramente en función del tipo de muestra. Las muestras de miocardio precisaron de triturado y homogeneizado previo utilizando un mortero congelado con nitrógeno líquido para mantener siempre las muestras con la temperatura apropiada y así evitar la posible degradación del ARN. En cambio, los linfocitos no precisaron de homogenizado. Todas las muestras fueron lisadas con 1 ml del reactivo Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science, US) con sucesivos ciclos de agitación con vortex para facilitar el lisado de la muestra.

El aislamiento de ARN total tuvo lugar con varias centrifugaciones utilizando productos de menor a mayor hidrofilia. Se realizó una primera centrifuga en presencia de 200 ml cloroformo para facilitar la separación y precipitación del ADN genómico. En este punto, el ARN quedó disuelto en la parte acuosa. A continuación se añadió 500 ml de isopropanol para facilitar la precipitación de los ácidos nucleicos. El pellet se lavó con 1 ml de etanol diluido al 70% en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), se dejó secar y se resuspendió en el volumen mínimo necesario de agua tratada con DEPC. Fue almacenado a -80°C para su posterior análisis.

La integridad y concentración de 1 µl de ARN total extraído se determinó utilizando el sistema automático Experion™ RNA StdSens Analysis kit (Bio-Rad). Dicho sistema se basa en la separación, detección y análisis del ARN mediante electroforesis microfluídica siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. El programa informático nos dio los valores de concentración (ng/ml) por muestra, el valor de cociente de área entre los picos de ARN ribosomales (razón 28S/18S), así como el RQI como indicador de la calidad del ARN. EL RQI mide la

integridad del ARN por comparación del electroferograma de las muestras de ARN y una serie de muestras estandarizadas de ARN degradado. Éste sistema nos proporciona un rango de RQI = 1 - 10 en función del grado de degradación del ARN, siendo RQI = 10 un ARN intacto y RQI=1 un ARN altamente degradado. El valor medio de RQI de las muestras incluidas en el estudio es de: 8.01 ± 0.11 .

3.2 Transcripción reversa (RT) – Síntesis de ADNc

La Transcripción Reversa (RT) consiste en convertir el ARN mensajero (ARNm) en ADN complementario (ADNc). Para ello se utilizó la enzima Improm-II™, se trata de una enzima de alta sensibilidad que permite utilizar cantidades pequeñas (0.1-1 µg) de ARN total para que se lleve a cabo la reacción. Tras incubar el ARN total con el cebador oligo(dT₁₆) (250 ng) en agua-DEPC a 70°C con el fin de facilitar su unión a la cadena de ARN, se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa conteniendo tampón de reacción ImProm-II™, 3 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTPs), 20 U del inhibidor de ribonucleasas recombinante RNAsin® y 1 µl de la enzima Transcriptasa Reversa Improm-II™ (Promega Corp. Madison, USA). Se realizó un primer ciclo de hibridación a 25°C durante 5 minutos, seguidamente, la reacción de extensión tuvo lugar a 42°C durante 60 minutos y, finalmente, la enzima fue desactivada incubando las muestras a 70°C durante 15 min. El ADNc sintetizado fue almacenado a -20°C para su uso posterior.

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

Se utilizó el sistema de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) para detectar con elevada sensibilidad y precisión la presencia de un ARNm concreto. Los ADNc codificantes para cada uno de los genes objeto de estudio (eNOS, nNOS, NT-3, TrkC, ARs- α_1 , ARs- β) y para GAPDH como control

interno, se cuantificaron utilizando sondas Taqman® como compuesto con propiedades fluorescentes. Diluciones 1/10 de la reacción de transcripción reversa previa fueron analizadas por duplicado mediante Taqman® Gene Expression Assays, consistentes en una mezcla 20X de cebadores y sonda Taqman® MGB marcada con el fluorocromo 6-FAM™ en el extremo 5' de la sonda y un *quencher* o apantallador no fluorescente en el extremo 3', diseñados para la detección y cuantificación de secuencias génicas específicas por RT-PCR a tiempo real de dos pasos. El termociclador utilizado para llevar a cabo la amplificación fue GeneAmp 7500 Fast System (Applied Biosystems, USA).

En la Tabla 4 se muestran los datos de los ensayos Taqman® para determinar la expresión génica en muestras de humanos y rata.

Tabla 4. Taqman® Gene Expression Assays

Humano	
Gen	Id. Ensayo
nNOS	Hs00167223_m1
eNOS	Hs00167166_m1
NT3 (linfocitos)	Hs00267375_s1
NT3 (miocardio)	Hs01548350_m1
TrkC	Hs00176797_m1
α_{1A}	Hs00169124_m1
α_{1B}	Hs00171263_m1
α_{1D}	Hs00169865_m1
β_1	Hs00265096_s1
β_2	Hs00240532_s1
GAPDH	Hs99999905_m1
Rata	
nNOS	Rn00583793_m1
iNOS	Rn00561646_m1
eNOS	Rn02132634_s1
NT3	Rn00579280_m1
GAPDH	Rn99999916_s1

Datos proporcionados por Applied Biosystems (USA).

Las mayoría de las sondas empleadas fueron diseñadas para hibridar en la unión exón-exón y así mejorar la especificidad de hibridación y evitar la contaminación por ADN genómico (*Taqman® Gene Expression Assays protocol*, Applied Biosystems, US). Sin embargo, en el caso de la sonda para NT-3 de muestras humanas, se utilizó por un lado en linfocitos una sonda que mapea en un solo exón y que detecta dos variantes de ARNm (v1 y v2) además de ADN genómico y, por otro lado, la sonda utilizada para muestras de miocardio mapea entre dos exones y, por tanto, no detecta ADN genómico, aunque solo detecta una variante de ARNm. Cabe destacar que para llevar a cabo la selección de las sondas apropiadas en unas muestras u otras se realizó el análisis de correlación entre ambas sondas en muestras de miocardio, observándose una correlación positiva y significativa entre ellas (Figura 1). De esta forma, la elección para un tipo de muestra u otro se llevó a cabo con el fin de obtener niveles de expresión aceptables en cada caso.

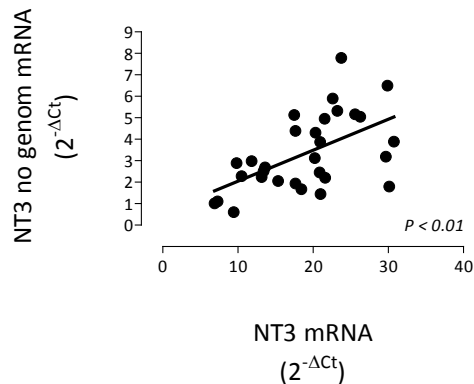


Figura 1. Regresión lineal entre lo niveles de expresión génica detectados por dos tipos de sondas de NT-3 en ventrículo izquierdo. *Resultados de n = 32 valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia (2^{-ΔCt}).*

Todas las reacciones se ajustaron a un volumen de 25 μl con *Taqman*[®] *Universal Master Mix (AmpliAq Gold*[®] *DNA Polymerase*; Applied Biosystems, US), incluyendo 5 μl de la dilución de la reacción de transcripción reversa y 1.2 μl de la mezcla 20X de sonda (250 nM) y cebadores (900 nM) (*Taqman*[®] *Gene Expression Assay*). El ADNc fue amplificado según las condiciones del fabricante con un primer paso de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos compuestos de dos pasos, la desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y la hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.

3.4 Análisis de los resultados

Los valores del ciclo umbral ("*threshold cycle*", Ct) obtenidos para cada gen en cada reacción fueron calculados mediante el programa *7500 Fast sequence-detection-system* (Applied Biosystems, US). Los valores Ct fueron normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH, siendo ΔCt la diferencia entre el gen estudiado y el de referencia (GAPDH). El valor ΔCt se transformó matemáticamente mediante la expresión $2^{-\Delta\text{Ct}}$, directamente proporcional al número inicial de copias de cada gen.

4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA (WESTERN BLOT)

El análisis cuantitativo de la expresión proteica se llevó a cabo en muestras de ventrículo izquierdo de voluntarios sanos y con IC. En el resto de muestras no se llevó a cabo esta cuantificación debido a la cantidad de muestra requerida para ello. Dicho análisis se realizó mediante extracción y cuantificación de proteínas totales (Bradford[®]), inmunodetección por Western Blot y posterior cuantificación por densitometría.

4.1 Extracción y cuantificación del contenido proteico

Se obtuvo el homogeneizado de muestras de ventrículo izquierdo de individuos sanos y con IC como previamente se ha descrito en el apartado 2.1 de la presente tesis. Dicho homogeneizado fue añadido a un tubo que contenía la solución de lisis RIPA (50 mM HEPES pH=7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolato sódico) junto a una mezcla comercial que contenía inhibidores de proteasas (Complete®, Roche Diagnostics) y de fosfatasa (PhosSTOP®, Roche Diagnostics). Posteriormente, los homogeneizados se sonicaron (Microson™ *ultrasonic cell disruptor*) a 4°C durante 3 ciclos de 5 segundos y, a continuación, se centrifugaron 20 minutos a 4°C y 16.100 g. El sobrenadante obtenido, el cual contenía las proteínas solubles totales, fue alicuotado y almacenado a -80°C. La cuantificación de las proteínas se determinó mediante el método Bradford (BioRad) utilizando la albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) para establecer la curva estándar.

4.2 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Una vez cuantificadas las muestras, se prepararon 150 µg de proteína total con tampón de carga (60 mM Tris-HCl pH=6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos.

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis húmeda utilizando geles de poliacrilamida del 7% y con tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris pH=8.3, 192 mM glicina y 0.1% SDS) a un voltaje constante de 115 V durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo, los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinildieno (PVDF) durante 2

horas a 4°C a un amperaje constante de 375 mA en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (25 mM Tris pH=8.3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.01% SDS). Tanto para la electroforesis como para la transferencia se utilizó el sistema *Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System* (BioRad).

Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 6% en tampón fosfato salino (Roche) con 0.1 % *Tween* 20 (Bio-Rad) (PBS-T) en el caso de NT-3, eNOS y GAPDH, y con albúmina de suero bovino al 3% (BSA, Sigma) para la forma fosforilada de eNOS (p-eNOS). Tras varios lavados con PBS-T, se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales (Tabla 5) diluidos en sus correspondientes soluciones de bloqueo. Posteriormente, se realizaron diversos lavados y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa adecuados en cada caso diluidos en PBS-T durante 50 minutos a temperatura ambiente. Como control de carga se utilizó el anticuerpo policlonal frente a GAPDH.

Tabla 5. Anticuerpos policlonales utilizados en Western Blot

Proteína	PM	Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
p-eNOS	140 KDa	Ac. policlonal de conejo (9571; Cell Signaling)	1:400	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500
eNOS	140 KDa	Ac. monoclonal de ratón (610247; BD Biosciences)	1:500	Anti-mouse IgG (Sigma Aldrich)	1:7500
NT-3	35 KDa	Ac. policlonal de conejo (sc-547; Santa Cruz)	1:500	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500
GAPDH	34 KDa	Ac. policlonal de conejo (G9545; Sigma Aldrich)	1:7000	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare)	1:2500

Datos proporcionados por Cell-Signaling, Beckton and Dickinson Biosciences, Santa Cruz Technology, General Electric Healthcare, Sigma Aldrich, en función del anticuerpo utilizado.

Las bandas fueron detectadas mediante incubación con el reactivo quimioluminiscente ECL™ *Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare). En el caso de las proteínas con parecido peso molecular (PM) (p-eNOS vs eNOS; NT-3 vs GAPDH) se utilizó la misma membrana lavando, entre la incubación de uno y otro, con la solución de *stripping* (100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 625 mM Tris-HCl pH: 6,7) cuya finalidad es eliminar los anticuerpos primario y secundario para poder volver a incubar las membranas con otros anticuerpos de similar PM.

4.3 Análisis de los resultados

Las imágenes de quimioluminiscencia fueron capturadas mediante el *Autochemi™ Bioimaging System* usando el soporte informático de captura *Labworks 4.6* (Ultra-Violet Products), gracias al cual también se realizó el análisis densitométrico mediante densitometría óptica de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas objeto de estudio, normalizando con respecto a la densidad óptica obtenida para el control de carga GAPDH, y expresando los resultados como unidades arbitrarias de proteína inmunodetectable.

5. ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR (ÓRGANO AISLADO)

Con el fin de determinar las concentraciones adecuadas de los compuestos a utilizar en angiogénesis, se diseñaron estudios funcionales de contractilidad y relajación vascular en aorta torácica de ratas Wistar comparando con sus respectivos controles y siguiendo los protocolos que se detallan a continuación.

5.1 Fármacos utilizados

Las características de los fármacos utilizados en el presente apartado se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Fármacos utilizados en estudios funcionales de reactividad vascular

Fármacos	Siglas	Proveedor	Rango diluciones	Vehículo
(R)-(-) fenilefrina hidrocloreuro	Fe	Sigma Aldrich (P-6126)	$10^{-8} - 10^{-5}$ M	Agua
Acetilcolina	Ach	Sigma Aldrich (A-6625)	$10^{-7} - 10^{-4}$ M	Agua
Nw-nitro-L-arginina metil éster	L-NAME	Sigma Aldrich (N-5751)	10^{-4} M	Agua
S-metil-L-citrulina	SMTC	Sigma Aldrich (M5171)	10^{-6} ; 5×10^{-6} M	Agua
Diethylenetriamine/nitric oxide adduct	DETA-NO	Sigma Aldrich (D185)	$10^{-9} - 10^{-4}$ M	Agua
Nitroglicerina	NTG	Solinitrina® (Almirall, 945410)	$10^{-10} - 10^{-5}$ M	Agua
1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one	ODQ	Sigma Aldrich (O3636)	5×10^{-5} M	DMSO (dimetil sulfóxido)

Datos proporcionados por Sigma Aldrich o Almirall, en función del fármaco.

5.2 Montaje del tejido

Una vez la aorta fue extraída y la grasa perivascular eliminada, se cortó en anillos de aproximadamente 4 mm de longitud. El tejido estuvo en todo momento en solución nutritiva de Krebs (118 mM de NaCl; 4,75 mM de KCl; 1,8 mM de CaCl₂; 1,2 mM de MgCl₂; 1,2 mM de KH₂PO₄; 25 mM de NaHCO₃ y 11 mM de Glucosa). A través del lumen de cada anillo se introdujeron dos finos alambres paralelos de acero inoxidable mediante los cuales la preparación se fijó, por un lado al baño y por otro se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento tipo Grass FT03, acoplado a un sistema de adquisición de datos (PowerLab/8SP;

ADInstruments), y registrando los cambios de tensión isométrica gracias al soporte informático Chart v5.0.2 (ADInstruments). Cada uno de los anillos se introdujo en un baño de órganos conteniendo 10 ml de solución fisiológica de Krebs. El baño se mantuvo en todo momento a 37°C de temperatura y con aporte constante de carbógeno (mezcla del 95% de O₂ / 5% de CO₂).

Antes de iniciar cada protocolo experimental, las preparaciones se sometieron a una tensión inicial de 1 g y se dejaron estabilizar durante un periodo de 60 minutos.

5.3 Protocolos experimentales

Los protocolos experimentales se realizaron siguiendo las bases establecidas anteriormente por nuestro grupo de investigación (Gisbert y cols., 2003).

5.3.1 Meseta de contracción con KCl (80 mM)

Al finalizar el periodo de estabilización de 60 minutos y para comprobar la capacidad contráctil de los vasos, éstos se contrajeron con una solución despolarizante obtenida de la sustitución equimolecular en la solución de Krebs de NaCl por KCl a una concentración de 80 mM. La meseta de contracción se mantuvo durante 10 minutos antes de los lavados y su magnitud fue utilizada como contracción de referencia para el resto de agentes contráctiles.

5.3.2 Determinación de la presencia de endotelio funcional

Tras un periodo de lavado de 15 minutos de la solución despolarizante, se comprobó la presencia o ausencia de endotelio mediante la adición del agonista muscarínico acetilcolina (ACh; 10⁻⁵ o 10⁻⁶ M, dependiendo del protocolo) (Sigma Aldrich), sobre la meseta de contracción inducida por el agonista α₁- adrenérgico

no-selectivo fenilefrina (Fe; 10^{-6} M) (Sigma Aldrich). Las preparaciones se consideraron con endotelio funcional cuando la relajación con Ach alcanzó entre un 60-90 % (Furchgott, 1980). Se consideraron anillos sin endotelio aquellos en los que la relajación con Ach fue menor del 20%. El resto se descartan. Tras comprobar la integridad funcional del endotelio, las preparaciones se lavaron para recuperar el tono basal. Se trabajó en presencia de endotelio funcional. A partir de este momento, se llevaron a cabo distintos protocolos experimentales.

5.3.3 Curvas concentración-respuesta de determinación de concentraciones de L-NAME y SMTC

Cabe destacar que los experimentos para la determinación de la concentración adecuada de L-NAME (inhibidor no-selectivo de NOS), fueron realizados en nuestro grupo de experimentación en ensayos previos al desarrollo de la presente tesis doctoral (Victor y cols., 2009; Flacco y cols., 2013b). En este caso, la concentración elegida fue de 10^{-4} M.

Con el fin de determinar las concentraciones adecuadas a utilizar en angiogénesis de SMTC y, tras 30 minutos de recuperación del tono basal, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) añadiendo concentraciones acumulativas crecientes de Fe como agente contráctil (10^{-8} a $10^{-5.5}$ M) cada 5 minutos y hasta alcanzar el máximo de respuesta contráctil. Seguidamente, sobre las mesetas de contracción obtenidas, se construyeron CCR de relajación por adición de concentraciones acumulativas crecientes de Ach (10^{-7} a 10^{-4} M) cada 5 minutos. Una vez alcanzada la máxima relajación (100%) y tras 30 min de lavado, se adicionó SMTC (10^{-6} y 5×10^{-6} M). Se dejó en el baño durante 30 minutos y, transcurrido este tiempo, se realizaron CCR de contracción con concentraciones

acumulativas crecientes de Fe (10^{-8} a 10^{-5} M) y de relajación con Ach (10^{-7} a 10^{-4} M). En la Imagen 4 se representa gráficamente el protocolo utilizado.

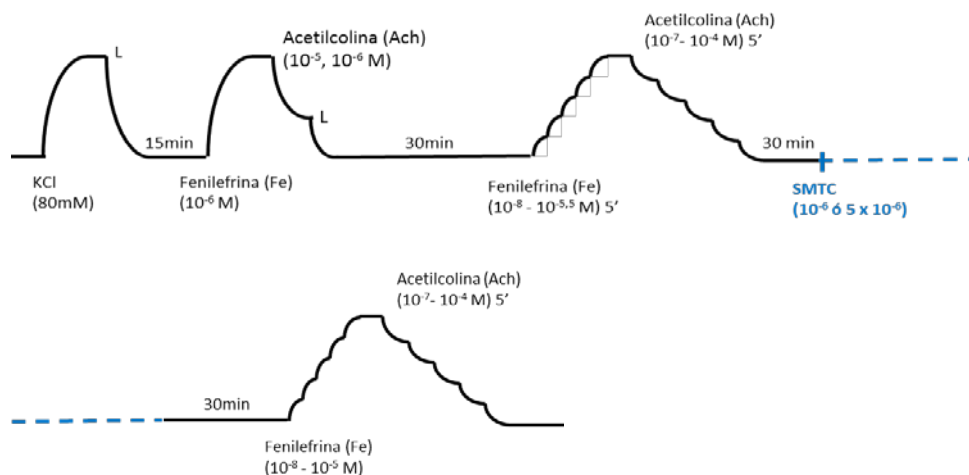


Imagen 4. Protocolo experimental utilizado para la realización de curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción con fenilefrina o de relajación con acetilcolina en presencia o ausencia de SMTC.

Fe: fenilefrina; *L:* lavado o recambio de la solución de Krebs; *Ach:* acetilcolina; *SMTC:* S-metil-L-citrulina.

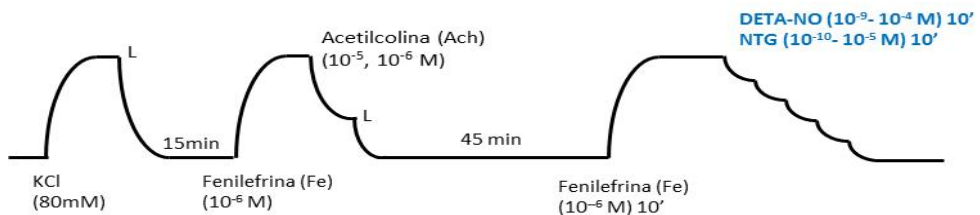
5.3.4 Curvas concentración-respuesta de determinación de concentraciones de DETA-NO y Nitroglicerina

Con el fin de determinar las concentraciones adecuadas a utilizar en angiogénesis de DETA-NO y Nitroglicerina (NTG) se realizó el protocolo descrito anteriormente de estabilización y contracción con KCl, además de la determinación de la presencia de endotelio funcional. Tras 45 minutos de recuperación del tono basal se llevó a cabo una meseta de contracción inducida

Material y métodos

tras adicionar al baño una concentración de 10^{-6} M de Fe en presencia o ausencia de ODQ. Sobre esta meseta de contracción se adicionaron concentraciones acumulativas crecientes de DETA-NO (10^{-9} a 10^{-4} M) o NTG (10^{-10} a 10^{-5} M) cada 10 minutos. Cabe destacar que el ODQ se adicionó en las curvas de relajación con DETA-NO para determinar si su acción relajante se llevaba a cabo a través de la enzima guanilato ciclasa. En la Imagen 5 se representan gráficamente los protocolos utilizados.

A)



B)

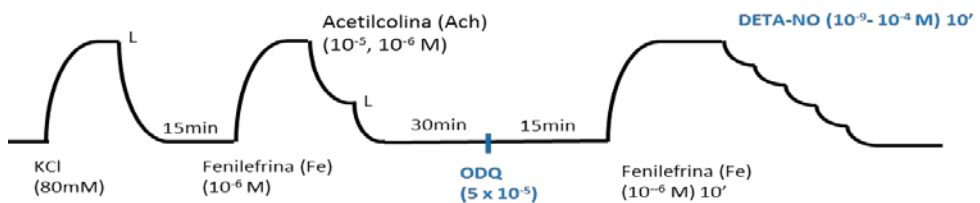


Imagen 5. Protocolos experimentales utilizados para la realización de curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción con fenilefrina o de relajación con DETA-NO o NTG en **(A)** ausencia o **(B)** presencia de ODQ.

Fe: fenilefrina; L: lavado o recambio de la solución de Krebs; Ach: acetilcolina; SMTc: S-metil-L-citrulina.

5.4 Análisis de los resultados

Las curvas concentración-respuesta de contracción con fenilefrina y de relajación con los diferentes agentes relajantes (Ach, DETA-NO o NTG) fueron ajustadas por regresión no-lineal (Graph Pad Software). Por una parte se obtuvo, como parámetro característico el $E_{m\acute{a}x}$, definido como el efecto máximo contráctil o relajante. En el caso del efecto contráctil, éste se expresó como el porcentaje respecto a la contracción inicial de KCl 80 mM, a la cual se le atribuyó el valor de 100 %. En cambio, para el efecto relajante, éste fue expresado como porcentaje respecto a la contracción previa con Fe. Otro parámetro característico fue la pEC_{50} , definido como el -logaritmo de la concentración de agonista capaz de producir el 50 % del $E_{m\acute{a}x}$.

6. ANGIOGÉNESIS

Los modelos de crecimiento vascular (angiogénesis) son ensayos útiles para la identificación del potencial pro-angiogénico de determinados agentes así como para realizar un cribado de inhibidores farmacológicos. Entre ellos se encuentra el modelo *ex vivo* de anillo de aorta de rata, desarrollado inicialmente por Nicosia y Ottinetti en 1990. Este modelo sirve de unión entre los modelos *in vivo* e *in vitro*. El uso de explantes vasculares intactos reproduce de forma más precisa lo que ocurre en angiogénesis comparado con cultivos celulares aislados. Considerando que *in vitro* la organización de las células endoteliales en estructuras tubulares similares a capilares se desarrolla en una matriz tridimensional, se realizó el cultivo de los explantes de aorta de rata, ratón y 2ª rama mesentérica de rata en Matrigel™ (BD Bioscience), un extracto del tumor de Engkebreth-Holm-Swarm de ratones formado por componentes de la membrana basal. A temperatura ambiente o superior el Matrigel™ polimeriza y produce una

matriz que contiene material biológicamente activo y degradable por plasmina, simulando así el tejido conectivo tridimensional en el que se encuentran las células *in vivo*. El ensayo fue puesto a punto con algunas modificaciones del método descrito originariamente por Nicosia y Ottinetti (1990).

6.1 Fármacos utilizados

Los fármacos utilizados en los ensayos de angiogénesis se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Fármacos empleados en ensayos de angiogénesis

Fármacos	Siglas	Proveedor	Rango diluciones	Vehículo
N ω -nitro-L-arginina metil éster	L-NAME	Sigma Aldrich (N-5751)	10 ⁻⁴ M	Agua
S-metil-L-citrulina	SMTC	Sigma Aldrich (M5171)	10 ⁻⁶ M	Agua
Diethylenetriamine/nitric oxide adduct)	DETA-NO	Sigma Aldrich (D185)	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁵ y 10 ⁻⁴ M	Agua
Nitroglicerina	NTG	Solinitrina® (Almirall, 945410)	10 ⁻⁸ , 10 ⁻⁶ y 10 ⁻⁵ M	Agua
1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one	ODQ	Sigma Aldrich (O3636)	5 x 10 ⁻⁵ M	DMSO (dimetil sulfóxido)

Datos proporcionados por Sigma Aldrich o Almirall, en función del fármaco.

6.2 Protocolos experimentales

6.2.1 Protocolo general de estimulación

Todo el proceso descrito a continuación fue realizado en las máximas condiciones de esterilidad. Los distintos explantes vasculares fueron extraídos y diseccionados como se explica en el punto 1.2 de este apartado. Una vez el tejido estuvo limpio de la grasa perivascular se transfirió a un medio de cultivo EBM-

MV2 (*Endothelial cell basal medium MV2*, Promocell, Heidelberg, Alemania) con gentamicina (Genta-Gobens®; Normon) y anfotericina (Biowhittaker®; Cambrex) para evitar posterior contaminación, y se seccionó con un escalpelo en anillos de aproximadamente 1 mm de grosor. El ensayo se llevó a cabo en placa de 96 pocillos que se mantuvo en frío hasta su uso. Todos los materiales que estuvieron en contacto con el Matrigel™ debían permanecer en frío para evitar la solidificación de éste, la cuál tiene lugar a temperatura ambiente. El Matrigel™ se descongeló lentamente en hielo y en cámara fría (4°C) durante al menos 4 horas. Cuando se encontró en estado líquido, se vertieron 50 µl por pocillo y se sembró un anillo en cada pocillo, colocándolos en posición transversal. Transcurridos 30 minutos para que se produzca la solidificación del Matrigel™ a temperatura ambiente, con las arterias embebidas, se añadieron 200 µl del medio de cultivo EBM-MV2 enriquecido con FCS-25 (suero bovino fetal, 50 µl/ml) (medio basal, MB) y con diversos factores de crecimiento (FC) como hbFGF (factor de crecimiento de fibroblastos humano básico, 10 ng/ml), hEGF (factor de crecimiento epidérmico humano, 5 ng/ml), hVEGF (factor de crecimiento endotelial vascular humano, 0.5 ng/ml), R3IGF-1 (factor de crecimiento dependiente de insulina, 20 ng/ml), ácido ascórbico (1 µg/ml) e hidrocortisona (0.5 µg/ml), a éste medio se le denominó “MB + FC”. Finalmente, cuando se requirió, se adicionó 20 µl de cada estímulo por duplicado en los pocillos correspondientes. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 7 días, renovando el medio y los estímulos al día siguiente y posteriormente cada dos días desde el inicio del experimento.

6.2.2 Eliminación de la capa endotelial y adventicia

Con la finalidad de determinar la implicación de determinados tipos celulares en la angiogénesis, se llevó a cabo un grupo de experimentos en los que

se trabajó con arteria aorta en presencia y/o ausencia de las capas endotelial y adventicia. Los protocolos de eliminación de las capas se llevaron a cabo una vez las arterias estuvieron limpias de la grasa perivascular.

En el caso de la eliminación de la capa endotelial, ésta se realizó pasando alrededor de 20 veces una fina cánula por la luz del vaso. En cuanto a la eliminación de la capa adventicia, las aortas se introdujeron en un medio compuesto por DMEM / F12 (Sigma Aldrich), albúmina de suero bovino (BSA 1%, Sigma Aldrich), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 ug/ml) y colagenasa II (2 mg/ml, Sigma Aldrich) para que se llevara a cabo la digestión y se dejó durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se despegó la adventicia del resto de capas utilizando unas pinzas.

Se llevó a cabo el cultivo y seguimiento de crecimiento de nuevos vasos durante 7 días en presencia (E+ A+) o ausencia (E- A-) de ambas capas y en ausencia de endotelio (E- A+) o adventicia (E+ A-).

6.2.3 Formación de anillos quiescentes

Se llevó a cabo varios experimentos donde los anillos de aorta se convirtieron en anillos quiescentes, es decir, en anillos cuya actividad angiogénica espontánea fue suprimida preservando su capacidad para crecer nuevos vasos como respuesta a factores de crecimiento o daño de la pared del vaso. Para ello, se mantuvieron los anillos aórticos embebidos durante 14 días en medio EBM-MV2 (*Endotelial cell basal medium MV2*, Promocell, Heidelberg, Alemania) junto con los antibióticos gentamicina (Genta-Gobens®; Normon) y anfotericina (Biowhittaker®; Cambrex), el cuál se cambió cada 3 días (Nicosia, 2009).

6.2.4 Cambios en la expresión génica durante el crecimiento angiogénico

Con el fin de determinar que ocurre con la expresión de eNOS, nNOS y NT-3 durante el proceso angiogénico, se realizó un protocolo experimental en el cual se van tomando muestras del cultivo a lo largo de su desarrollo.

En primer lugar, tras sembrar los anillos en Matrigel™, algunos de ellos se recogieron inmediatamente y se congelaron en nitrógeno líquido, denominando esta primera muestra como “*día 0*”. Los anillos restantes se mantuvieron en cultivo angiogénico durante 7 días y transcurrido este tiempo, una parte de ellos se recogieron y congelaron (muestras a “*día 7*”) mientras que en las restantes placas se separaron los anillos de los nuevos vasos formados y se siguieron cuatro protocolos diferentes:

- A) Se almacenaron por separado a -80°C , los anillos y los nuevos vasos formados.
- B) Los nuevos vasos, desprovistos del anillo, se dejaron en cultivo en la misma placa durante 5 días más, se recogieron y se almacenaron a -80°C .
- C) Los anillos, separados de los nuevos vasos, fueron resembrados en una nueva placa con Matrigel™ y se mantuvieron durante 5 días más en cultivo (12 días totales). Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el mismo procedimiento que a los 7 días, es decir, se recogieron, por una parte los anillos junto a los nuevos vasos y, por otra parte el anillo y los nuevos vasos por separado y se almacenaron a -80°C .
- D) Las placas con los nuevos vasos desprovistos de anillo se introdujeron en cámara húmeda (4°C) con el fin de que el Matrigel™ se licuara. Se extrajo el medio y los nuevos vasos se resuspendieron con el volumen

adecuado de tripsina-EDTA al 0.25% (T4049, Sigma) con la finalidad de desprender las células. El medio extraído junto con los nuevos vasos tripsinizados, se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm y el pellet obtenido se resuspendió con medio de cultivo "MB + FC". Se sembraron 600 μ l de células por pocillo de placa de 24 sobre 300 μ l de Matrigel™ previamente solidificado. Insertos de 12 mm de diámetro y filtro de 0,4 μ m (Millicell®) fueron colocados en los pocillos que contenían el cultivo de nuevos vasos y en ellos se introdujeron, junto a medio de cultivo MB + FC, anillos aórticos que ya habían sido cultivados en Matrigel™ procedentes de los mismos animales que los nuevos vasos, o anillos aórticos de animales ajenos a ellos que no habían sido cultivados. Tras alcanzar la confluencia del 80% (5 días), el cultivo celular se recogió y se almacenó a -80°C.

6.2.5 Adquisición y análisis de imágenes

Se realizó el seguimiento diario del crecimiento de nuevos vasos desde el "día 3" hasta el último día de cultivo utilizando el microscopio invertido *Nikon Eclipse TE2000-S* (objetivo 2x) o el microscopio invertido *Leica DM IL LED Leica cámara* (objetivo 2.5x). El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa *Sigma Scan Pro* (Systat Software, Inc. Chicago IL) o *Leica Microsystems*, en función del microscopio utilizado. Con el fin de analizar la cinética de crecimiento de nuevos vasos, ésta se determinó midiendo la distancia en μ m alcanzada por los vasos en cuatro ejes determinados según los polos terrestres, tomando como punto de origen en cada caso la superficie externa del anillo y considerando hasta el extremo final de los nuevos vasos formados.

Además, para una mejor observación de la formación de nuevos vasos se llevó a cabo una tinción celular de fluorescencia al finalizar el experimento. Para ello se añadió 1 μ l de acetoximetilo (1 mg/ml) también denominado calceína (Invitrogen™ Molecular Probes Inc. Paisley, UK), un compuesto fluorógeno hidrofóbico que atraviesa la membrana plasmática de las células y una vez se encuentra en el citoplasma es hidrolizado por esterasas dando lugar a un derivado fluorescente hidrofílico (calceína libre) que queda atrapado en el interior celular al no poder atravesar la membrana plasmática. Se incubó 15 minutos a 37°C y a continuación se procedió a la visualización de los nuevos vasos formados mediante el microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse e800* (objetivo 4x) equipado con una cámara fotográfica *Nikon*. El programa informático empleado para la captura de imágenes fue *Nikon ACT-1*.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) para las n determinaciones obtenidas de diferentes muestras. El análisis estadístico incluye un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de medias múltiples (test de *Dunnett*), el test *t de Student* para muestras independientes y el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para estudiar simultáneamente dos factores (GraphPad Software). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

Para determinar si existen correlaciones entre variables analizadas, se utilizó el análisis de regresión lineal y se evaluó el coeficiente de correlación de *Pearson* (GraphPad Software) que informa acerca de la existencia o no de relación lineal ($P < 0.05$), de la intensidad de correlación (según el valor absoluto del coeficiente de *Pearson* entre 0 y 1) y de su sentido (relación inversa o directa).

Resultados

NOS Y NT-3 EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR HUMANA

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En el presente estudio se incluyeron un total de entre 8 y 32 individuos en función de la patología cardiovascular diagnosticada. Las diferentes patologías objeto de estudio fueron: hipertensión arterial (HTA), insuficiencia cardiaca en fase terminal (IC), pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC), insuficiencia pulmonar (IP) y sujetos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS). Se determinaron las variables demográficas, antropométricas y clínicas de todos los grupos de población con el fin de evaluar el estado de los pacientes y su relación con la expresión de los genes eNOS, nNOS y NT-3. Cabe destacar que los voluntarios sanos fueron individuos con niveles normalizados de PA, que no presentaron signos de enfermedad cardiovascular diagnosticada y con un perfil bioquímico dentro de la normalidad. Además, a los pacientes con antecedentes familiares de muerte súbita, no se les determinó ninguna variable clínica, ya que son sujetos, al igual que los sanos, que no sufren ninguna enfermedad cardiovascular diagnosticada. En la Tabla 8 se representan los valores de edad, sexo e Índice de Masa Corporal (IMC) de la población sana y con diferentes cardiopatías.

Tabla 8. Variables demográficas y antropométricas de la población estudiada

	Control	HTA	IC	TC	IP	MS
Edad (años)	42 ± 4	46 ± 4	50 ± 2	46 ± 4	35 ± 2	44 ± 3
[Rango de Edad]	[23-68]	[31 – 60]	[17 – 64]	[16 – 53]	[17 – 55]	[31 – 57]
Hombre / Mujer	10 / 6	8 / 2	27 / 5	13 / 4	17 / 9	4 / 4
IMC (Kg/m ²)	27.1 ± 1.5	28.0 ± 1.2	27.0 ± 0.9	23.6 ± 0.8	26.3 ± 2.9	-
n	4 – 20	10	13 – 32	17	9 – 22	7

Los valores se expresan como la media ± e.e.m. HTA, hipertensión arterial; IC, insuficiencia cardiaca en fase terminal; TC, trasplante cardiaco; IP, insuficiencia pulmonar; MS, pacientes con antecedentes de muerte súbita; IMC, Índice de Masa Corporal.

1.1 Hipertensión arterial (HTA)

En la Tabla 9 se resumen las principales variables clínicas determinadas en los 10 pacientes con hipertensión arterial (HTA).

Tabla 9. Variables clínicas de pacientes con hipertensión arterial (HTA)

	HTA
<u>VARIABLES CLÍNICAS</u>	
<u>PA en consultorio (mmHg)</u>	
Sistólica	138 ± 2
Diastólica	86 ± 1
<u>PA de 24 h (mmHg)</u>	
Sistólica	135 ± 2
Diastólica	86 ± 1
<u>PA diurna (mmHg)</u>	
Sistólica	142 ± 2
Diastólica	92 ± 1
<u>PA nocturna (mmHg)</u>	
Sistólica	121 ± 2
Diastólica	72 ± 3
<u>Frecuencia cardiaca (l/min)</u>	
24 h	78 ± 3
Diurna	83 ± 3
Nocturna	68 ± 4

PA, presión arterial. Los valores se expresan como media ± e.e.m.

1.2 Insuficiencia cardiaca (IC)

En la Tabla 10 se resumen las principales variables clínicas de los 32 pacientes con insuficiencia cardiaca (IC). Los pacientes con los que se trabajó se encontraban en los estadios más graves (*III*, *III-IV*, y *IV*) de la enfermedad, de ahí que la insuficiencia se denomine en fase terminal. La IC puede tener diferentes etiologías como cardiopatía isquémica (CI) o miocardiopatía dilatada (MCD), entre otras, y, además, los pacientes pueden cursar con otras patologías asociadas como HTA o diabetes mellitus. Otras variables que se midieron fueron variables eco-cardiográficas, hemodinámicas y bioquímicas, además del tratamiento farmacológico al cual fueron sometidos los pacientes.

Tabla 10. Variables clínicas de pacientes con insuficiencia cardiaca en fase terminal (IC)

	IC
<u>Etiología y enfermedades asociadas</u>	
NYHA (I/II/III/III-IV/IV)	0/0/3/18/11
Cardiopatía isquémica	7 (22%)
Miocardiopatía dilatada	17 (53%)
Otros	8 (25%)
Hipertensión arterial	7 (22%)
Diabetes mellitus	4 (13%)
<u>Variables eco-cardiográficas</u>	
FEVi (Fracción de eyección del Vi) (%)	20.7 ± 2.1
DTdVi (Diámetro tele-diastólico del Vi) (mm)	66.7 ± 2.2
DTsVi (Diámetro tele-sistólico del Vi) (mm)	57.4 ± 2.5
<u>Variables hemodinámicas</u>	
PAPs (Presión arterial pulmonar sistólica) (mmHg)	53.4 ± 2.7
PAPd (Presión arterial pulmonar diastólica) (mmHg)	30.4 ± 1.7
PAPm (Presión arterial pulmonar media) (mmHg)	39.4 ± 1.9
PCP (Presión capilar pulmonar) (mmHg)	29.8 ± 1.6
RVP (Resistencia vascular pulmonar) (U.Wood)	3.1 ± 0.3
GC (Gasto cardiaco) (l/min/1.73 m ²)	3.7 ± 0.2
<u>Variables bioquímicas</u>	
NT-proBNP (pg/ml [P25-P75])	7316 ± 1610
Bilirrubina (mg/dl)	1.3 ± 0.1
GOT (U/l)	49.8 ± 15.8
GPT (U/l)	67.6 ± 24.9
<u>Tratamiento farmacológico</u>	
Estimulantes cardiacos (Dopamina, NA, Dobutamina)	9 (28%)
Espironolactona	23 (72%)
IECAs (Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina)	22 (69%)
Carvedilol	16 (50%)
Amiodarona	6 (19%)
Digoxina	12 (38%)

Los valores de las variables eco-cardiográficas, hemodinámicas y bioquímicas se expresan como la media ± e.e.m. NA, noradrenalina; NT-proBNP, precursor amino terminal del péptido natriurético tipo B; GOT, transaminasa glutámico oxalacética; GTP, transaminasa glutámico pirúvica; Vi, ventrículo izquierdo.

1.3 Trasplante cardiaco (TC)

En el estudio también se incluyeron 17 pacientes que, tras padecer una IC en fase terminal habían sido sometidos a trasplante cardiaco, tomándose las muestras entre los 14 y los 471 días posteriores al trasplante. En la Tabla 11 se resumen las principales variables clínicas de estos pacientes. El tratamiento farmacológico consistía en fármacos moduladores del sistema inmunológico para combatir la posible aparición de rechazo.

Tabla 11. Variables clínicas de pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC)

	TC
<u>Etiología y enfermedades asociadas</u>	
Hipertensión arterial	4 (24%)
Diabetes mellitus	1 (6%)
<u>Variables eco-cardiográficas</u>	
FEVi (Fracción de eyección del Vi) (%)	17 (100%)
FEVd (Fracción de eyección del Vd) (%)	17 (100%)
DTdVi (Diámetro tele-diastólico del Vi) (mm)	43.8 ± 1.3
DTsVi (Diámetro tele-sistólico del Vi) (mm)	26.4 ± 1.2
<u>Variables hemodinámicas</u>	
PAPs (Presión arterial pulmonar sistólica) (mmHg)	46.4 ± 2.8
PAPd (Presión arterial pulmonar diastólica) (mmHg)	27.4 ± 2.2
PAPm (Presión arterial pulmonar media) (mmHg)	34.8 ± 2.3
PCP (Presión capital pulmonar) (mmHg)	28 ± 2
RVP (Resistencia vascular pulmonar) (U. Wood)	2.5 ± 0.5
GC (Gasto cardiaco) (l/min/1.73 m ²)	3.2 ± 0.4
PTSVd (Presión tele-sistólica del Vd) (mmHg)	35 ± 2
PTDVd (Presión tele-diastólica del Vd) (mmHg)	9 ± 1
PAd (Presión de la aurícula derecha) (mmHg)	8 ± 1
Frecuencia cardiaca (l/min)	98 ± 1
<u>Tratamiento inmuno-modulador</u>	
Ciclosporina A	10 (59%)
Micofenolato Mofetilo	17 (100%)
Tacrólimus	7 (41%)
Everólimus	2 (12%)
Rapamicina	1 (6%)
Esteroides	17 (100%)

Los valores de las variables eco-cardiográficas y hemodinámicas se expresan como la media ± e.e.m.

1.4 Insuficiencia pulmonar (IP)

Se trabajó con 22 pacientes que desarrollaron insuficiencia pulmonar (IP) como consecuencia de cardiopatías de base intervenidas quirúrgicamente, como Tetralogía de Fallot y estenosis/agenesia pulmonar, entre otras. En la Tabla 12 se resumen las principales variables clínicas medidas en estos pacientes.

Tabla 12. Variables clínicas de pacientes con insuficiencia pulmonar (IP)

IP	
<u>Cardiopatía de base</u>	
Tetralogía de Fallot intervenida	18 (69%)
Estenosis pulmonar intervenida	5 (19%)
Agenesia pulmonar	1 (4%)
Otras	2 (8%)
<u>Enfermedades asociadas</u>	
Hipertensión arterial	6 (23%)
Dislipemia	3 (12%)
Diabetes mellitus	1 (4%)
<u>Variables eco-cardiográficas</u>	
FEVi (Fracción de eyección del Vi) (%)	59.1 ± 1.8
FEVd (Fracción de eyección del Vd) (%)	48.4 ± 2.2
DTdVi (Diámetro tele-diastólico del Vi) (mm)	44.1 ± 1.2
DTsVi (Diámetro tele-sistólico del Vi) (mm)	27.4 ± 1.0
DBVd (Diámetro basal del Vd) (mm)	49.6 ± 1.6
DMVd (Diámetro medio del Vd) (mm)	41.7 ± 2.6
<u>Variables hemodinámicas</u>	
PAPs (Presión arterial pulmonar sistólica) (mmHg)	29.4 ± 2.6
Frecuencia cardiaca (pulsaciones/min)	67.4 ± 2.3
<u>Variables bioquímicas</u>	
NT-proBNP (pg/ml [P25-P75])	237.5 ± 63.1
Na ⁺ (mEq/l)	140.0 ± 0.5
K ⁺ (mEq/l)	4.2 ± 0.1
Creatinina (mg/dl)	0.9 ± 0.1
Bilirrubina (mg/dl)	0.8 ± 0.1
GOT (U/l)	35.8 ± 6.2
GPT (U/l)	43.0 ± 10.0

Los valores de las variables eco-cardiográficas y hemodinámicas se expresan como la media ± e.e.m.

1.5 Muerte súbita (MS)

Se trabajó con muestras que corresponden a 7 sujetos que presentan antecedentes familiares de muerte súbita por Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (MS). Dichos sujetos no presentan ninguna sintomatología relacionada con patologías cardiovasculares, por tanto, se les realiza un seguimiento de distintas pruebas físicas pero no se les determina ninguna variable clínica.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE eNOS, nNOS, NT-3 y TrkC EN MIOCARDIO Y LINFOCITOS HUMANOS

2.1 Cambios de la expresión en patologías cardiovasculares

2.1.1 Expresión de eNOS

Se realizó un análisis comparativo de los niveles de ARNm de eNOS en Vi de voluntarios sanos y pacientes con IC y en Vd de pacientes con IC, TC e IP. No se observan cambios estadísticamente significativos entre los distintos grupos, ni entre ventrículos. No se dispone de muestras de Vd de donantes sanos para poder determinar posibles cambios en esta cámara relacionados con las patologías. Cabe destacar que, aunque parece aumentada la expresión de eNOS en Vi de pacientes con IC, este aumento no alcanza significación estadística porque existe una gran variabilidad en la expresión génica de eNOS en estos pacientes (Figura 2).

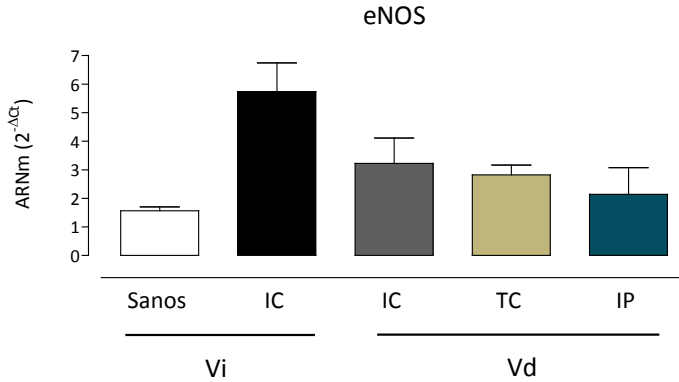


Figura 2. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de eNOS en miocardio de individuos sanos y con diferentes patologías cardiovasculares: insuficiencia cardiaca (IC), trasplante cardiaco (TC) e insuficiencia pulmonar (IP). Vi, ventrículo izquierdo; Vd, ventrículo derecho. Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 32$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta C_t}$). Análisis estadístico: *t* de Student.

Teniendo en cuenta la etiología de la IC, se llevó a cabo un análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm de eNOS en distintos subgrupos de pacientes con IC, agrupados según que su patología fuera cardiopatía isquémica (CI), miocardiopatía dilatada (MCD), o bien formaran parte de un grupo mixto de IC no isquémica, no dilatada (Otras). En la Figura 3 se observa que no existen diferencias significativas entre los distintos subgrupos.

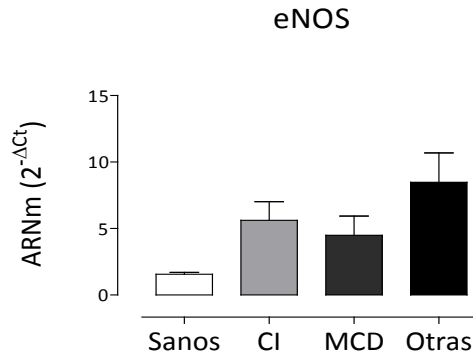


Figura 3. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de eNOS en ventrículo izquierdo de individuos sanos con respecto a pacientes insuficientes clasificados en función de su etiología: cardiopatía isquémica (CI), miocardiopatía dilatada (MCD) y cardiopatía no isquémica, no dilatada (Otras). Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 17$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet vs Sanos.

De igual forma, se analizaron los niveles de expresión génica de eNOS en linfocitos circulantes procedentes de voluntarios sanos, pacientes con HTA, IC, IP, TC y sujetos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS). Se observa cómo el ARNm de eNOS se encuentra significativamente disminuido en linfocitos de pacientes con IC o IP y en pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC) con respecto a voluntarios sanos. Cabe destacar que los niveles de expresión génica de eNOS en las muestras de sujetos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS) fueron muy similares a los niveles en los voluntarios sanos (Figura 4).

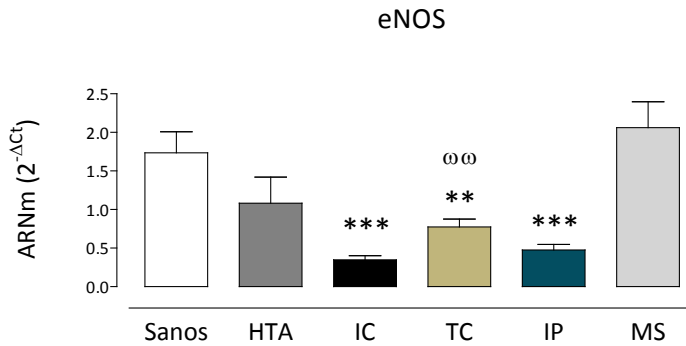


Figura 4. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de eNOS en linfocitos circulantes de individuos sanos y con diferentes patologías cardiovasculares: hipertensión arterial (HTA), insuficiencia cardiaca (IC), trasplante cardiaco (TC), insuficiencia pulmonar (IP) así como sujetos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS). Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 7 - 22$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet siendo ** $P < 0.01$ vs Sanos; $\omega\omega$ $P < 0.01$ vs IC según test t Student.

Tras el análisis de la expresión génica realizado en Vi, se determinó la expresión proteica en las mismas muestras. No se realizó dicho análisis en linfocitos por limitaciones en la cantidad de muestra. Se observa que a nivel proteico se reproduce la variabilidad observada a nivel de ARNm sin llegar a encontrar diferencias significativas entre miocardio sano y enfermo en la expresión de eNOS (Figura 5).

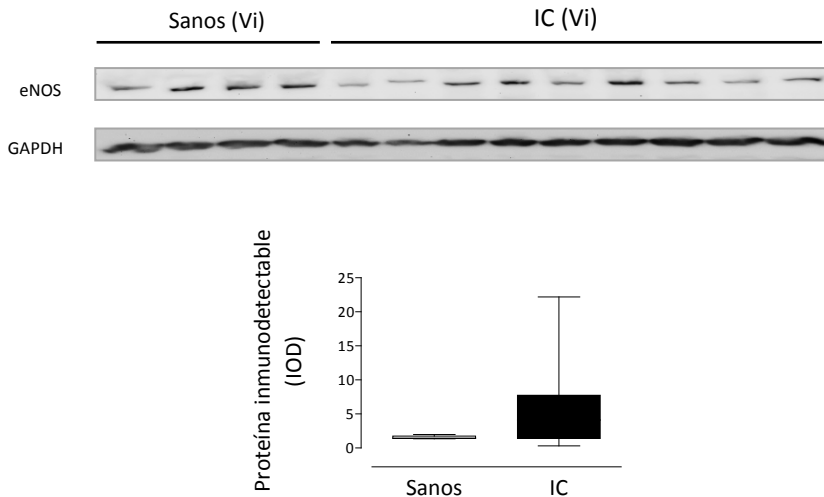


Figura 5. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión proteica de eNOS en ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) con respecto a sus controles sanos. *Valores normalizado, utilizando GAPDH como control de carga y expresados como el ratio de proteína inmunodetectable en IC vs sanos. Análisis estadístico: t de Student.*

2.1.2 Expresión de nNOS

Con respecto a los niveles de ARNm de nNOS, no se observan cambios en el Vi de pacientes con IC y no se dispone de muestras de Vd de donantes sanos para poder determinar posibles cambios en esta cámara. Lo que sí se observa es una expresión significativamente mayor en pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC) con respecto a los niveles de expresión en Vd de pacientes con IC o IP (Figura 6).

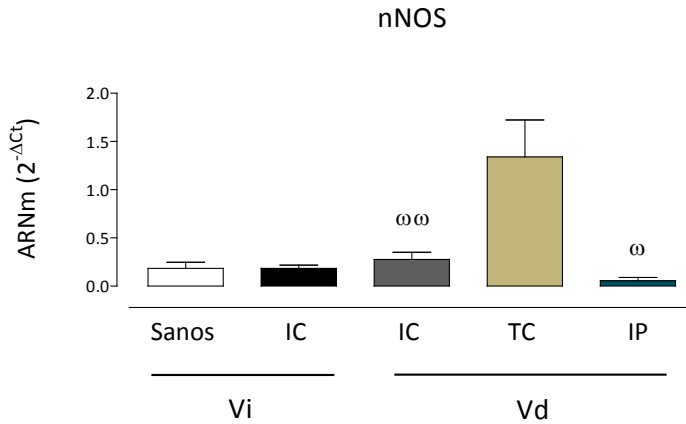


Figura 6. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de nNOS en miocardio de individuos sanos y con diferentes patologías cardiovasculares: insuficiencia cardiaca (IC), trasplante cardiaco (TC), insuficiencia pulmonar (IP). Vi, ventrículo izquierdo; Vd, ventrículo derecho. Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 32$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: t de Student siendo $\omega P < 0.05$ $\omega\omega P < 0.01$ vs TC.

Como en el caso de eNOS, se realizó el análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm de nNOS en función de la etiología de la IC pero no existen diferencias significativas entre ellas ni con respecto a los individuos sanos (Figura 7).

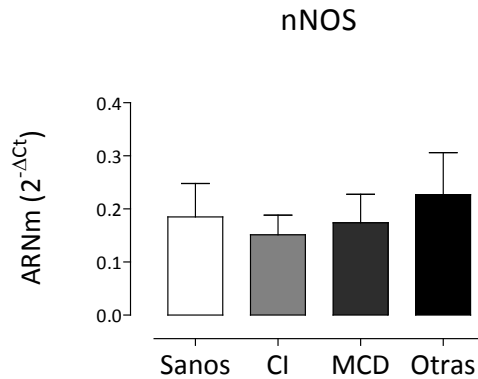


Figura 7. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de nNOS en ventrículo izquierdo de individuos sanos con respecto a pacientes insuficientes clasificados en función de su etiología: cardiopatía isquémica (CI), miocardiopatía dilatada (MCD) y cardiopatía no isquémica, no dilatada (Otras). Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 13$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet.

2.1.3 Expresión de NT-3

En miocardio, los niveles de expresión génica de NT-3 se encuentran significativamente aumentados en Vi de pacientes con IC con respecto a voluntarios sanos. Además, los niveles de ARNm en Vd de pacientes con IC o IP son significativamente menores respecto a los pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC) (Figura 8).

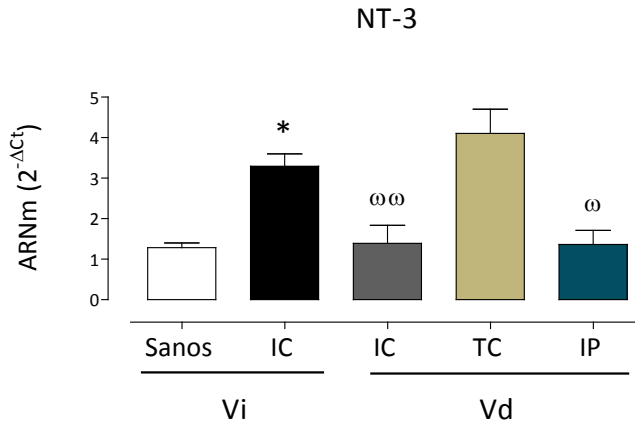


Figura 8. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de NT-3 en miocardio de individuos sanos y con diferentes patologías cardiovasculares: insuficiencia cardiaca (IC), trasplante cardiaco (TC), insuficiencia pulmonar (IP). Vi, ventrículo izquierdo; Vd, ventrículo derecho. Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 32$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: *t* de Student siendo * $P < 0.05$ vs Sanos; ω $P < 0.05$ $\omega\omega$ $P < 0.01$ vs TC.

Se realizó el análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm de NT-3 en función de la etiología de la IC (Figura 9). Se observa un aumento de la expresión en todos los casos aunque este aumento sólo es estadísticamente significativo en el caso de la MCD.

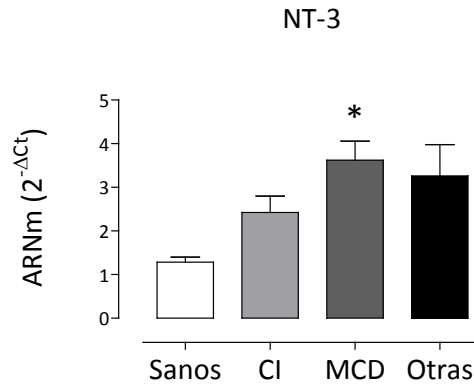


Figura 9. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de NT-3 en ventrículo izquierdo de individuos sanos con respecto a pacientes insuficientes clasificados en función de su etiología: cardiopatía isquémica (CI), miocardiopatía dilatada (MCD) y cardiopatía no isquémica, no dilatada (Otras). Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 17$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet.

En linfocitos, se observa como los niveles de ARNm de NT-3 se encuentran significativamente incrementados en los pacientes con HTA e IC con respecto a voluntarios sanos y a sujetos con antecedentes familiares de muerte súbita (MS) (Figura 10).

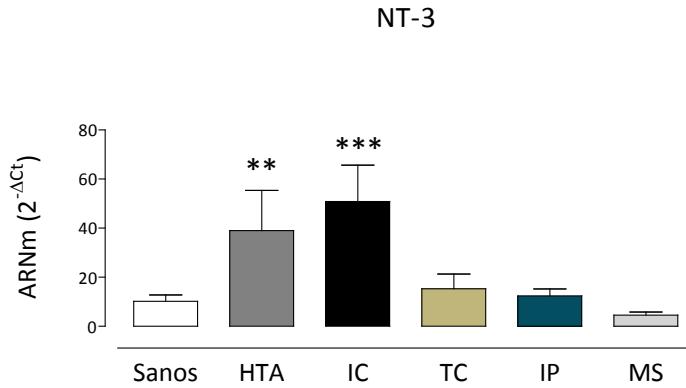


Figura 10. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de NT-3 en linfocitos circulantes de individuos sanos y con diferentes patologías cardiovasculares: hipertensión arterial (HTA), insuficiencia cardiaca (IC), trasplante cardiaco (TC), insuficiencia pulmonar (IP), antecedentes familiares de muerte súbita (MS). Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 6 - 19$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta C_t}$). Análisis estadístico: análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet siendo * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Sanos.

En cuanto a la expresión proteica de NT-3, no existen diferencias significativas en Vi de pacientes insuficientes con respecto a voluntarios sanos (Figura 11).

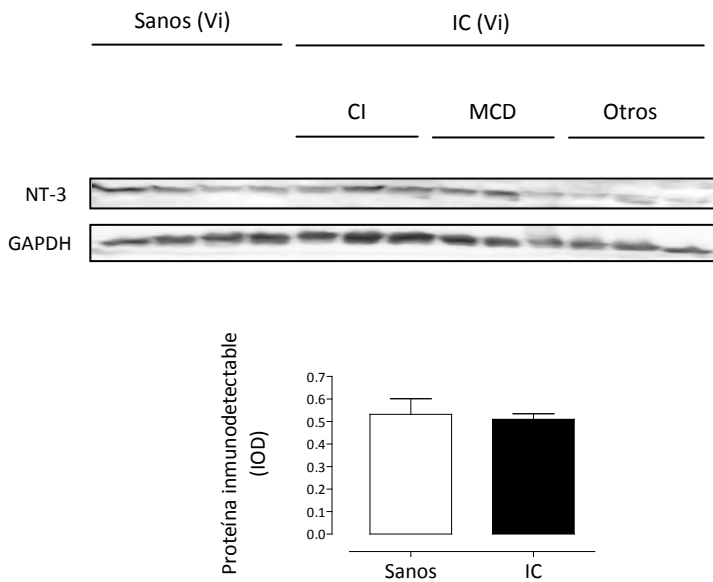


Figura 11. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión proteica de NT-3 en ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardiaca con respecto a sus controles sanos. *IC, insuficiencia cardiaca. Valores normalizados, utilizando GAPDH como control de carga, y expresados como el ratio de proteína inmunodetectable. Análisis estadístico: t de Student.*

2.1.4 Expresión de TrkC

Teniendo en cuenta los cambios de expresión génica de NT-3 encontrados en Vi de pacientes insuficientes con respecto a los individuos sanos, se determinaron los niveles de expresión del receptor al cuál se une, TrkC, en el mismo grupo de pacientes (Figura 12). Se observa que no existen diferencias significativas en pacientes insuficientes (IC) con respecto a individuos sanos, aunque se trata de resultados preliminares que requieren ser completados en un futuro.

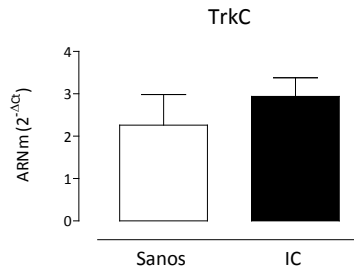


Figura 12. Análisis comparativo de niveles de expresión génica de TrkC en ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardíaca con respecto a sus controles sanos. IC, insuficiencia cardíaca. Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 9$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta C_t}$). Análisis estadístico: *t* de Student.

2.2 Cambios en la expresión génica en función del tratamiento farmacológico

El grupo de pacientes con IC estaban siendo tratados con numerosos fármacos que modifican la función cardíaca. Entre ellos se encuentran: dobutamina, noradrenalina y dopamina (estimulantes cardíacos), espironolactona (diurético antialdosterónico), IECAs (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), carvedilol (β -bloqueante), amiodarona y digoxina (antiarrítmicos), entre otros. Se realizó un análisis estadístico entre los pacientes que reciben o no cada uno de estos fármacos a fin de determinar si con estos tratamientos se producen cambios en la expresión génica de eNOS, nNOS y NT-3 en miocardio y/o linfocitos.

2.2.1 Miocardio

No se observan diferencias significativas entre los pacientes tratados o no con cada uno de los fármacos estudiados (Figura 13).

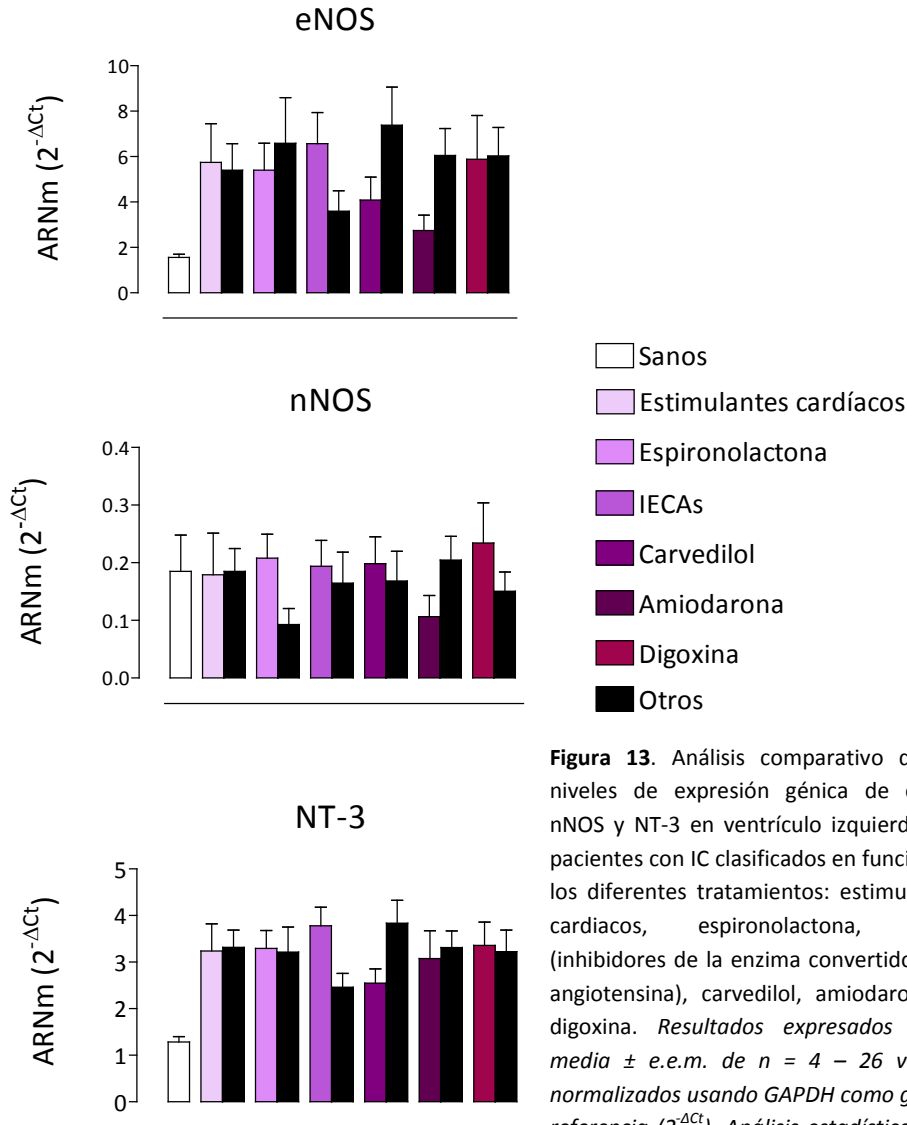


Figura 13. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de eNOS, nNOS y NT-3 en ventrículo izquierdo de pacientes con IC clasificados en función de los diferentes tratamientos: estimulantes cardíacos, espironolactona, IECAs (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), carvedilol, amiodarona, o digoxina. Resultados expresados como media \pm e.e.m. de $n = 4 - 26$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: *t* de Student.

2.2.2 Linfocitos circulantes

En cuanto al análisis comparativo realizado en linfocitos de pacientes con IC entre los niveles de expresión génica de eNOS y NT-3 y los diferentes tratamientos farmacológicos, se observa como tampoco existen diferencias significativas entre ellos (Figura 14).

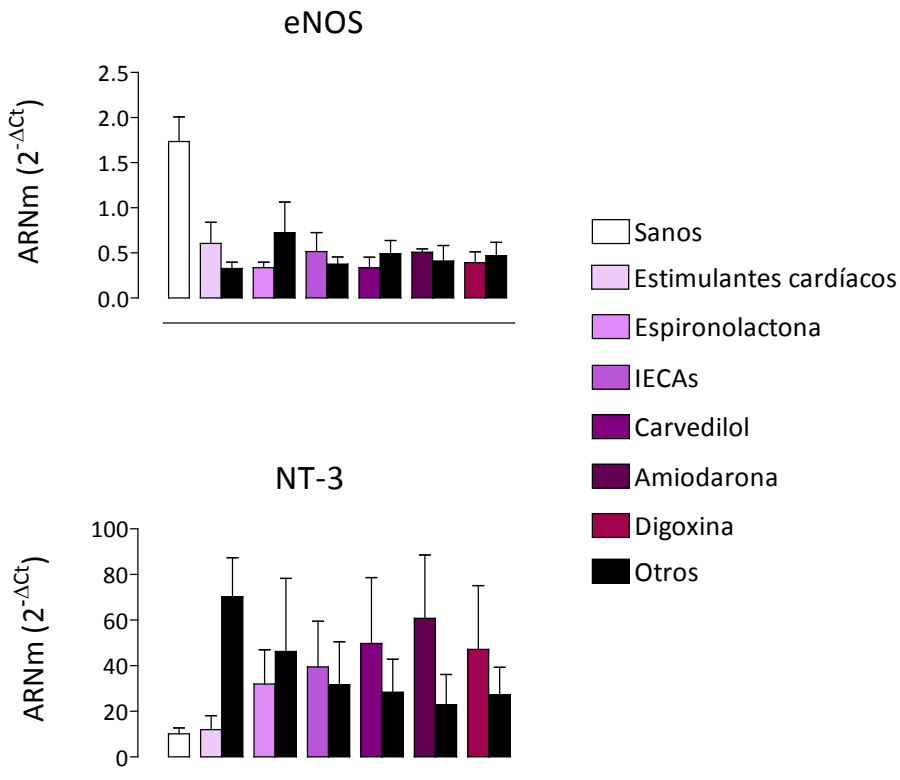


Figura 14. Análisis comparativo de los niveles de expresión génica de eNOS y NT-3 en linfocitos de pacientes con IC clasificados en función de los diferentes tratamientos: estimulantes cardíacos, espironolactona, IECAs (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), carvedilol, amiodarona, digoxina. Resultados expresados como media \pm e.e.m. de $n = 4 - 20$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: *t* de Student.

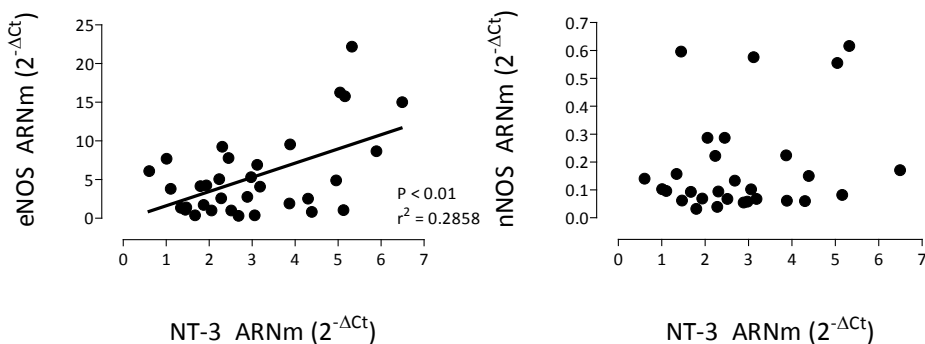
3. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTOS GENES EXPRESADOS EN UN MISMO TERRITORIO

Se analizó la posible correlación existente en miocardio (Vi y Vd) y linfocitos entre NT-3 y las enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico, eNOS y nNOS, o los adrenoceptores (ARs) α_1 y β , cuya expresión se había determinado en un trabajo anterior (Monto et al., 2012) en estas mismas muestras. Cabe destacar que las correlaciones no se realizaron con AR- β_3 debido a que su expresión génica es prácticamente indetectable.

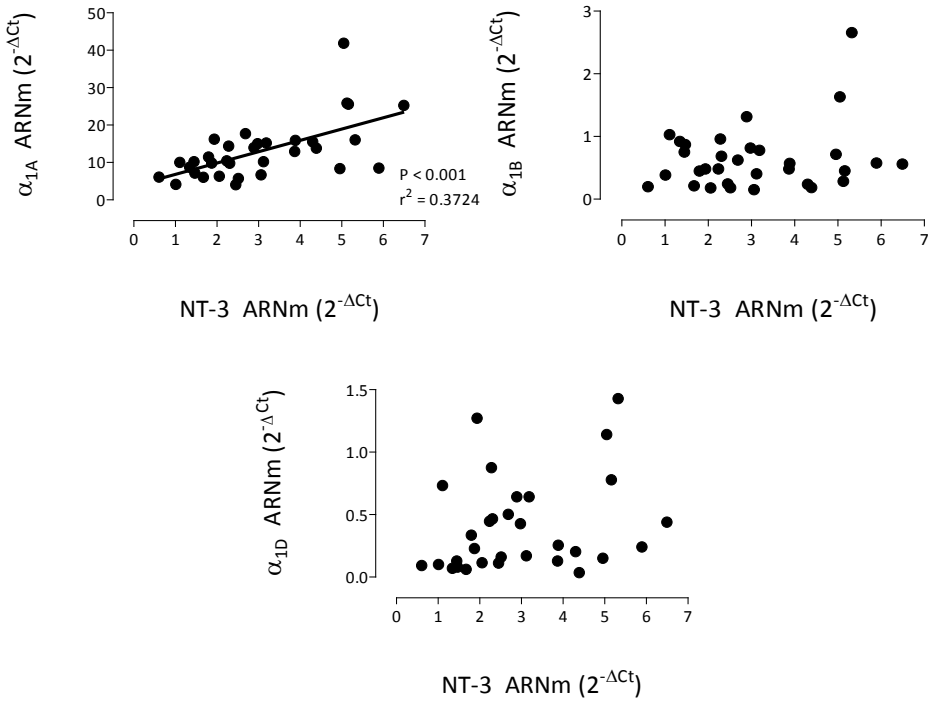
3.1 Ventrículo izquierdo

Se observa que existe correlación positiva y significativa entre los niveles de expresión de NT-3 con eNOS, AR- α_{1A} y β_2 en Vi de todos los individuos. También se encontró correlación directa entre NT-3 y ARs- β_1 cuando consideramos únicamente los resultados obtenidos con pacientes insuficientes. No se encontró correlación significativa entre NT-3 y AR- α_{1B} , α_{1D} o nNOS (Figura 15).

A) NOS



B) ARs- α_1



C) ARs- β

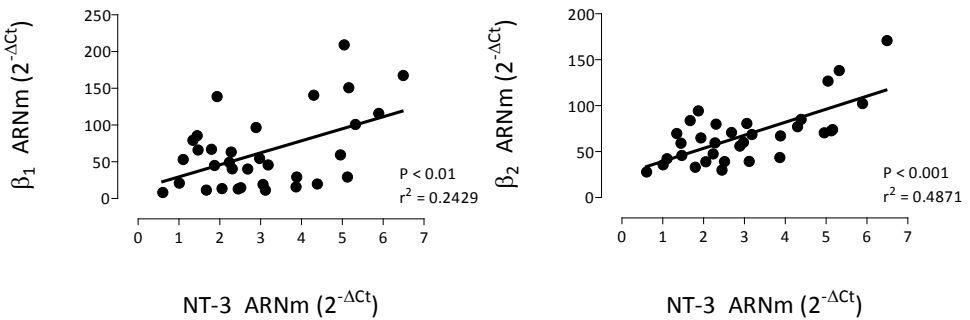
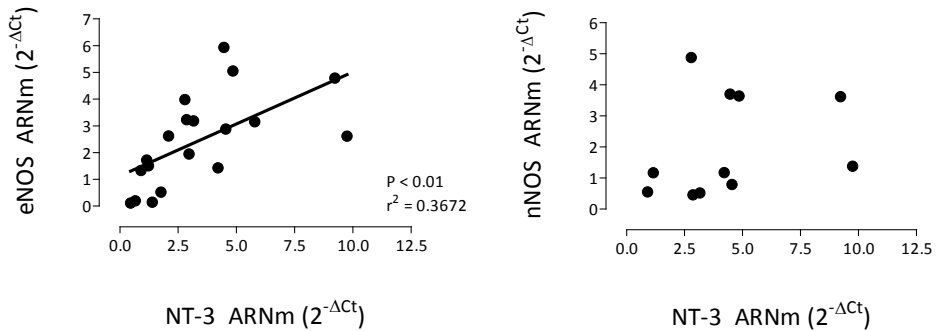


Figura 15. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de NT-3 y **(A)** isoformas constitutivas de NOS **(B)** ARs- α_1 y **(C)** ARs- β en ventrículo izquierdo. Resultados de los valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). $n = 29 - 36$, incluyendo controles y pacientes insuficientes, excepto en el caso de la correlación entre NT-3 y β_1 , en el que únicamente se consideran los pacientes con insuficiencia cardiaca.

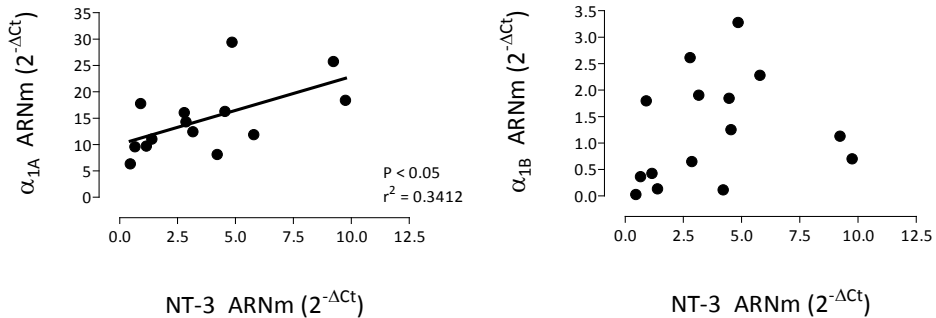
3.2 Ventrículo derecho

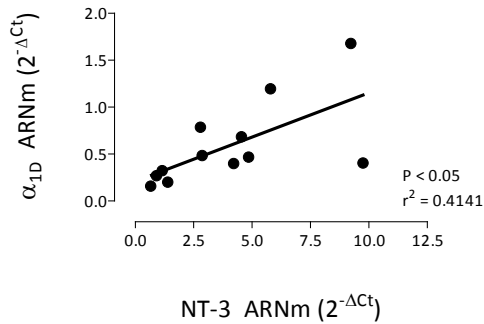
En esta cámara se llevó a cabo un análisis similar considerando la totalidad de las muestras. Cabe destacar que existe una correlación directa y significativa entre los niveles de ARNm de NT-3 con eNOS, AR- α_{1A} , α_{1D} , β_1 y β_2 (Figura 16).

A) NOS



B) ARs- α_1





C) ARs-β

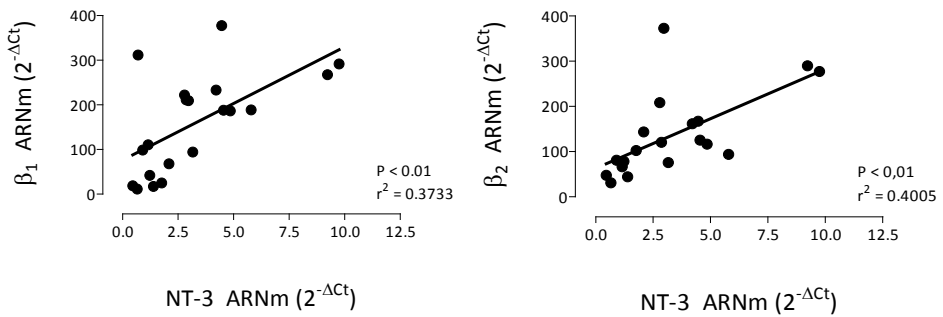


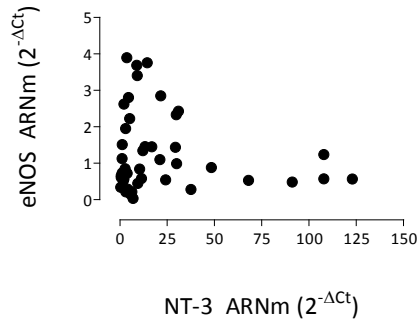
Figura 16. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de NT-3 y **(A)** isoformas constitutivas de NOS **(B)** ARs- α_1 y **(C)** ARs- β en ventrículo derecho. Resultados de $n = 12 - 20$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).

3.3 Linfocitos circulantes

Como en el caso del miocardio, se realizó un análisis de regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de NT-3 y la enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico (eNOS), los AR- β_1 y β_2 en linfocitos circulantes de todos los grupos de individuos. Cabe destacar que los niveles de expresión de los AR- α_1 ,

β_3 y nNOS en linfocitos fueron indetectables. Se observa como no existe correlación significativa entre NT-3 y el resto de genes estudiados (Figura 17).

A) NOS



B) ARs- β

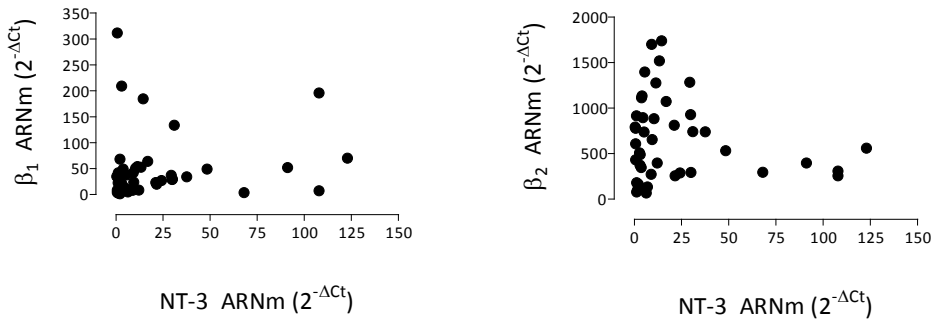
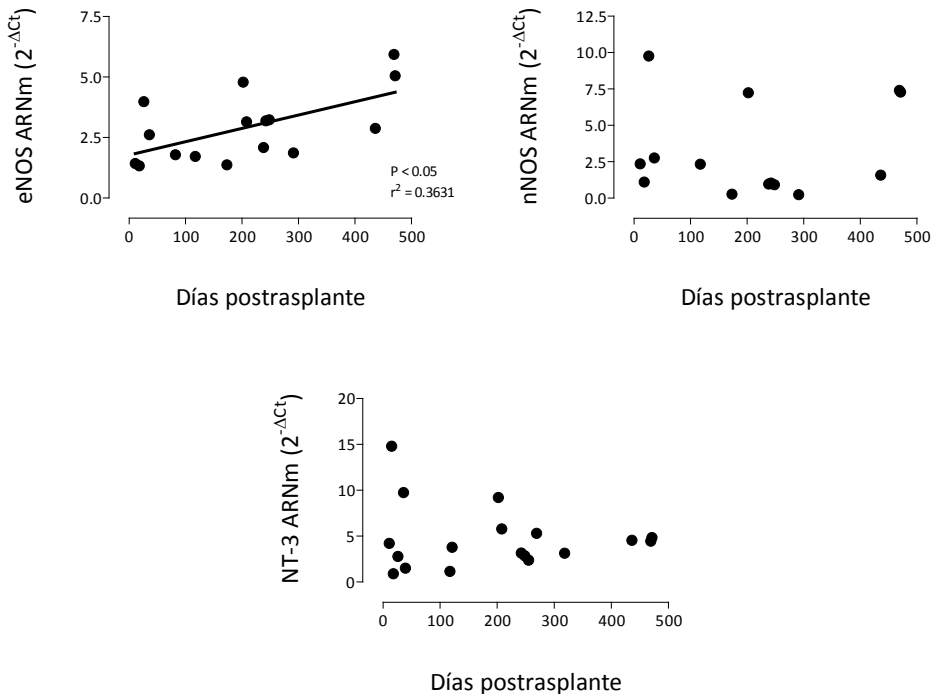


Figura 17. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de NT-3 y **(A)** NOSs y **(B)** ARs- β , en linfocitos humanos circulantes. *Resultados de $n = 44$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).*

3.4 Días postrasplante

Dado que el corazón trasplantado ha sufrido una denervación completa y pasa por un proceso de adaptación a su nuevo entorno, se analizó si el tiempo tras el trasplante implicaba cambios en la expresión de los genes estudiados. Para ello, tanto en muestras de miocardio (biopsias de Vd) como en linfocitos procedentes de pacientes sometidos a trasplante cardiaco, se realizó un análisis de regresión lineal entre los niveles de ARNm de eNOS, nNOS y NT-3 y los días transcurridos desde que se llevara a cabo el trasplante. Se observa como existe correlación directa y significativa tanto en miocardio como en linfocitos entre los niveles de ARNm de eNOS y los días postrasplante. No ocurrió lo mismo con nNOS y NT-3 (Figura 18).

A) Vd



B) Linfocitos

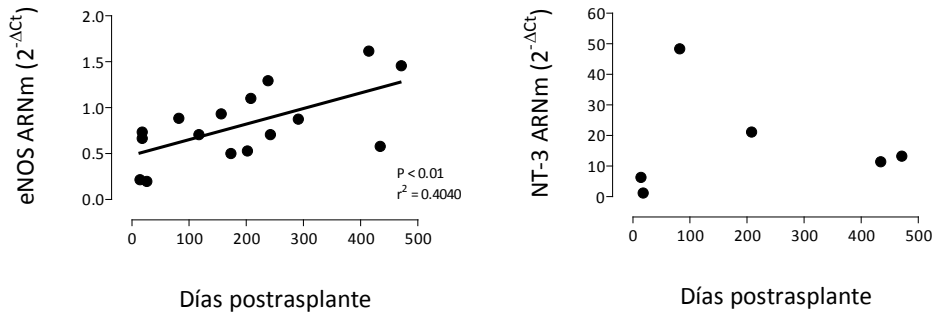


Figura 18. Regresión lineal entre los días transcurridos desde el trasplante cardíaco y los niveles de expresión génica de eNOS, nNOS y NT-3 en **(A)** ventrículo derecho y **(B)** linfocitos humanos circulantes. *Resultados de n = 6 - 17 valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia (2^{-ΔCt}).*

4. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y LAS VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS Y CLÍNICAS CARACTERÍSTICAS DE CADA PATOLOGÍA

Cada patología tiene asociado el seguimiento de unas determinadas variables clínicas que determinan la evolución de la patología. Con el fin de analizar indirectamente el posible papel funcional de los genes estudiados en la patología cardíaca, se realizó un análisis de la correlación entre estas variables y los niveles de ARNm de los distintos genes estudiados. Además, se llevó a cabo un análisis similar para las variables antropométricas.

4.1. Correlación con variables antropométricas

Por un lado, se analizaron las posibles correlaciones entre los niveles de expresión de ARNm de eNOS, nNOS y NT-3 en miocardio (Vi y Vd) y linfocitos de los sujetos sanos y con diferentes cardiopatías (HTA, IC, TC, IP y MS) y su edad o

IMC. Se observó que no existe correlación significativa entre las variables antropométricas y los niveles de expresión de ARNm en ninguno de los grupos estudiados. Tampoco se observaron diferencias significativas en función del sexo.

4.2 Correlación con variables clínicas

4.2.1 Hipertensión arterial (HTA)

Numerosas son las variables que se miden en los pacientes que cursan con niveles elevados de presión arterial. Sin embargo, ninguna de dichas variables correlacionó de forma significativa con los genes objeto de estudio en la presente tesis.

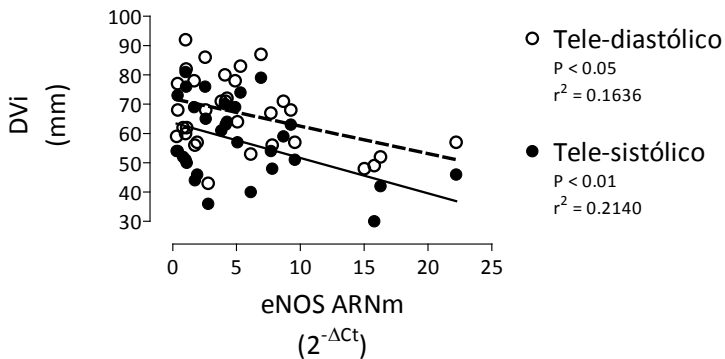
4.2.2 Insuficiencia cardiaca (IC)

Se analizó la posible correlación entre los niveles de expresión génica de eNOS, nNOS y NT-3 en miocardio (Vi y Vd) y linfocitos y las variables clínicas determinadas en los pacientes con IC. Cabe destacar que en el caso de los linfocitos, no se encontraron correlaciones significativas con ninguna de ellas.

eNOS

En el miocardio, los niveles de ARNm de eNOS en Vi (Figura 19A) y Vd (Figura 19B) de pacientes con IC correlacionan de forma negativa y significativa con el diámetro tele-diastólico y tele-sistólico del Vi.

A) Vi



B) Vd

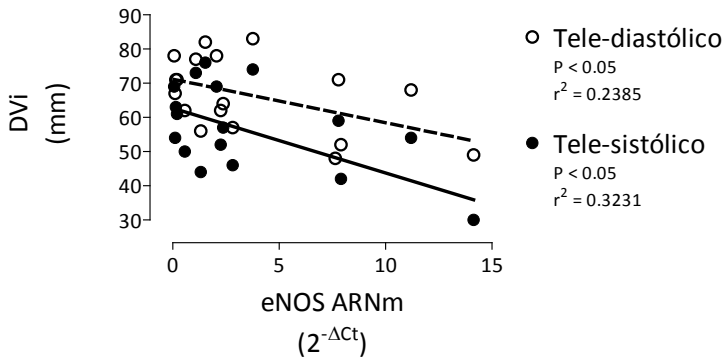
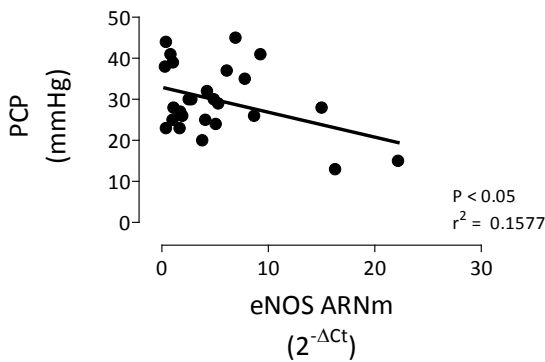


Figura 19. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de eNOS en **(A)** ventrículo izquierdo y **(B)** ventrículo derecho de pacientes con insuficiencia cardiaca y el diámetro tele-diastólico (línea discontinua) y tele-sistólico (línea continua) del Vi. *DVi*, diámetro del ventrículo izquierdo. Resultados de $n = 32$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).

La presión pulmonar es una de las variables más importantes a tener en cuenta cuando se trabaja con pacientes que sufren de IC. Así pues se observa una correlación negativa y significativa entre los niveles de ARNm de eNOS en Vi de estos pacientes y la presión capilar pulmonar (PCP) (Figura 20A), presión arterial pulmonar sistólica (PAPs) y presión arterial pulmonar media (PAPm) (Figura 20B).

A)



B)

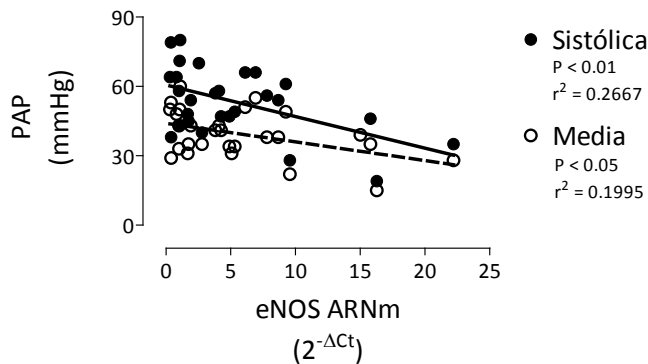


Figura 20. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de eNOS en ventrículo izquierdo de pacientes con insuficiencia cardiaca y (A) la presión capilar pulmonar o (B) la presión arterial pulmonar sistólica (línea continua) y media (línea discontinua). PCP, presión capilar pulmonar; PAP, presión arterial pulmonar. Resultados expresados de $n = 32$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).

La estrecha relación encontrada entre la expresión cardiaca de eNOS y la PAP se confirma con el análisis de los niveles génicos y proteicos en dos grupos de pacientes insuficientes clasificados de acuerdo con un valor de presión arterial pulmonar sistólica considerado normal o patológico, esto es, un valor inferior (no hipertensión pulmonar, NHP) o superior (hipertensión pulmonar, HP) a 35 mmHg, respectivamente (Guglin y Khan, 2010). En la Figura 21 se muestra como los pacientes con HP poseen niveles de expresión génica y proteica de eNOS significativamente inferiores comparados con aquellos pacientes insuficientes cuyos valores de presión son ≤ 35 mmHg (NHP). Estas diferencias que se observaron en Vi, no fueron evidentes en el Vd (Figura 21A). Por otra parte, la proporción de eNOS fosforilada (p-eNOS, la forma activa de la enzima) respecto a la forma total de cada muestra, no cambió en ninguno de los grupos.

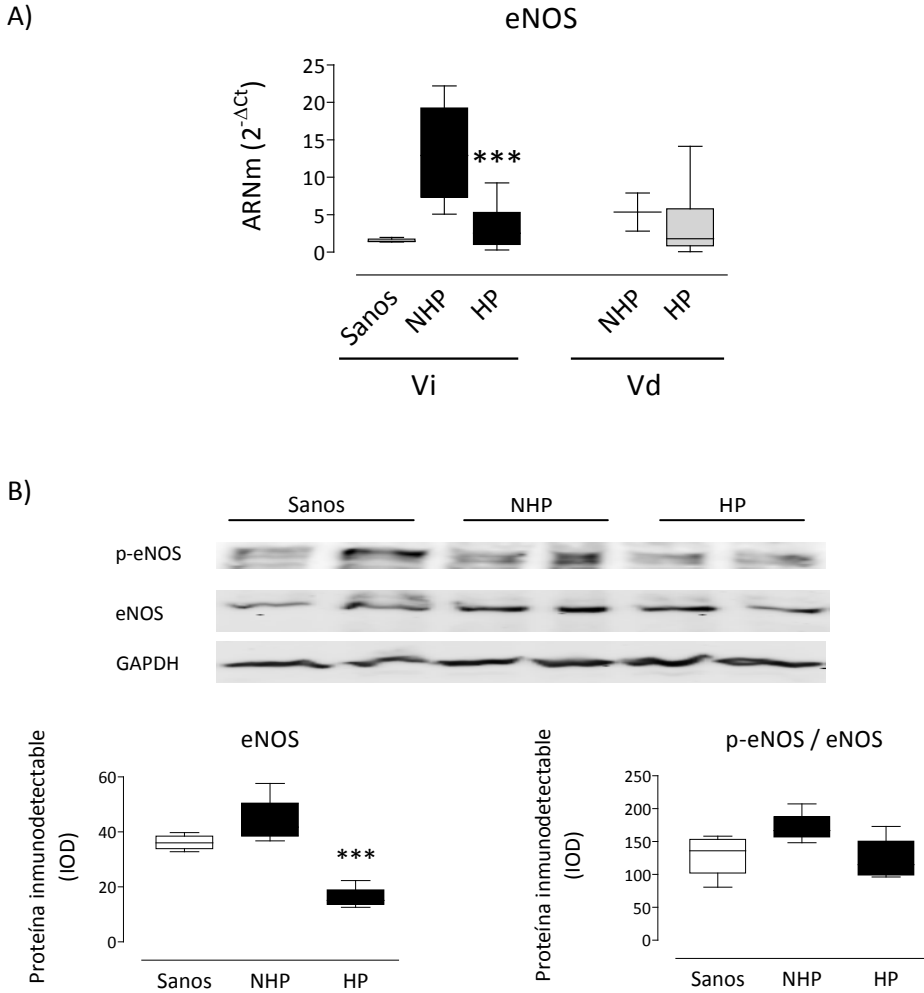


Figura 21. (A) Análisis comparativo de niveles de expresión génica de eNOS en ventrículo izquierdo y derecho de sujetos sanos e insuficientes clasificados en función de sus niveles ≤ 35 mmHg (NHP) o > 35 mmHg (HP) de presión pulmonar. Valores normalizados utilizando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$) de $n = 4 - 32$. Análisis estadístico: *t* de Student siendo *** $P < 0.001$. **(B)** Western Blot y análisis densitométrico de la expresión proteica de p-eNOS y eNOS en ventrículo izquierdo de sujetos sanos e insuficientes. Vi, ventrículo izquierdo; Vd, ventrículo derecho; NHP, valores ≤ 35 mmHg y HP > 35 mmHg de presión pulmonar. Valores normalizados utilizando GAPDH como control de carga y expresados como el ratio de proteína inmunodetectable. Análisis estadístico: *t* de Student siendo *** $P < 0.001$.

nNOS

En cuanto al análisis de regresión lineal de nNOS con las variables clínicas determinadas en pacientes con IC, sus niveles de expresión génica en Vi sólo correlacionan de forma positiva y significativa con el gasto cardiaco (GC) (Figura 22). Cabe destacar que no existen correlaciones significativas entre los niveles de expresión génica en Vd y las variables clínicas.

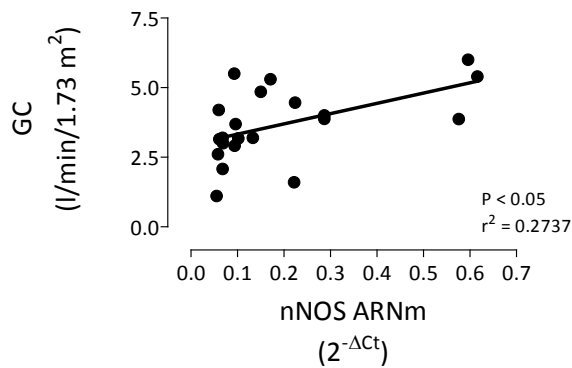


Figura 22. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de nNOS en ventrículo izquierdo y el gasto cardiaco (GC) de pacientes con insuficiencia cardiaca. Resultados de $n = 21$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).

NT-3

Al realizar el mismo análisis con NT-3, se observó que en Vi de pacientes con IC existe una correlación inversa entre la expresión de NT-3 y la presión arterial pulmonar diastólica (PAPd) (Figura 23). No existen correlaciones significativas entre los niveles de expresión génica en Vd y las variables clínicas.

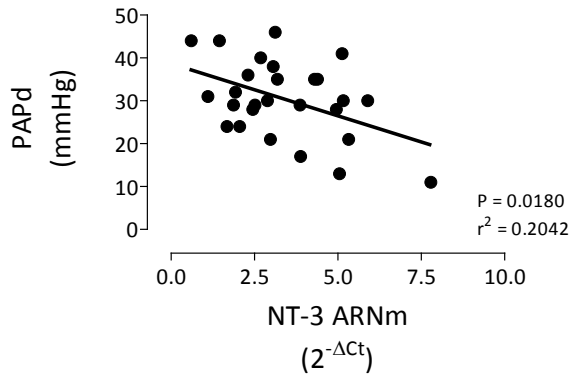


Figura 23. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de NT-3 en ventrículo izquierdo y la presión arterial pulmonar diastólica (PAPd) de pacientes con insuficiencia cardiaca. Resultados de $n = 27$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).

4.2.3 Trasplante cardiaco (TC)

El análisis de regresión lineal llevada a cabo en miocardio (Vd) de pacientes sometidos a trasplante cardiaco entre los niveles de expresión génica de los distintos genes objeto de estudio y las variables clínicas, da como resultado una correlación positiva y significativa entre la expresión génica de eNOS y el diámetro tele-diastólico y tele-sistólico del Vi (Figura 24).

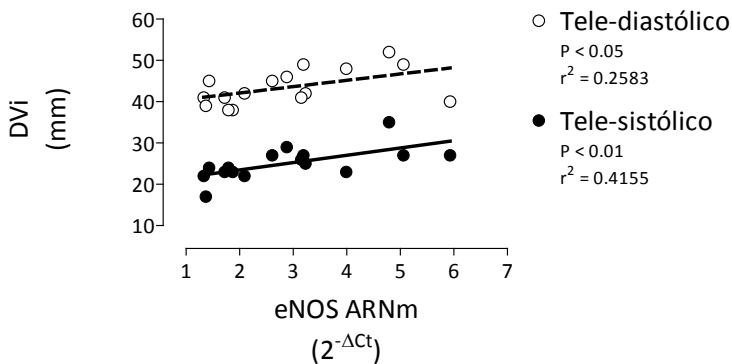


Figura 24. Regresión lineal entre los niveles de expresión génica de eNOS en ventrículo derecho de pacientes sometidos a trasplante cardiaco y el diámetro tele-diastólico (línea discontinua) y tele-sistólico (línea continua) del ventrículo izquierdo. *DVi*, diámetro del ventrículo izquierdo. Resultados de $n = 17$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$).

4.2.4 Insuficiencia pulmonar (IP)

Numerosas son las variables que se determinaron en pacientes con insuficiencia pulmonar derivada de Tetralogía de Fallot y estenosis/ agenesia pulmonar intervenidas. Sin embargo, tras realizar la regresión lineal entre dichas variables y los niveles de ARNm de eNOS, nNOS y NT-3 tanto en Vd como en linfocitos, no se observó ninguna correlación significativa relevante para el estudio.

NOS Y NT-3 EN ANGIOGÉNESIS

1. PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE ANGIOGÉNESIS

Durante la presente tesis se puso a punto la técnica de crecimiento de nuevos vasos, también conocida como angiogénesis, previamente descrita por Nicosia y Ottinetti (1990) y que parte de aorta de rata cultivada “*ex vivo*” para promover el crecimiento angiogénico. Cabe destacar que la elección del tipo de muestra y las condiciones experimentales con las que se obtuvieron los resultados del presente trabajo se llevaron a cabo a fin de reproducir las condiciones fisiológicas de la manera más precisa posible.

1.1 Medio de cultivo y factores de crecimiento

El medio de cultivo que se utilizó fue el *Endothelial cell Basal Medium MV2* (EBM-MV2), un medio basal específico para el crecimiento de células endoteliales. En la Figura 25 se muestra, por un lado, el crecimiento de nuevos vasos en presencia de este medio EBM-MV2 al cuál se le adicionó suero bovino fetal y diversos factores de crecimiento (MB + FC). Por otro lado, se muestra una imagen representativa del crecimiento de nuevos vasos en presencia del medio basal EBM-MV2 al cuál se le adicionó, únicamente, el suero bovino fetal (MB). En las imágenes se observa como la presencia de los factores de crecimiento no es indispensable para el desarrollo del proceso. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a la densidad de nuevos vasos formados, por ello, los ensayos de angiogénesis se llevaron a cabo con el medio MB + FC.

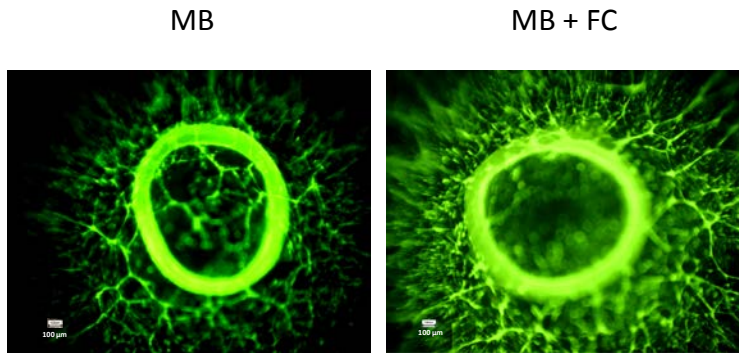


Figura 25. Imágenes representativas de los experimentos con explantes de aorta de rata tras 7 días cultivados en medio basal (MB) y medio basal enriquecido con factores de crecimiento (MB+FC). *Las imágenes se han tomado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, objetivo 4x.*

1.2 Seguimiento del crecimiento de nuevos vasos

El cultivo se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 6.2.1 de Material y Métodos de la presente tesis. El seguimiento del crecimiento de nuevos vasos se realizó desde el “día 3” de cultivo, momento en el cual los nuevos vasos comienzan a adoptar estructuras tubulares diferenciadas, hasta el “día 7”, tras el cuál el proceso se paraliza por cubrir toda la superficie disponible. El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo midiendo la distancia alcanzada por los vasos en cuatro ejes determinados según los polos terrestres, desde la parte externa del anillo hasta el extremo final de los nuevos vasos formados. Esto se realizó con el fin de obtener un valor representativo del crecimiento que sería el valor medio de los cuatro ejes (Figura 26). Además, todas las determinaciones se realizaron por duplicado en cada experimento y se tomó como resultado final la media de los duplicados para cada experimento.

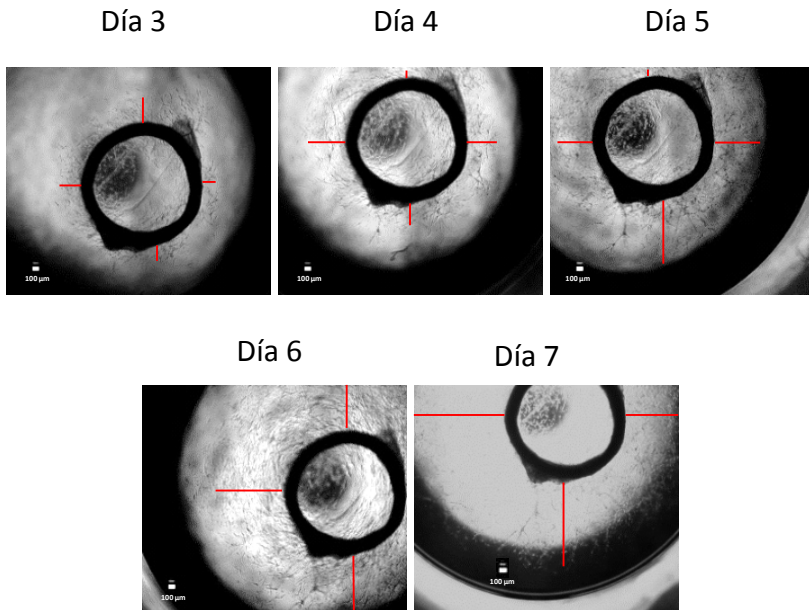


Figura 26. Imágenes representativas del crecimiento diario de los explantes de aorta de rata cultivados en MB + FC. Se toman imágenes diarias desde el “día 3” hasta el “día 7”. La línea roja indica la medida tomada en cada eje utilizando el programa Sigma Scan Pro (Systat Software, Inc. Chicago IL). Las imágenes se han tomado en un microscopio de transmisión Nikon Eclipse TE2000-S, objetivo 2x.

Tras 7 días de crecimiento, se incubó el cultivo con el fluoróforo calceína, y se observó en el microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse e800* con el fin de medir la intensidad y el área de fluorescencia de los nuevos vasos mediante el programa Sigma Scan Pro (Systat Software, Inc. Chicago IL). Cuando se comparan las medidas obtenidas por este método con las medidas del crecimiento longitudinal a “día 7”, se observa que en las medidas de intensidad de fluorescencia existe una gran variabilidad entre las distintas preparaciones realizadas en un mismo día (duplicados) y especialmente, entre los experimentos realizados en días diferentes, lo que dificulta la detección de los cambios que

podiera producir un determinado tratamiento. Esto puede ser debido a dos motivos principalmente, por una parte, la calceína penetra en todo tipo de células vivas y no proporciona información selectiva de las células que forman los nuevos vasos y, por otra parte, el crecimiento tridimensional de los nuevos vasos enmascara la medición de la intensidad de fluorescencia. En la Figura 27 se muestra una imagen representativa del crecimiento de nuevos vasos en presencia de calceína. En ella se observa que, aunque las medidas de intensidad de fluorescencia tras 7 días de crecimiento son muy adecuadas para observar el crecimiento global, no se tuvieron en cuenta para analizar los cambios inducidos por un determinado tratamiento .

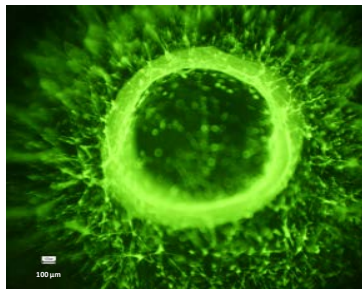


Figura 27. Imagen representativa de los experimentos con explantes de aorta de rata a “día 7” previa incubación con el fluoróforo calceína. *La imagen se ha tomado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, objetivo 4x.*

Por ello, en la presente Tesis Doctoral, se determina lo que ocurre durante el proceso angiogénico siguiendo el crecimiento de nuevos vasos a lo largo del tiempo, ya que es el método más preciso para determinar la influencia de determinados factores durante el proceso y, además, muestra las distintas etapas que tienen lugar durante un periodo de tiempo determinado.

1.3 Determinación de la capacidad angiogénica de distintos vasos

Además de en aorta de rata, la angiogénesis se ensayó en explantes de otros vasos como la 2ª rama de arteria mesentérica de rata y la aorta de ratón. En la Figura 28 se muestra como el crecimiento de nuevos vasos tiene lugar independientemente del tipo de tejido o animal. Para los restantes experimentos, se utilizó la aorta de rata.

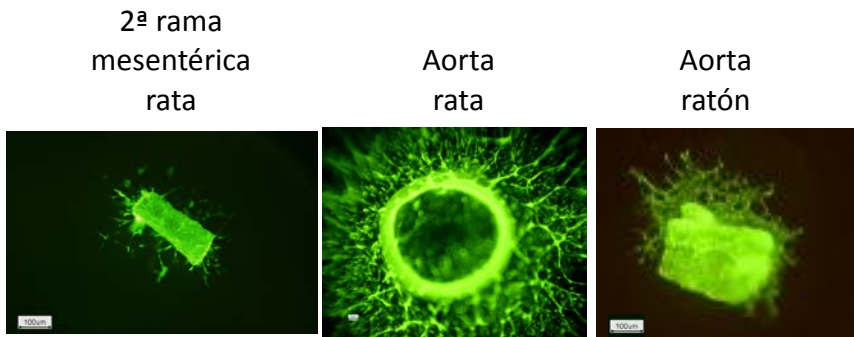


Figura 28. Imágenes representativas de los experimentos con explantes de 2ª rama de arteria mesentérica y aorta de rata y ratón a “día 7”. Las imágenes se han tomado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, objetivo 10x para mesentérica de rata y aorta de ratón y objetivo 4x, para aorta de rata.

1.4 Influencia de las capas endotelial y adventicia

Se estudió la influencia de las capas endotelial y adventicia en el crecimiento de nuevos vasos. Para ello, se realizó un seguimiento del crecimiento desde el “día 3” hasta el “día 7” de cultivo en presencia y ausencia de dichas capas.

Con la finalidad de determinar si es la capa endotelial la responsable de que se lleve a cabo el proceso, se realizó el seguimiento de crecimiento angiogénico en anillos de aorta a los cuáles se les eliminó únicamente dicha capa

(E-) pasando alrededor de 20 veces una fina cánula por la luz del vaso, y comprobando funcionalmente en anillos de algunos vasos, tomados al azar, que no existía respuesta relajante a la acetilcolina. Tal como se observa en la Figura 29, a pesar de la destrucción mecánica del endotelio observamos crecimiento angiogénico.

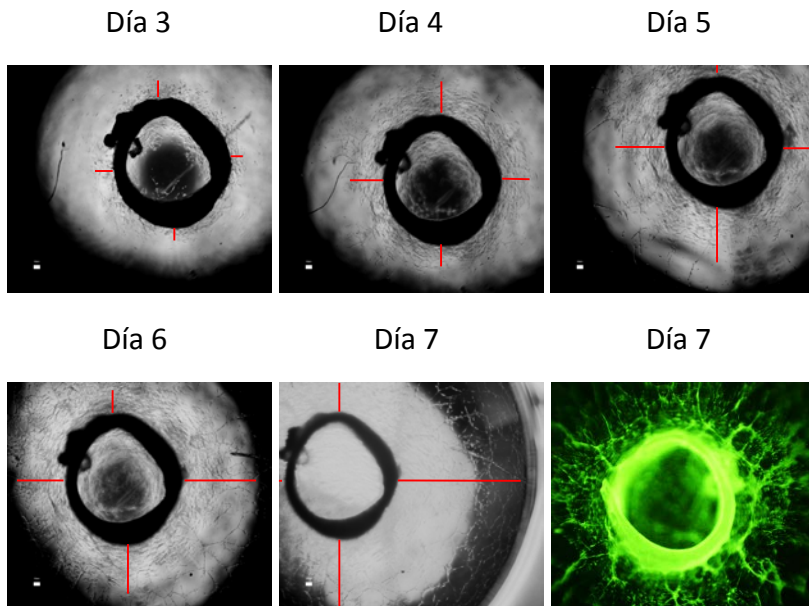


Figura 29. Imágenes representativas de los experimentos con explantes de aorta de rata cultivados desde el “día 3” hasta el “día 7” en ausencia de la capa endotelial (E-). Las líneas rojas indican la medida tomada en cada eje utilizando el programa Leica Microsystems. Las imágenes de transmisión se han tomado en un microscopio de transmisión Leica DM IL LED Leica cámara, objetivo 2.5x. Las imágenes de fluorescencia se han tomado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, objetivo 4x.

En la Figura 30 se representan las medidas de la longitud de crecimiento de nuevos vasos en función de los días en presencia (E+ A+) o ausencia (E- A+) de

la capa endotelial y con la capa adventicia intacta. Se observa como la presencia o ausencia del endotelio no modifica significativamente la longitud de crecimiento de nuevos vasos.

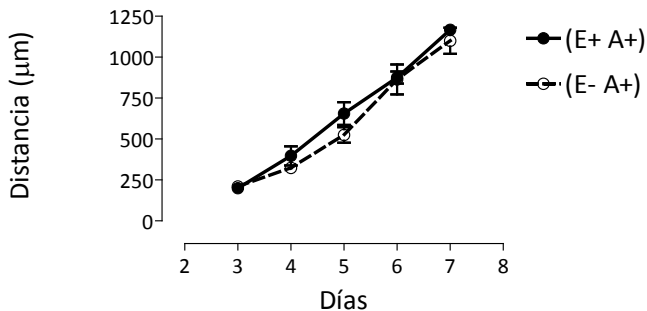


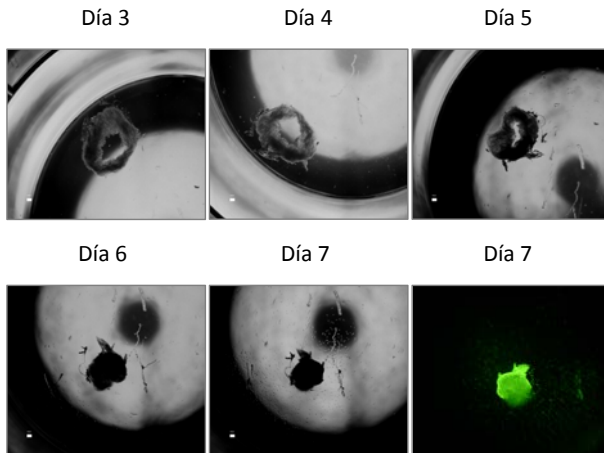
Figura 30. Cuantificación de la longitud de crecimiento de nuevos vasos desde el “día 3” hasta el “día 7” en explantes de aorta de rata, con la capa adventicia intacta y en presencia (E+) o ausencia (E-) de la capa endotelial y con la adventicia intacta (A+). Análisis estadístico: ANOVA de dos vías, $n = 2$.

Una vez se determinó que la presencia o ausencia de endotelio no afectaba al crecimiento de nuevos vasos, se analizó si con la eliminación de la capa adventicia ocurría lo mismo. Para llevar a cabo la destrucción de dicha capa, se utilizó la digestión con colagenasa. Cabe destacar que estudios previos han demostrado, mediante preparaciones funcionales, que con este método de eliminación de la adventicia, la capa endotelial permanece funcional (Gonzalez y cols., 2001).

Tras esto, se realizó el seguimiento del crecimiento de nuevos vasos en ausencia de la capa adventicia (A-) con (E+) y sin (E-) endotelio desde el “día 3” hasta el “día 7”, realizando a “día 7” el ensayo a punto final con el fluoróforo calceína (Figura 31A y Figura 31B). Se observa como durante el cultivo (A-), la

aorta va perdiendo su estructura de anillo y no se produce el crecimiento de nuevos vasos independientemente de la presencia o ausencia del endotelio.

A) (E+ A-)



B) (E- A-)

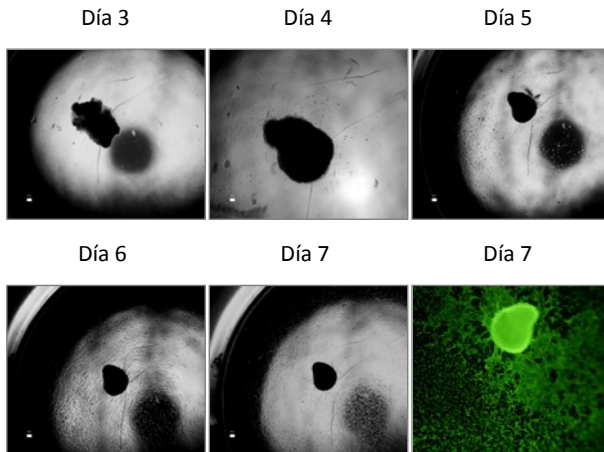


Figura 31. Imágenes representativas de los experimentos con explantes de aorta de rata cultivados desde el “día 3” hasta el “día 7” en ausencia de la capa adventicia (A-) y con (E+) **(A)** o sin (E-) **(B)** la capa endotelial. Las imágenes de transmisión se han tomado en un microscopio de transmisión Leica DM IL LED Leica cámara, objetivo 2.5x. Las imágenes de fluorescencia se han tomado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, objetivo 4x.

2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE eNOS, nNOS Y NT-3 DURANTE EL PROCESO ANGIOGÉNICO

A fin de realizar un seguimiento de los cambios en la expresión de eNOS, nNOS y NT-3 durante el proceso angiogénico, se determinaron los niveles de ARNm en los anillos sembrados en Matrigel® a “*día 0*”, es decir, el mismo día que se extraen del animal y tras 7 días de cultivo. En este caso, se realizó el análisis diferenciando tres tipos de muestras: una, que incluye los anillos junto con los nuevos vasos formados, y otras dos que corresponden a los anillos y los nuevos vasos por separado (Figura 32). Cabe destacar los niveles de expresión de iNOS fueron indetectables desde el principio del cultivo (resultados no mostrados).

En el caso de eNOS, tras 7 días de crecimiento los niveles de expresión de la enzima se mantienen más o menos constantes con respecto a “*día 0*” tanto en el anillo como en la muestra que contiene el anillo mas los nuevos vasos formados. Sin embargo, en los nuevos vasos aislados existe un nivel de expresión menor de la enzima (Figura 32A).

Con respecto a nNOS (Figura 32B) y NT-3 (Figura 32C), se produce una disminución de los niveles de expresión a los 7 días de cultivo en todas las muestras con respecto a la expresión a “*día 0*”.

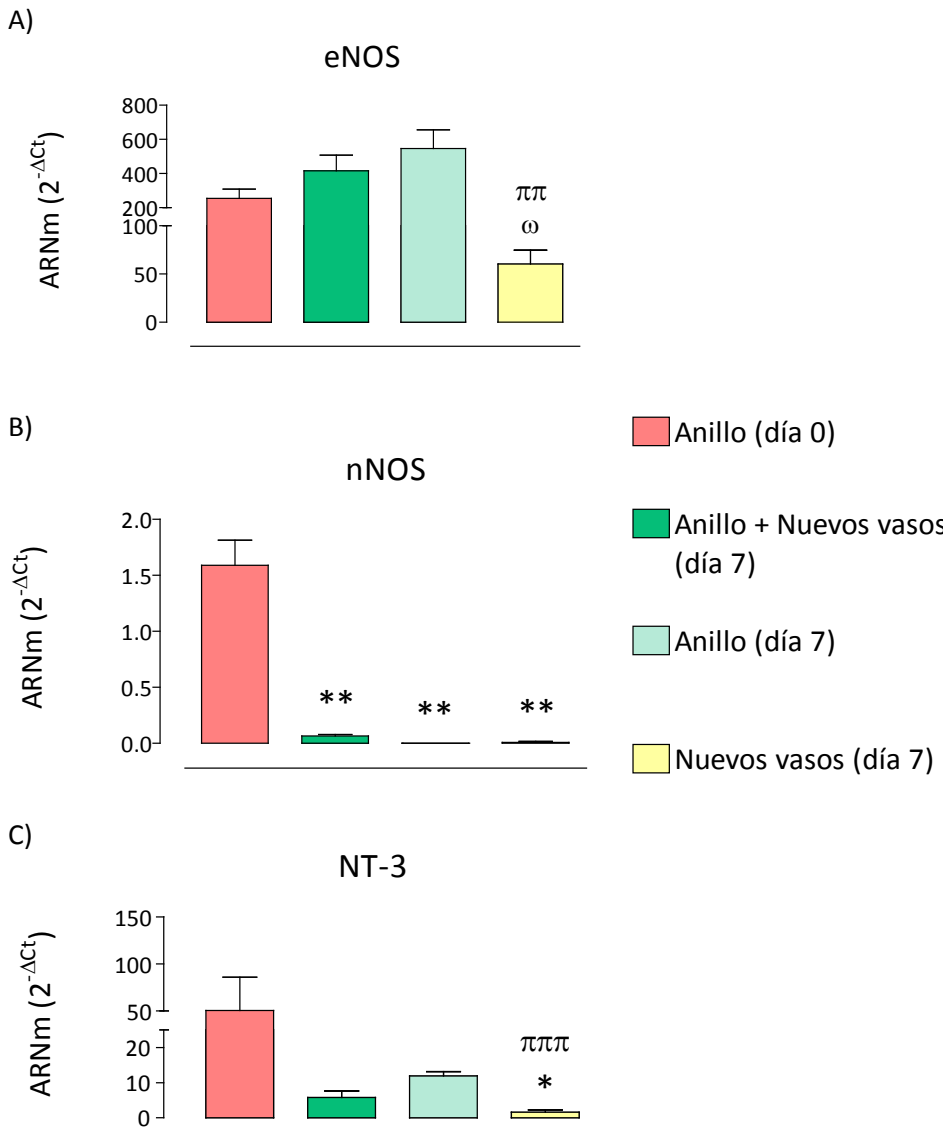


Figura 32. Niveles de ARNm de (A) eNOS, (B) nNOS y (C) NT-3 en el cultivo de angiogénesis a “día 0” y “día 7” en muestras procedentes del anillo aórtico solo y/o con los nuevos vasos formados. Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 3 - 8$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: *t* de Student siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Anillo (día 0); $\pi\pi$ $P < 0.01$, $\pi\pi\pi$ $P < 0.001$ vs Anillo (día 7).

Tras la obtención de estos resultados, se propusieron nuevos ensayos para determinar la causa de los cambios de expresión observados durante el proceso angiogénico. Para ello, se diseñaron distintos protocolos a fin de determinar si los cambios de expresión de nNOS y NT-3 eran consecuencia del proceso angiogénico en si mismo o si, por el contrario, se producían por culpa de la disección del anillo y la consiguiente pérdida de inervación del explante. Concretamente, se analizó la expresión génica de los dos genes en anillos quiescentes, es decir, anillos aislados y mantenidos en un medio que no permite que se desarrolle su capacidad angiogénica.

En la Figura 34 se muestra como la expresión génica de eNOS permanece constante en los anillos quiescentes con respecto a los anillos aórticos recién extraídos del animal. Sin embargo, en el caso de nNOS y NT-3, la expresión en anillos quiescentes disminuye drásticamente. Estos resultados demuestran que la causa de la pérdida de expresión no guarda relación con el proceso angiogénico ya que este no se ha llegado a producir en los anillos quiescentes.

A)



B)

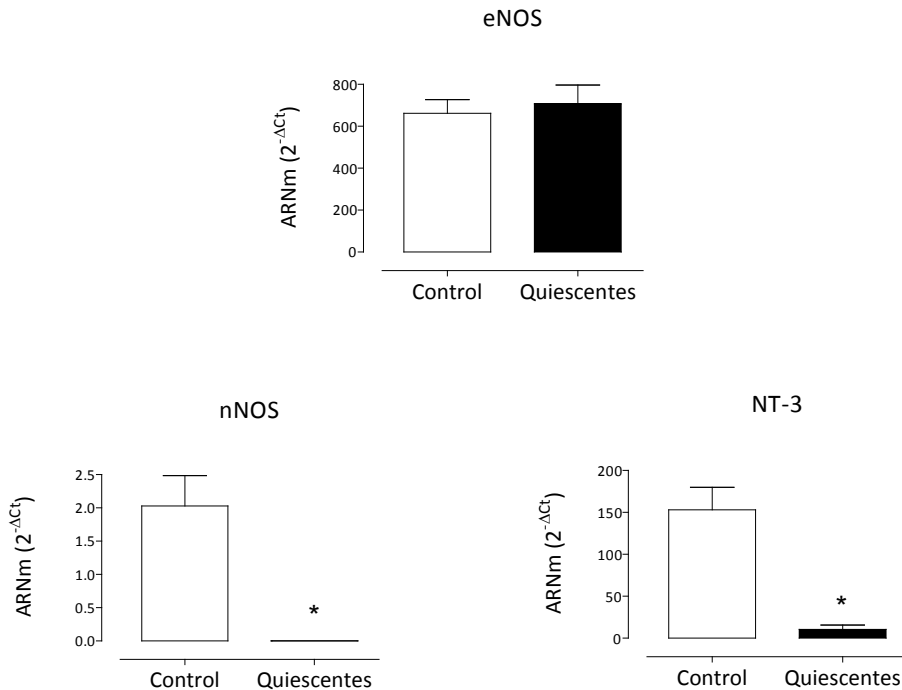


Figura 34. (A) Imagen representativa de los experimentos con explantes de aorta de rata quiescentes a “día 7” previa incubación con el fluoróforo calceína. **(B)** Niveles de expresión génica de eNOS, nNOS y NT-3 en anillos aórticos control y anillos aórticos quiescentes procedentes de rata. La imagen se ha tomado en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800, objetivo 4x. Resultados expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 2 - 3$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: *t* de Student siendo * $P < 0.05$.

Para analizar los cambios observados en la expresión de eNOS y, más específicamente la influencia del anillo sobre el crecimiento de las células endoteliales que forman los nuevos vasos, realizamos tres protocolos distintos tal como se describe en el apartado 6.2.4 de Material y Métodos, obteniendo en cada caso diferentes muestras:

Protocolo A) Anillos aórticos incubados durante 7 días en Matrigel®, aislados de los nuevos vasos formados e incubados nuevamente en Matrigel® durante 5 días más. Al finalizar este protocolo, se recogieron tres tipos de muestras:

- A.1. Anillo + nuevos vasos formados
- A.2. Anillo, separado de los nuevos vasos formados
- A.3. Nuevos vasos formados

Protocolo B) Anillos aórticos incubados durante 7 días en Matrigel®, aislados de los nuevos vasos formados y mantenidos los nuevos vasos sin el anillo durante 5 días más. Al finalizar, se recogió la muestra:

- B.1. Nuevos vasos mantenidos 5 días sin anillo

Protocolo C) Anillos aórticos incubados durante 7 días en Matrigel®. Los nuevos vasos se separan del anillo y se recogen para sembrarlos nuevamente en Matrigel® durante 5 días más. En este caso, los nuevos vasos se incuban solos o en presencia de un anillo aórtico, propio o ajeno, pero sin establecer contacto directo con él pues este se sitúa en un pocillo provisto de un inserto con rejilla difusora que permite el paso del medio de cultivo y los factores.

Al finalizar este protocolo, se recogieron tres tipos distintos de muestras:

- C.1. Nuevos vasos resembrados
- C.2. Nuevos vasos resembrados con anillo propio
- C.3. Nuevos vasos resembrados con anillo ajeno

Se observa como la expresión génica de eNOS permanece disminuida en el cultivo de nuevos vasos en presencia del anillo tanto propio como ajeno (Figura 33).

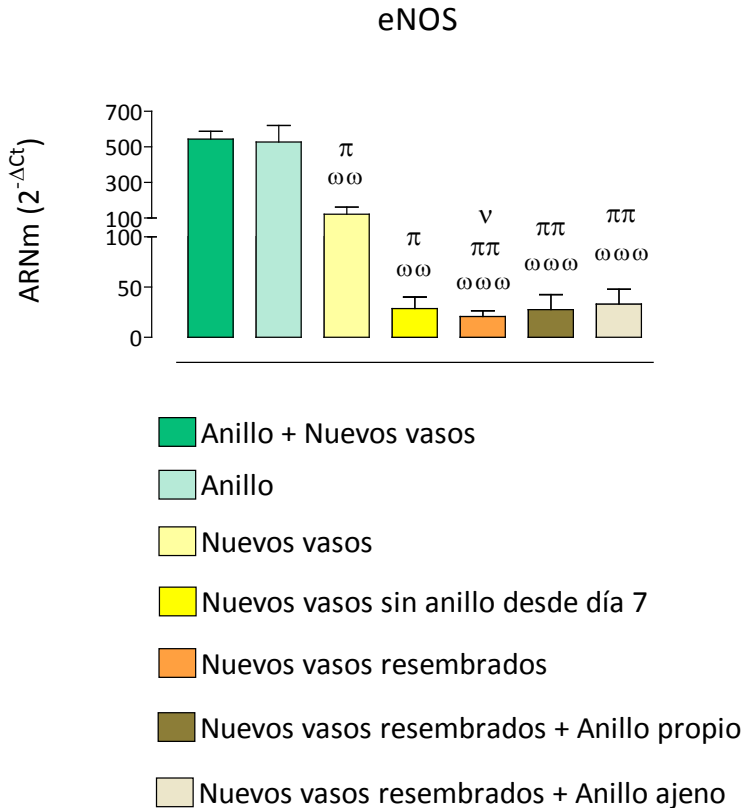


Figura 33. Niveles de ARNm de eNOS en el cultivo de angiogénesis a “día 12” en distintas condiciones experimentales de muestras de anillos y/o cultivo de nuevos vasos formados. Resultados expresados como la media \pm e.e.m de $n = 2 - 5$ valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia ($2^{-\Delta Ct}$). Análisis estadístico: t de Student siendo $\omega\omega$ $P < 0.01$, $\omega\omega\omega$ $P < 0.001$ vs. Anillo + Nuevos vasos (día 12); π $P < 0.05$, $\pi\pi$ $P < 0.01$ vs. Anillo (día 12); ν $P < 0.05$ vs. Nuevos vasos (día 12).

3. MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS POR EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Con el fin de determinar el efecto modulador del NO en la angiogénesis, se utilizaron, por una parte, inhibidores de su síntesis (L-NAME y SMTC) y, por otra parte, un donador de NO (DETA-NO) y un liberador de especies nitrogenadas (Nitroglicerina (NTG)).

3.1 Determinación del rango de concentración de los inhibidores de la NOS y donadores de NO

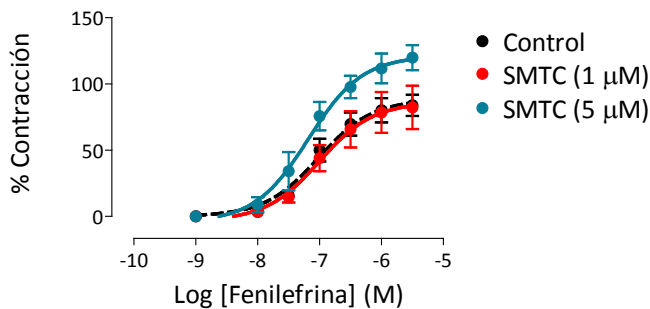
Se determinó el rango de concentraciones adecuado para el cultivo angiogénico del SMTC, inhibidor selectivo de la nNOS, del DETA-NO, donante de NO y de la NTG. Ésta determinación se realizó mediante un análisis funcional con distintas concentraciones de cada compuesto determinando cambios en la contractilidad de anillos de aorta aislados, incubados en baño de órganos y conectados a un transductor de fuerza. Para ello, se realizaron curvas concentración-respuesta de contracción con Fenilefrina (FE) (agonista α_1 no selectivo) y de relajación con Acetilcolina (Ach) (agonista muscarínico) en presencia o ausencia de L-NAME (estudios previos) o SMTC (presente trabajo). Además, también se realizaron curvas de relajación utilizando el donador de óxido nítrico, DETA-NO y el liberador de especies nitrogenadas, nitroglicerina (NTG).

Cabe destacar que se eligió la concentración de L-NAME de 100 μM , puesta a punto por nuestro grupo de investigación en estudios previos (Victor y cols., 2009; Flacco y cols., 2013b).

3.1.1 Determinación de la concentración de SMTC

Al evaluar las curvas concentración-respuesta contráctil de Fe en aorta de rata se observa como la potencia de Fe (pEC_{50}) en presencia de dos concentraciones de SMTC (1 y 5 μM) no difiere significativamente con respecto a la potencia que se observa en la curva control. Sin embargo, por lo que respecta al efecto máximo ($E_{\text{máx}}$), éste es significativamente superior en el caso de la concentración de 5 μM con respecto a la de 1 μM y al control, lo que indica que la concentración 5 μM puede estar ejerciendo una acción inhibitoria no selectiva sobre las distintas isoformas de NOS y, como ocurre con el L-NAME, potenciar la respuesta a Fe (Figura 35).

A)



B)

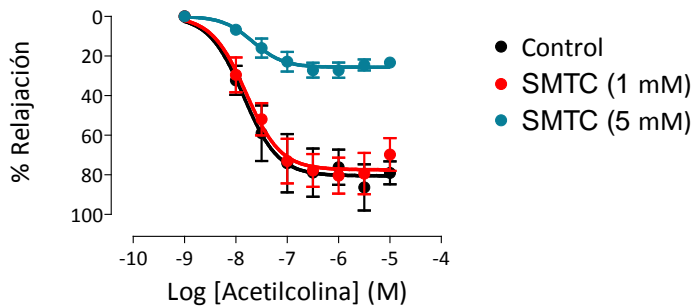
	pEC_{50}	$E_{\text{máx}}$
Control	7.02 ± 0.03	88.24 ± 1.28
SMTC (1 μM)	7.00 ± 0.02	86.15 ± 0.75
SMTC (5 μM)	7.18 ± 0.02	121.00 ± 1.07 ***

Figura 35. (A) Curvas concentración-respuesta de contracción con Fenilefrina y **(B)** Parámetros obtenidos, en presencia o ausencia de SMTC a concentraciones de 1 μM y 5 μM en aorta de rata. SMTC, *S-metil-L-citrulina*; Valores expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 4 - 6$ experimentos; pEC_{50} , $-\log [\text{Fenilefrina}]$ (M) necesaria para producir el 50 % del efecto máximo ($E_{\text{máx}}$). Siendo *** $P < 0.001$ vs. Control. Análisis estadístico: *t* de Student.

Resultados

Con el fin de confirmar estos resultados, se realizaron curvas de relajación utilizando el agonista muscarínico acetilcolina (Ach) en presencia y ausencia de ambas concentraciones de SMTC (1 μM y 5 μM) (Figura 36). Se observa como la potencia de Ach ($p\text{EC}_{50}$) no cambia en presencia de las distintas concentraciones de SMTC con respecto al control. Sin embargo, con la mayor concentración de SMTC (5 μM) se observa una disminución significativa del efecto máximo ($E_{\text{máx}}$), lo que confirma que, a esa concentración, se inhibe también la eNOS, ya que tiene un patrón de actuación similar a L-NAME. En cambio, no se observan diferencias en el $E_{\text{máx}}$ de Ach con la concentración 1 μM de SMTC. Por todo ello, la concentración de SMTC que se utilizó como inhibidor selectivo de nNOS fue 1 μM .

A)



B)

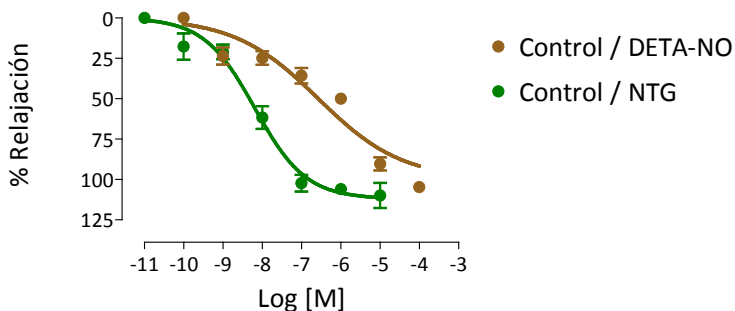
	$p\text{EC}_{50}$	$E_{\text{máx}}$
Control	7.85 ± 0.02	80.59 ± 0.62
SMTC (1 μM)	7.80 ± 0.02	77.53 ± 0.80
SMTC (5 μM)	7.67 ± 0.03	25.76 ± 0.40 ***

Figura 36. (A) Curvas concentración-respuesta de relajación con Acetilcolina y **(B)** Parámetros obtenidos de ellas, en presencia o ausencia de SMTC a concentraciones de 1 μM y 5 μM en aorta de rata. SMTC, *S-metil-L-citrulina*. Valores expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 5 - 6$ experimentos. $p\text{EC}_{50}$, $-\log [\text{Fenilefrina}]$ (M) necesaria para producir el 50 % del efecto máximo ($E_{\text{máx}}$). Siendo *** $P < 0.001$ vs. Control. Análisis estadístico: *t* de Student.

3.1.2 Determinación de las concentraciones de DETA-NO y Nitroglicerina

Se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación utilizando como agentes relajantes el donador de óxido nítrico, DETA-NO y el liberador de especies nitrogenadas, nitroglicerina (NTG), con el fin de determinar el rango de concentraciones adecuadas a utilizar en angiogénesis (Figura 37). En el caso de DETA-NO, se eligieron las dosis que alcanzan el 100% (10^{-4} M), 80% (10^{-5} M) y el 30% (10^{-6} M) de relajación. Por lo que respecta a Nitroglicerina, se eligieron las concentraciones que representan el 100 % de relajación (10^{-5} M y 10^{-6} M) y el 50 % de la relajación máxima (10^{-8} M).

A)



B)

	pEC ₅₀	E _{máx}
Control /DETA-NO	6.58 ± 0.15	103.1 ± 1.85
Control / NTG	8.19 ± 0.10 *	112.1 ± 3.54

Figura 37. (A) Curvas concentración-respuesta de relajación y **(B)** Parámetros obtenidos, con DETA-NO y Nitroglicerina. DETA-NO, diethylenetriamine/nitric oxide adduct; NTG, nitroglicerina. Valores expresados como la media ± e.e.m. de $n = 3 - 4$ experimentos. pEC₅₀, $-\log$ [Fenilefrina] (M) necesaria para producir el 50 % del efecto máximo (E_{máx}). Siendo * $P < 0.05$ vs. Control. Análisis estadístico: *t* de Student.

Teniendo en cuenta que DETA-NO es un agente donador de NO, se realizó una curva concentración-respuesta de relajación con este agente en presencia o ausencia del inhibidor de la enzima guanilato ciclasa (GCs), ODQ, con el fin de determinar si el NO liberado actúa a través de dicha enzima (Figura 38). Se observa como, en presencia de ODQ ($5 \times 10^{-5} \text{M}$), no se produce ninguna respuesta de relajación, por tanto no existe pEC_{50} ni $E_{m\acute{a}x}$, comparado con la curva en ausencia del inhibidor.

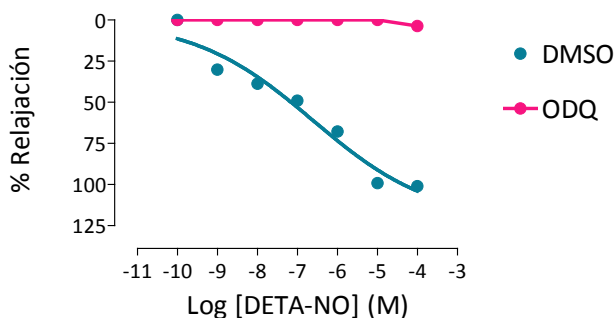
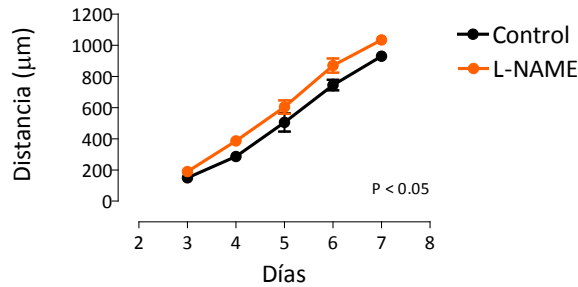


Figura 38. Curvas concentración-respuesta de relajación con DETA-NO en presencia o ausencia de ODQ en aorta de rata. *DMSO*, dimetilsulfóxido; *ODQ*, 1*H*-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-*a*] quinoxalin-1-one; *DETA-NO*, diethylenetriamine/nitric oxide adduct. Valores expresados como la media \pm e.e.m. de $n = 3$ experimentos. pEC_{50} , $-\log$ [Fenilefrina] (M) necesaria para producir el 50 % del efecto máximo (E_{max}).

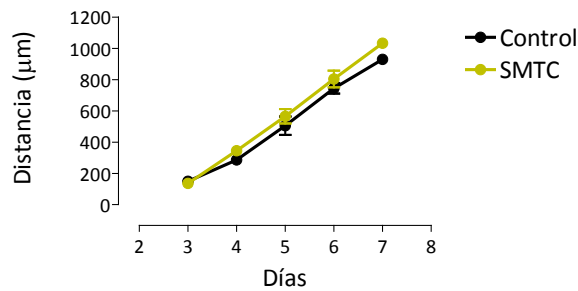
3.2 Efecto del L-NAME y SMTC en la angiogénesis

En la Figura 39 se representa el seguimiento del crecimiento de nuevos vasos en presencia de L-NAME (100 μM) o SMTC (1 μM). Se observa que el L-NAME aumenta significativamente el crecimiento (Figura 39A), mientras que el SMTC no lo afecta (Figura 39B). Además de representar el análisis cuantitativo de la longitud de crecimiento, también se muestran imágenes representativas de dichas diferencias a “día 6” (Figura 39C).

A)



B)



C)

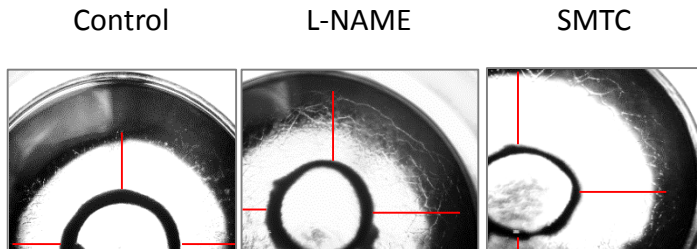


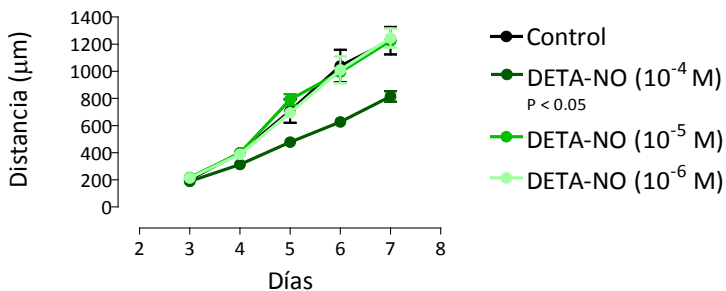
Figura 39. Cuantificación de la longitud de crecimiento de nuevos vasos desde el “día 3” hasta el “día 7” en explantes de aorta de rata en presencia de **(A)** L-NAME (100 µM) o **(B)** SMTC (1 µM). **(C)** Imágenes representativas de los experimentos a “día 6”. L-NAME, *N_ω*-nitro-L-arginina metil éster; SMTC, *S*-metil-L-citrulina. Las líneas rojas indican la medida tomada en cada eje utilizando el programa Sigma Scan Pro (Systat Software, Inc. Chicago IL). Las imágenes se han tomado en un microscopio de transmisión Nikon Eclipse TE2000-S, objetivo 2x. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías de $n = 6$ experimentos. Se considera diferencia significativa si $P < 0.05$.

3.3 Efecto de DETA-NO y NITROGLICERINA en la angiogénesis

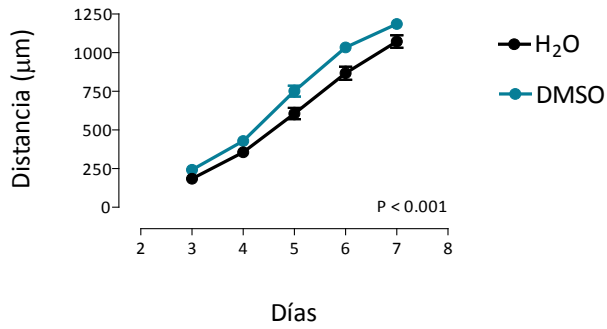
Además de estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de NO sobre la angiogénesis, también se estudió la influencia de la adición de DETA-NO o NTG. Adicionalmente, para determinar si la acción de estas moléculas podría estar regulada por la enzima GCs, se utilizó un inhibidor de ésta, el ODQ.

En el caso de la adición de DETA-NO, se utilizaron las concentraciones 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M en presencia y ausencia de ODQ (5×10^{-5} M). En primer lugar, se realizó el análisis en ausencia de ODQ para ver el efecto del DETA-NO en la angiogénesis. Se observa como la mayor concentración de DETA-NO (10^{-4} M) disminuye significativamente el crecimiento de nuevos vasos (Figura 40A). Al incubar el anillo con ODQ junto a DETA-NO (10^{-4} M), se observó la misma inhibición observada en ausencia del inhibidor de la GCs (Figura 40B).

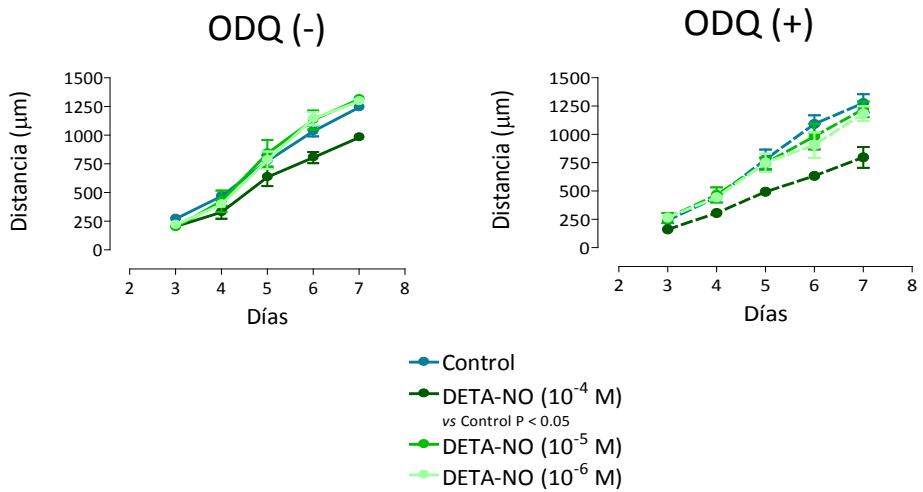
A)



B)



C)



D)

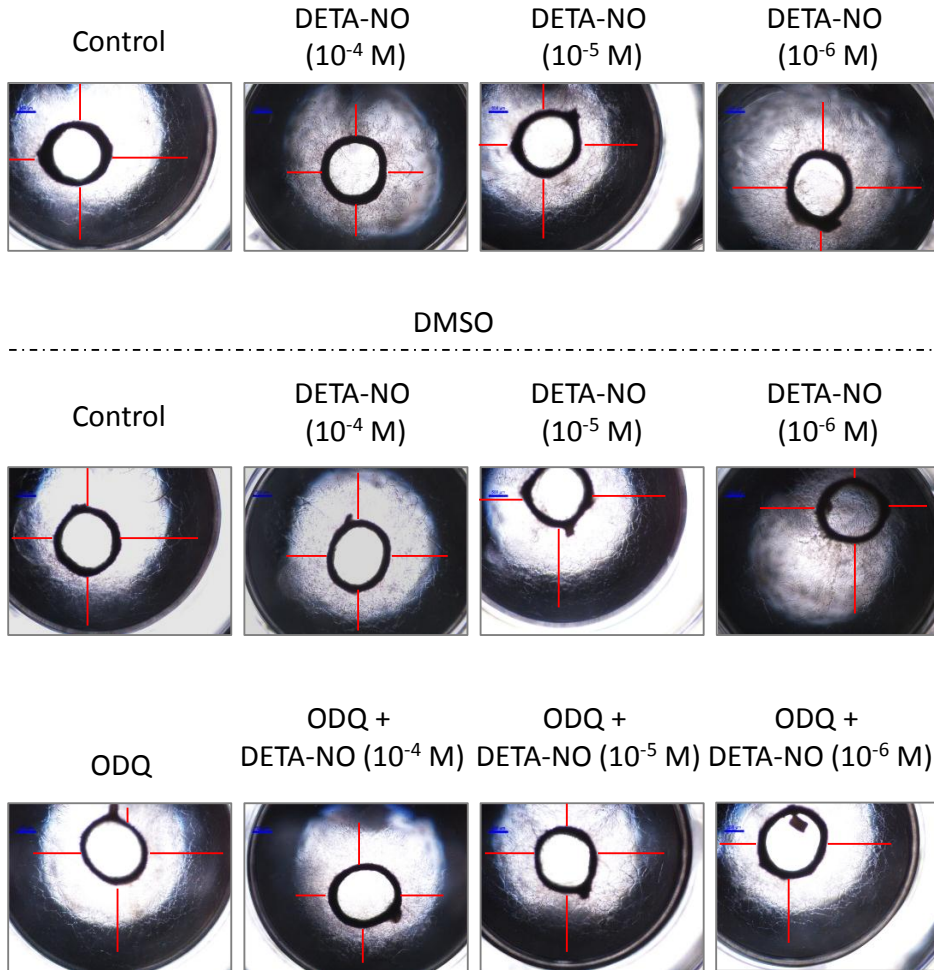
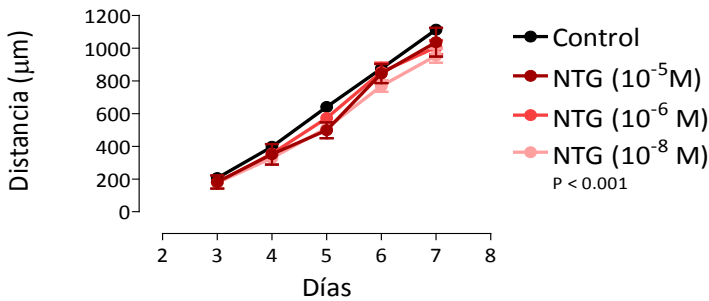


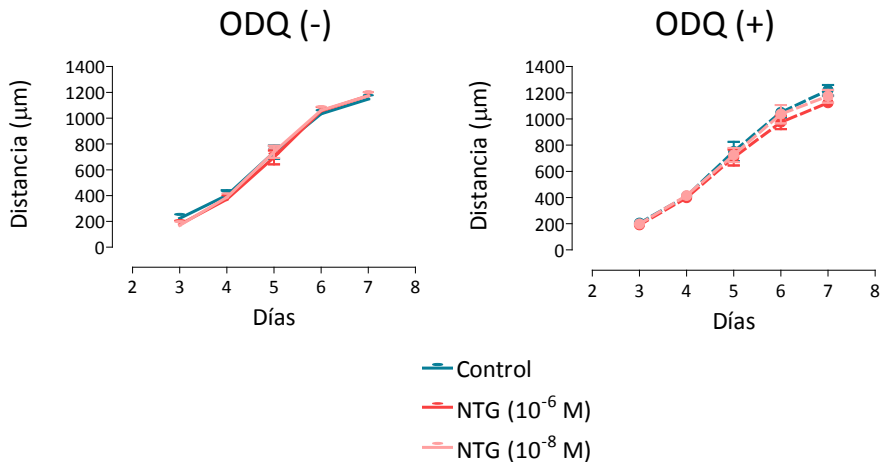
Figura 40. Cuantificación de la longitud de crecimiento de nuevos vasos desde el “día 3” hasta el “día 7” en explantes de aorta de rata en presencia de **(A)** DETA-NO (10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M) **(B)** DMSO (0,05%) **(C)** DETA-NO (10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M) en presencia o ausencia de ODQ (5×10^{-5} M) **(D)** Imágenes representativas de los experimentos a “día 6”. DETA-NO, diethylenetriamine/nitric oxide adduct; DMSO, dimetilsulfóxido; ODQ, 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one. Las líneas rojas indican la medida tomada en cada eje utilizando el programa Leica Microsystems. Las imágenes se han tomado en un microscopio de transmisión Leica DM IL LED Leica cámara, objetivo 2.5x. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías de $n = 6$ experimentos. Se considera diferencia significativa si $P < 0.05$.

En el caso de la NTG se utilizaron las concentraciones de 10^{-8} M, 10^{-6} M y 10^{-5} M. Se observa que la concentración más diluida del fármaco inhibe significativamente el crecimiento de nuevos vasos (Figura 41A). Cuando se realizó el experimento en presencia de ODQ (5×10^{-5} M) y por tanto, utilizando DMSO como vehículo, se observa que la nitroglicerina no afecta significativamente al crecimiento ya modificado por el DMSO (Figura 40B).

A)



B)



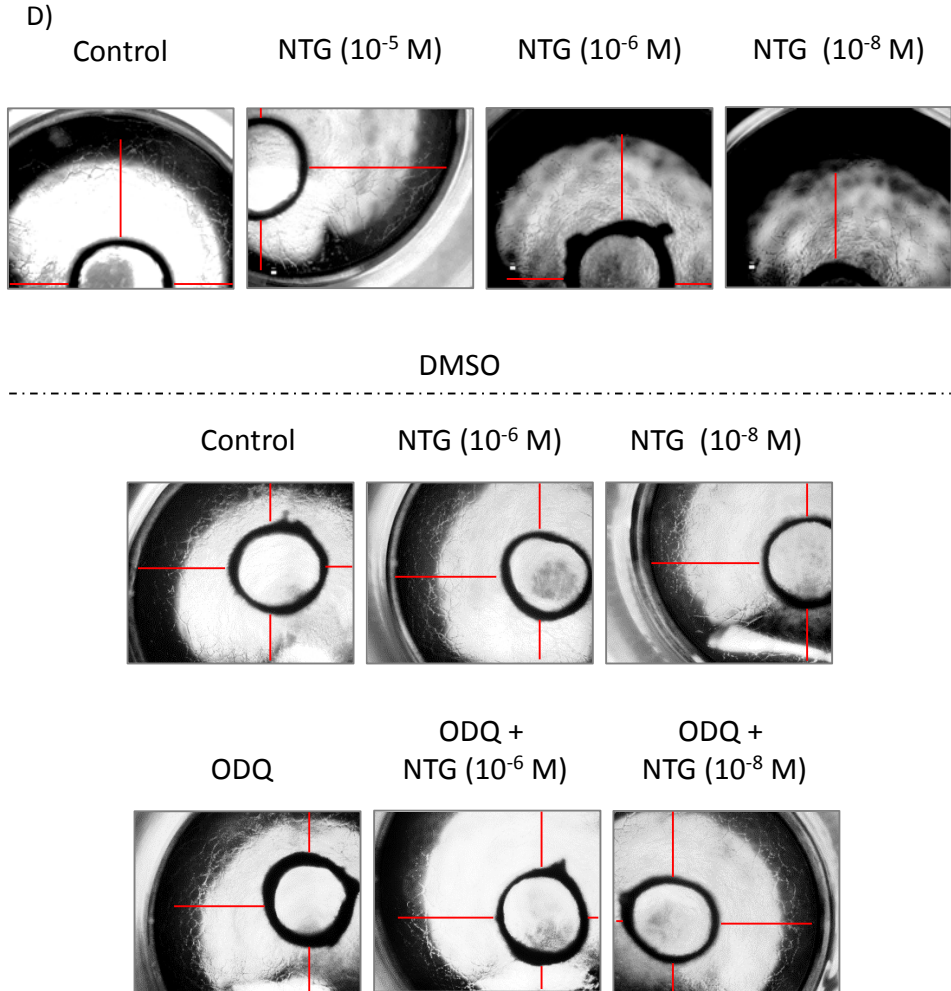


Figura 41. Cuantificación de la longitud de crecimiento angiogénico desde el “día 3” hasta el “día 7” en explantes de aorta de rata en presencia de **(A)** Nitroglicerina (10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-8} M) **(B)** Nitroglicerina (10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-8} M) en presencia o ausencia de ODQ (5×10^{-5} M) **(C)** Imágenes representativas de los experimentos a “día 6”. NTG, nitroglicerina; DMSO, dimetilsulfóxido; ODQ, 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one. Las líneas rojas indican la medida tomada en cada eje utilizando el programa Sigma Scan Pro (Systata Software, Inc. Chicago IL). Las imágenes se han tomado en un microscopio de transmisión Leica DM IL LED Leica cámara, objetivo 2.5x. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías de $n = 6$ experimentos. Se considera diferencia significativa si $P < 0.05$.

3.4 Angiogénesis y NO en modelos animales con patologías cardiovasculares

Con la finalidad de analizar la influencia del NO sobre la angiogénesis en animales con patologías cardiovasculares, se analizó el crecimiento de nuevos vasos en anillos de ratas SHR o Zucker, incubados con L-NAME O SMTC. Se observa como el crecimiento no es modificado en ninguna de las dos cepas por los inhibidores de NOS (Figuras 42 y 43).

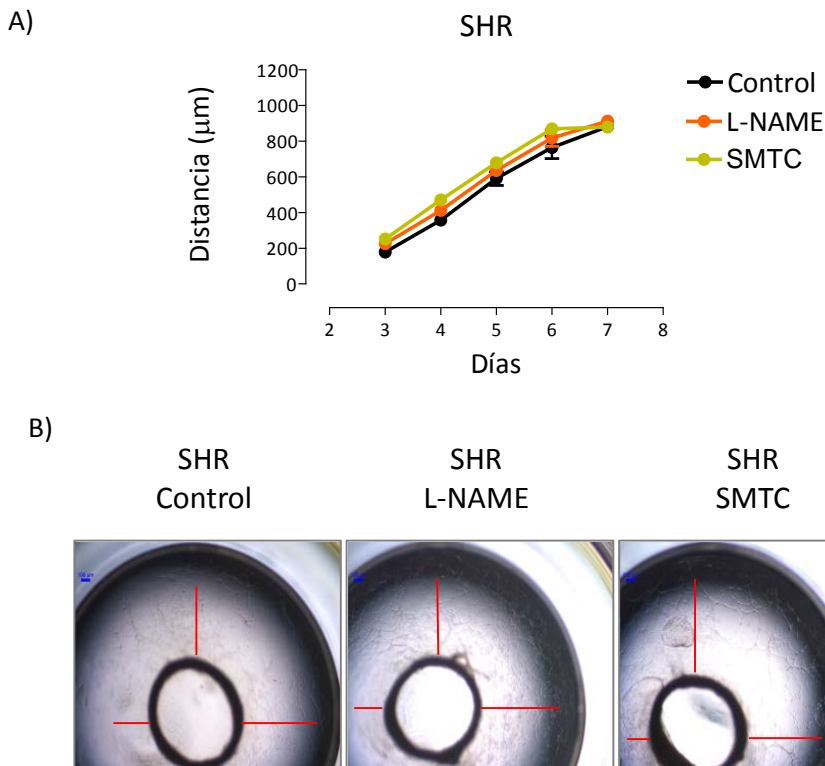
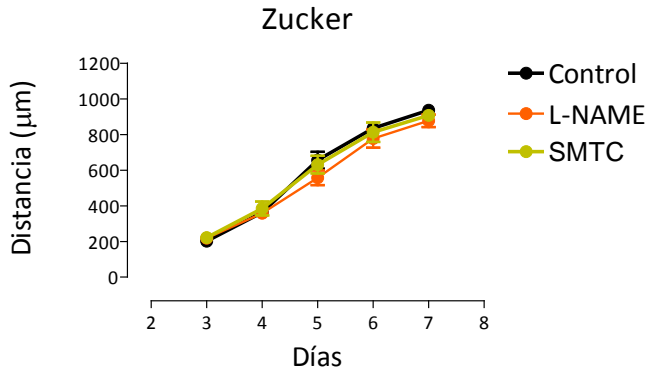


Figura 42. (A) Cuantificación de la longitud de crecimiento de nuevos vasos en explantes de aorta de ratas SHR en presencia y ausencia de L-NAME (100 μ M) o SMTC (1 μ M) **(B)** Imágenes representativas de los experimentos a “día 7”. Las imágenes se han tomado en un microscopio de transmisión Leica DM IL LED Leica cámara, objetivo 2.5x. SHR, ratas espontáneamente hipertensas. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías de $n = 4 - 16$ experimentos. La línea roja indica la medida tomada en cada eje.

A)



B)

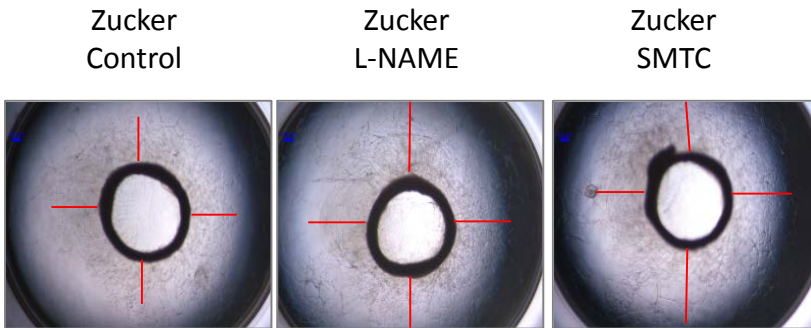


Figura 43. (A) Cuantificación de la longitud de crecimiento angiogénico en explantes de aorta de ratas Zucker en presencia y ausencia de L-NAME (100 μM) o SMTC (1 μM) **(B)** Imágenes de transmisión representativas de los experimentos a “día 7”. Las imágenes se han tomado en un microscopio de transmisión Leica DM IL LED Leica cámara, objetivo 2.5x. SMTC, S-metil-L-citrulina. Análisis estadístico: ANOVA de dos vías de $n = 4 - 6$ experimentos. La línea roja indica la medida tomada en cada eje.

Discusión

1. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE NOS Y NT-3 EN PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

1.1 Expresión en miocardio y su significación fisiopatológica

1.1.1. Cambios en la expresión génica y proteica

Se realizó el análisis de expresión de los genes objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral (eNOS, nNOS, NT-3 y TrkC) en muestras de miocardio procedentes de pacientes con distintas patologías cardiovasculares (IC, TC o IP) comparados con sujetos sanos.

En primer lugar, llama la atención la gran variabilidad de expresión génica y proteica de eNOS encontrada en Vi de pacientes con IC. Dicha variabilidad, tal como indican los resultados obtenidos, no está relacionada con las diferentes etiologías de la IC (CI, MCD u otras no isquémicas y no dilatadas), ni con enfermedades concomitantes o con los tratamientos farmacológicos que recibe cada paciente. Esta gran variabilidad justifica que, a pesar de observar un aparente incremento en la expresión de eNOS en la IC, la diferencia no alcanza significación estadística.

En el caso de nNOS, no existe tanta variabilidad de expresión en Vi de pacientes con IC pero, al igual que ocurre con eNOS, no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles sanos ni entre los distintos subgrupos de pacientes insuficientes clasificados según su etiología o tratamiento farmacológico. Por el contrario, en Vd, la expresión de nNOS es mayor en corazones trasplantados (TC) con respecto a la observada en pacientes con IC o IP. Esta mayor expresión en el grupo TC puede atribuirse a distintos factores como son la localización de la muestra obtenida, la situación clínica del paciente o,

como se discutirá más adelante, a la falta de inervación característica del corazón trasplantado (Bristow, 1990). Se debe añadir que al no disponer de muestras de Vd procedentes de donantes sanos, no podemos determinar si la expresión en el corazón trasplantado es igual o mayor que en el corazón sano.

En este punto, cabe destacar que existen gran cantidad de estudios con numerosas contradicciones acerca de la expresión y actividad de eNOS y nNOS en el corazón insuficiente. Algunos de ellos describen una disminución de la expresión de ambas enzimas en pacientes con IC (Drexler y cols., 1998; Damy y cols., 2004; Chen y cols., 2006), y otros hacen referencia a un aumento de expresión tanto de eNOS (Stein y cols., 1998; Fukuchi y cols., 1998) como de nNOS en Vi de pacientes con IC en fase terminal (Damy y cols., 2004). Por último, otros autores no encontraron cambios de expresión proteica de nNOS en muestras del Vd procedentes de pacientes con enfermedad coronaria (Chen y cols., 2006). La razón de esta discordancia podría ser la regulación específica de la expresión en cada cavidad, como se ha observado al medir la actividad de las isoformas constitutivas de NOS en ratas SHR (Nava y cols., 1995), pero también podría ser el limitado número de pacientes incluidos en estos estudios previos, mucho menor al de los incluidos en el presente trabajo. De hecho, la variabilidad encontrada en nuestros pacientes justifica la aparente contradicción descrita en la literatura.

Por lo que respecta a NT-3, y tras analizar los cambios de expresión que se producen en el miocardio de los distintos grupos de pacientes, se observa como la expresión génica se encuentra incrementada en Vi de pacientes con IC, respecto a sujetos sanos y, además, en el Vd de los pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC) se observa una mayor expresión génica de NT-3 con respecto a patologías como IC o IP. Cabe destacar que el aumento de expresión en pacientes con IC coincide con los pacientes que han desarrollado miocardiopatía dilatada ya que

las diferencias no son estadísticamente significativas cuando analizamos los otros subgrupos (cardiopatía isquémica u otras cardiopatías). Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando analizamos la expresión proteica, en la cual no se observan cambios entre sujetos sanos y con IC. Esta discordancia entre la expresión génica y proteica puede ser debida a una regulación de la expresión de neurotrofinas a nivel postraslacional como se ha evidenciado en otros casos (Narisawa-Saito y Nawa, 1996), pero también puede atribuirse a la gran variabilidad de las muestras humanas de pacientes con IC debidas a las diferencias en la situación clínica, medicación, otras patologías,... que dificulta el análisis cuantitativo de la expresión proteica mediante Western Blot cuando los cambios no son dramáticos.

Llama la atención el hecho de que, al igual que ocurría con la expresión de nNOS, en el Vd del corazón trasplantado encontramos un nivel de expresión mayor de NT-3 que en la misma cavidad de pacientes con IC o IP. De hecho, en los pacientes con IC o IP, los niveles de expresión de eNOS, nNOS y NT-3 en Vd son muy similares. Nuevamente podemos interpretar que esta peculiaridad en la expresión de dos genes estrechamente relacionados en el desarrollo y la función neuronales pueda guardar relación, entre otras consideraciones, con el hecho de que el corazón trasplantado, que ha sido totalmente denervado, puede estar sufriendo un proceso de reinervación paulatino (Wharton y cols., 1990; Schwaiger y cols., 1991; Stark y cols., 1991; Wilson y cols., 1991) siendo la mayor expresión de nNOS y NT-3 un indicador de la progresión de dicho proceso.

Por lo que respecta a la expresión del receptor TrkC, por el que la NT-3 tiene una gran afinidad, el estudio preliminar realizado en Vi de pacientes con IC no demuestra que haya cambios respecto a los corazones de donantes sanos, por lo que parece que la regulación del sistema NT-3 en corazón insuficiente se produce fundamentalmente a nivel de la neurotrofina.

1.1.2 Correlación entre distintos genes

Las neurotrofinas fueron identificadas como moléculas promotoras de la supervivencia neuronal y, en concreto, NT-3 participa en la regulación de la inervación del corazón tanto simpática como parasimpática (Scarlsbrick y cols., 1993; Govoni y cols., 2011; Hasan, 2013).

Se ha comprobado que los ratones NT-3^{-/-} mueren al nacer presentando severas anomalías cardíacas que se asemejan a la Tetralogía de Fallot humana (Donovan y cols., 1996), la cardiopatía congénita más frecuente en la edad pediátrica. Además, la supresión de una copia del gen para NT-3 da lugar a déficits anatómicos, bioquímicos y funcionales en la inervación simpática en ratones recién nacidos (Story y cols., 2000). También se ha relacionado positivamente la expresión de NT-3 con el desarrollo de la inervación del corazón (Hiltunen y cols., 1996).

Por todo ello, uno de los objetivos de la presente tesis fue establecer si existe una relación entre la NT-3 y la inervación simpática del corazón. Para ello, se analiza la correlación entre la expresión génica de NT-3 (determinada en el presente trabajo) y el ARNm de los adrenoceptores α_1 y β (cuantificado en las mismas muestras en estudios previos). Los resultados obtenidos añaden más información acerca del papel que desarrolla NT-3 en la inervación cardíaca. La correlación directa encontrada en miocardio entre los niveles de ARNm de NT-3 y los AR- α_{1A} , β_1 y β_2 , como receptores implicados en la inervación simpática del corazón, apoyan la participación de NT-3 en dicha inervación independientemente del estado del músculo cardíaco, ya que se observa correlación significativa cuando se consideran todos los individuos tanto sanos como enfermos. Es de destacar que, en el caso del AR- β_1 , sólo se observa una correlación significativa en

el Vi cuando excluimos los datos obtenidos en los donantes sanos. Esta peculiaridad puede explicarse si consideramos que en el Vi del corazón insuficiente se ha producido un marcado descenso en la expresión del AR- β_1 , pero no de los otros genes estudiados (Bristow y cols., 1993; Engelhardt y cols., 1996; Lohse y cols., 2003; Brodde y cols., 2006; Montó y cols., 2012) lo que conduce a una disminución en la funcionalidad cardiaca con pobre respuesta adrenérgica. Una regulación tan drástica de este gen en el Vi dificulta la obtención de una correlación significativa en esta cavidad cuando se analizan conjuntamente ambos grupos de individuos, pero sí que se observa dicha correlación cuando analizamos los resultados obtenidos en Vd, donde no se ha producido un cambio tan marcado en la expresión del AR- β_1 .

Es interesante señalar que, dentro de los distintos subtipos de ARs estudiados, son precisamente el AR- α_{1A} y β_1 los que tienen una localización en las proximidades de las neuronas simpáticas, mientras que α_{1B} , α_{1D} y β_2 se distribuyen en regiones menos inervadas y son sensibles a las catecolaminas circulantes (Stassen y cols., 1998; Guimaraes y Moura, 2001; García-Sevilla y Meana, 2008; Flacco y cols., 2013a). Esta observación apoya, una vez más, la relación entre NT-3 y la inervación cardiaca simpática que puede estar alterada en patologías cardiovasculares. Así, en un modelo de insuficiencia cardiaca en rata, se observa una expresión disminuida de NT-3 que, a su vez, se correlaciona con alteraciones de las terminaciones simpáticas (Kreusser y cols., 2008). Por otra parte, se ha visto que la expresión proteica de NT-3 está aumentada en corazón y arteria mesentérica de ratas SHR (Zhang y Rush, 2001).

Otra correlación interesante por su posible implicación fisiopatológica es la encontrada entre la expresión de NT-3 y eNOS en Vi y Vd de todos los sujetos incluidos en el estudio. Como se ha discutido anteriormente para los ARs, esta

correlación puede interpretarse como la existencia de un mecanismo regulador de NT-3 sobre eNOS o viceversa, pero también como la existencia de un mecanismo regulador común para ambos genes.

Muy pocos trabajos han analizado la relación existente entre NT-3 y eNOS en el sistema cardiovascular. Por un lado, NT-3 es capaz de modular la liberación de NO en células endoteliales procedentes de la arteria pulmonar humana (Meuchel y cols., 2011), por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el endotelio vascular es capaz de liberar NT-3, induciendo la activación de eNOS en la propia célula endotelial y en células próximas, siempre que expresen el receptor TrkC (Delgado y cols., 2013). De hecho, la activación del receptor conduce a la fosforilación de eNOS, pero no de nNOS ni iNOS, lo que activa el enzima produciendo un aumento de NO en la célula (Delgado y cols., 2013). Estos resultados apoyan una acción directa de NT-3 sobre eNOS, y explicarían la necesidad de un mecanismo común, regulador de la expresión de la NT-3 y su efector, eNOS, tal y como se ha observado en Vi y Vd de todos los grupos de pacientes analizados.

1.1.3 Relevancia clínica de la expresión de eNOS, nNOS y NT-3 en miocardio de pacientes insuficientes y trasplantados

Aunque existen trabajos previos que analizan la expresión de las isoformas constitutivas de NO en diferentes patologías cardiovasculares, pocos han abordado la trascendencia de los cambios de su expresión en la funcionalidad cardiaca. En el caso de las neurotrofinas, y en concreto NT-3, la evidencia experimental es inexistente. Además, la mayor parte de los trabajos han sido realizados en modelos animales modificados genéticamente o con patologías que mimetizan la IC humana tal como se ha descrito en la revisión bibliográfica de la

presente tesis (Apartado 4.5), pero faltan datos concluyentes que determinen el papel funcional de las isoformas constitutivas de NOS y la NT-3 en el corazón humano sano y enfermo. Esta situación se debe en gran parte, a los problemas técnicos y éticos que supondría una experimentación de este tipo, por lo que, una aproximación indirecta para tratar de establecer el papel de las tres proteínas en el miocardio podría ser la existencia de una correlación positiva o negativa entre los niveles de ARNm de cada gen en miocardio y las variables clínicas que caracterizan a cada patología.

Tal como reflejan las Tablas 10, 11 y 12, son numerosas las variables que se han determinado en los distintos grupos de pacientes con IC, TC o IP. Sin embargo, cuando se hace un estudio de la posible correlación existente, los resultados solo han mostrado diferencias significativas con determinadas variables de pacientes con IC o sometidos a trasplante cardiaco (TC).

En el caso de eNOS, en el corazón humano insuficiente se ha encontrado una correlación inversa entre los niveles de expresión de esta isoforma y la presión arterial pulmonar y el diámetro sistólico y diastólico del Vi. Por lo que respecta a la nNOS, su expresión se relaciona directamente con el gasto cardiaco. En el caso de NT-3, la variable con la cual correlaciona es la presión arterial pulmonar diastólica.

Son destacables las diferencias entre eNOS y nNOS en su relación con las variables indicativas de la función cardiaca. Así, mientras eNOS correlaciona con variables que determinan el estado anatómico del corazón (diamétró del Vi) y su grado de deterioro funcional (presión arterial pulmonar), nNOS se relaciona con la capacidad funcional del sistema cardiovascular (gasto cardiaco). Estas diferencias sugieren un papel modulador específico para cada isoforma, y sustentan la

evidencia previa de que la compartimentalización de las isoformas a nivel tisular y celular juega un papel importante en su funcionalidad, de manera que la diferente intervención de una u otra isoforma podría ser explicada por las diferencias a nivel de su expresión celular: endotelial o neuronal, respectivamente (Liu y Huang, 2008) o de su localización subcelular (Sears y cols., 2004).

Por lo que respecta a eNOS se ha observado en humanos que su activación da lugar a un incremento en la distensibilidad miocárdica durante la diástole (Paulus y cols., 1995). Por ello, se le atribuye al NO sintetizado por eNOS del endocardio, un papel modulador de la distensibilidad miocárdica (Bras-Silva y cols., 2008; Castro-Chaves y cols., 2009). Los resultados de la presente tesis corroboran esta observación, ya que existe una correlación directa entre la expresión de eNOS en las biopsias procedentes de pacientes trasplantados y el diámetro diastólico (y sistólico) de cada paciente. Paradójicamente, en corazones insuficientes observamos lo contrario, ya que existe una correlación inversa entre los niveles de ARNm de eNOS y el diámetro tanto en la diástole como en la sístole del Vi.

Esta aparente discrepancia en la función de eNOS en corazones sanos e insuficientes podría ser el resultado de una doble actividad del NO, por un lado como regulador de la distensibilidad miocárdica en corazones trasplantados (procedentes de donantes sanos y por tanto con una estructura no patológica), pero también como cardioprotector, evitando una excesiva hipertrofia cardiaca asociada a situaciones en las que el corazón se ha visto estructuralmente afectado por lesiones isquémicas o por el remodelado característico de la insuficiencia cardiaca (Manoury y cols., 2012). Además, el papel protector atribuido al NO en corazón insuficiente coincide con resultados previos (Heymes y cols., 1999; Bronzwaer y cols., 2002) que describen condiciones hemodinámicas favorables al

mismo tiempo que un incremento en la expresión de eNOS en el Vi de atletas, pero también en los pacientes con IC que poseen un perfil hemodinámico más favorable. Por el contrario, una actividad de eNOS deficiente da lugar a hipertrofia cardíaca e IC postnatal (Liu y Feng, 2012).

Esta doble función protectora del NO endotelial en humanos, se puede también observar en modelos animales, donde la regulación al alza de la expresión de eNOS confiere efectos protectores en la IC (Janssens y cols., 2004; Zhang y Casadei, 2012) mientras que, la supresión de eNOS da lugar a efectos cardiovasculares perjudiciales (Bloch y cols., 1999; Papapetropoulos y cols., 1999; Liu y Huang, 2008; Tsutsui y cols., 2010; Umar y van der Laarse, 2010; Manoury y cols., 2012).

Otro resultado novedoso de la presente tesis es la observación de que los niveles de eNOS en el Vi de pacientes con IC correlacionan de manera inversa con la presión arterial pulmonar. De hecho, confirmando la relación entre ambas variables, en el Vi de los pacientes con niveles normales de PAP, se encontró un aumento de expresión génica y proteica de eNOS comparado con pacientes con hipertensión pulmonar (HP) moderada (PAP sistólica > 35 mm Hg, según Guglin y Khan, 2010). Se ha visto que la IC es la causa más común de HP, la cual supone peor pronóstico y se asocia al incremento de la mortalidad (Guglin y Khan, 2010; Haddad y cols., 2011). Estudios previos en animales, han demostrado un incremento de eNOS durante el desarrollo de HP (Zuckerbraun y cols., 2011). Además, en niños con alguna enfermedad cardíaca congénita, se ha observado una regulación al alza de eNOS en el endotelio pulmonar en los primeros estadios de la HP, y esta regulación es un mecanismo compensatorio que limita el aumento de la PAP (Hoehn y cols., 2009). En esta misma línea, se ha observado que el metabolismo de la arginina (precursor del NO) se encuentra alterado en pacientes

con IC avanzada asociada a HP (Shao y cols., 2012), a la vez que datos recientes indican que una regulación a la baja de la ruta metabólica del GMPc-NO contribuye a la HP asociada con la IC (Lindman y Chakinala, 2010). Además de todo lo expuesto, existe una contrastada experiencia clínica que demuestra como el NO inhalado es un potente vasodilatador de gran utilidad en el tratamiento de la HP en pacientes con IC (Guglin y Khan, 2010). Todas estas evidencias relacionan la biodisponibilidad del NO en el miocardio y en la vasculatura pulmonar con la HP. Por consiguiente, los elevados niveles génicos y proteicos de eNOS, pero no de nNOS, observados en el Vi de pacientes con valores normales de PAP sugieren que la regulación selectiva al alza de eNOS podría ser un mecanismo protector en la IC, el cual modula el aumento de PAP. Por tanto, la activación selectiva de eNOS puede ser un objetivo prometedor en el tratamiento de la HP asociada a la IC.

Como ya se ha comentado previamente, la literatura establece numerosas discrepancias acerca del papel de nNOS en la IC (Drexler y cols., 1998; Stein y cols., 1998; Damy y cols., 2004; Chen y cols., 2006). Sin embargo, los resultados del presente trabajo muestran una variabilidad en la expresión de nNOS en el Vi de pacientes con IC y sugieren que la expresión de nNOS en el Vi, pero no en el Vd de un paciente determinado, podría estar relacionada con la función del corazón ya que se correlaciona con un parámetro característico de dicha función: el gasto cardiaco. El GC se define como el volumen de sangre que expulsa el corazón por minuto y es un marcador de la funcionalidad cardiaca (Agüero y cols., 2012). Se observó que los niveles elevados de ARNm de nNOS en el Vi se acompañan de un mayor GC, un resultado que coincide con estudios previos realizados en ratones (Barouch y cols., 2002; Dawson y cols., 2005; Saraiva y cols., 2005; Vandsburger y cols., 2007). Así, Barouch y cols (2002) describen que la localización subcelular de las NOS constitutivas junto con sus moléculas efectoras pueden constituir un

mecanismo regulador importante en el corazón donde el NO inhibe canales de calcio dependientes del voltaje pero, a la vez, estimula la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico lo que conduce a efectos variables sobre la contractilidad miocárdica. Estos autores demuestran que una localización específica de cada isoforma puede regular de forma diferencial la funcionalidad cardiaca. La eNOS se localiza en las caveolas (Garcia-Cardena y cols., 1997; Feron y cols., 1998; Hare y cols., 2000), junto con los adrenoceptores β y los canales de calcio dependientes del voltaje por lo que la activación de esta isoforma tendría un efecto inhibitor del inotropismo adrenérgico. Por el contrario, la nNOS se localiza en el retículo sarcoplásmico y el NO liberado por esta isoforma, *in vitro*, favorece la liberación de calcio del retículo vía los receptores de rianodina (Xu y cols., 1998; Eu y cols., 2000), lo que favorecería la contractilidad cardiaca (Vandsburger y cols., 2007). De hecho, en los ratones nNOS^{-/-} se observan respuestas inotrópicas deprimidas junto con una mayor hipertrofia y mortalidad (Dawson y cols., 2005; Saraiva y cols., 2005) mientras que los ratones eNOS^{-/-} exhiben una contractilidad miocárdica aumentada (Barouch y cols., 2002).

Por tanto, el hecho de que la expresión de nNOS, pero no de eNOS, correlacione con el GC sugiere un papel específico del NO liberado por la acción de nNOS como modulador de la función cardiaca, y sustenta su posible relación con la inervación nitrérgica implicada en la contractilidad miocárdica (Brack y Coote, 2011).

Por lo que respecta a la relación entre la expresión de NT-3 en corazón y las variables clínicas determinadas en cada grupo de pacientes, encontramos que, al igual que ocurría con la expresión de eNOS, existe una correlación inversa entre NT-3 y la PAP diastólica.

Se ha comentado previamente que la expresión génica de eNOS y NT-3 se correlacionan en todos los pacientes pero también en los individuos sanos, lo que puede estar relacionado con el hecho de que NT-3, a través de su receptor TrkC, fosforila a eNOS en Ser 1177 (Delgado y cols., 2013), lo que activa la enzima aumentando la producción de NO. Según la correlación clínica encontrada, la actividad de NT-3 sobre eNOS de las arterias pulmonares puede ser clave para el mantenimiento de una menor PAP en pacientes insuficientes, en los que una de las consecuencias de la cardiopatía es la HP. Por tanto, un nivel de expresión de NT-3 y eNOS más elevado, implicaría menor PAP y, por tanto, mejor estado hemodinámico para el paciente. Esta hipótesis se sustenta también en resultados obtenidos en arteria pulmonar humana aislada, donde se observa que NT-3 libera NO de forma rápida (< 10 min) y produce una vasodilatación dosis-dependiente y semejante a la acetilcolina (Meuchel y col. 2011). Se ha visto también que en células endoteliales aisladas de este mismo vaso, NT-3 libera NO y aumenta el GMPc, acorde con una acción directa de NT-3 sobre el endotelio vascular (Meuchel y col. 2011).

Estos resultados abren nuevas vías para el abordaje de la HP, pudiendo considerar la NT-3 como una posible diana terapéutica a este nivel.

1.1.4 Corazón trasplantado y reinervación cardiaca

Está bien demostrada la existencia de denervación cardiaca completa tras el trasplante debida a la sección de los grandes vasos (aorta y tronco pulmonar) por donde mayoritariamente se disponen los troncos nerviosos cardiacos que también son seccionados (Bristow, 1990; Mortara, 2001). Sin embargo, tras el trasplante, aparece un fenómeno progresivo de reinervación, que puede ser evidenciado mediante técnicas de imagen, electrocardiográficas y datos clínicos.

De hecho, se ha comprobado la existencia de reinervación cardíaca simpática precoz y parcial dentro de los 12 primeros meses posteriores al trasplante cardíaco (Buendia-Fuentes y cols., 2010) que puede ser completa tras 3 años (Bengel y cols., 1999). La reinervación miocárdica es responsable de una mejoría en la eficiencia del corazón implantado, de una mejor tolerancia al ejercicio y de la reaparición de la sensibilidad nociceptiva ante eventos isquémicos (Bengel y cols., 2001) lo que redundaría en una mejor calidad de vida del paciente trasplantado. Sin embargo, aunque el fenómeno de reinervación cardíaca simpática tras trasplante es evidente, se conoce muy poco sobre los factores que puedan estar relacionados con su aparición. Hasta ahora, se han considerado factores como edad del donante y/o del receptor, duración de la intervención (tiempo de circulación extracorpórea, clampaje aórtico), frecuencia de rechazos,... como candidatos a determinar el mayor o menor grado de reinervación cardíaca (Buendia-Fuentes y cols., 2010), pero no se ha abordado el análisis de las vías de señalización celular que podrían estar implicadas en el mismo.

En este sentido se sabe que NT-3 se expresa en gran proporción en las regiones donde se está produciendo el crecimiento de los axones de las neuronas simpáticas y que las neuronas simpáticas postganglionares extienden sus axones a través de regiones productoras de NT-3 como los vasos (Howe y Mobley, 2005). También están bien establecidas las funciones de NT-3 en el desarrollo y maduración del sistema nervioso simpático que son: diferenciación neuronal, crecimiento de las prolongaciones neurales, supervivencia neuronal y control de la transmisión sináptica (Zhou y Rush, 1996). Por todo ello, podemos suponer que tras el trasplante, el corazón que está siendo sometido a un proceso de reinervación puede expresar en mayor proporción NT-3 como factor modulador de este proceso.

Los resultados de la presente tesis sustentan esta hipótesis ya que observamos unos niveles mayores de expresión génica de NT-3 en Vd de corazón trasplantado si lo comparamos con el Vd de corazón insuficiente o de pacientes con IP. Al no disponer de muestras de Vd de donantes sanos, no ha sido posible establecer si los niveles de NT-3 son menores a los encontrados en corazón trasplantado, pero podemos inferir que este es el caso si consideramos la expresión en Vi de corazón sano e insuficiente.

Es interesante señalar que se observa un cambio semejante en los niveles de expresión de nNOS, la isoforma de localización neuronal (Försterman y Sessa, 2012), la cual se encuentra en mayor proporción en Vd de corazón trasplantado respecto a las otras muestras cardíacas. También en este caso podemos relacionar su mayor expresión al proceso de reinervación que está sufriendo el corazón trasplantado.

La posible implicación de nNOS y NT-3 en la reinervación miocárdica no ha sido estudiada hasta el momento por ningún grupo de investigación y supone, por tanto, uno de los resultados más innovadores de la presente tesis doctoral. Así pues, la localización celular en terminaciones nerviosas centrales y periféricas tanto de nNOS (Försterman y Sessa, 2012) como de NT-3 (Scarlsbrick y cols., 1993), así como la participación de esta última en el desarrollo y supervivencia neuronal (Caporali y Emanuelli, 2009), pueden explicar este aumento de expresión de ambas moléculas en corazones trasplantados relacionándolas con la reinervación cardíaca que se produce tras el trasplante (Bengel y cols., 2001; Buendia-Fuentes y cols., 2010). Para tratar de establecer de un modo más directo esta relación, se analizó la posible correlación entre los niveles de expresión de NT-3 y nNOS en miocardio y los días transcurridos desde el trasplante, pero no se observó correlación significativa en ningún caso.

Cabe destacar que, en el presente estudio, el intervalo de tiempo en el que se han recogido las muestras es de 14 a 471 días tras el trasplante y dado que la reinervación se inicia durante el primer año pero no finaliza hasta, al menos, 3 años desde el trasplante cardiaco (Bengel y cols., 1999), podemos interpretar nuestros resultados suponiendo que, en el intervalo de tiempo considerado, los niveles de NT-3 y nNOS están aumentados, pues el proceso se está iniciando, por lo que serían necesarios estudios a más largo plazo para determinar si, con el tiempo, van decayendo los niveles de expresión de ambos genes a medida que el proceso de reinervación se va completando.

Hay que señalar, sin embargo, que únicamente se observó una correlación significativa y positiva con los días transcurridos tras el trasplante cardiaco en el caso de eNOS, lo que parece ser indicativo de una normalización de la función endotelial tras el trasplante que sería beneficiosa para el sistema cardiovascular. Así, existen estudios donde se ha visto que la inhibición de la síntesis de NO empeora la disfunción endotelial causada por el trasplante y acelera el proceso de engrosamiento de la capa endotelial, lo que lleva a la vasculopatía coronaria del injerto (Perrault y cols., 2003).

1.2 Expresión en linfocitos circulantes y su significación fisiopatológica

1.2.1 Cambios en la expresión génica

La predicción del riesgo de un evento cardiovascular grave es uno de los principales retos de la medicina moderna y el uso de biomarcadores puede proporcionar información sobre el grado de enfermedad del paciente, sobre su pronóstico o sobre la respuesta al tratamiento, además de ser, probablemente, la llave para la prevención en un futuro no muy lejano (Martín-Ventura y cols., 2009). En esta línea, el uso de los linfocitos circulantes para el estudio de

proteínas como biomarcadores de la enfermedad cardiovascular, ha sido ampliamente utilizado por ser un tipo de muestra biológica fácil y cómoda de obtener.

Por ello, en el presente trabajo, después de haber determinado los cambios en la expresión de eNOS, nNOS y NT-3 en distintos grupos de pacientes con IC (antes y después del trasplante) e IP, se analizó la expresión de esos genes en linfocitos procedentes de los mismos pacientes pero, además, ampliamos el estudio a otros grupos de pacientes en los que, por cuestiones éticas, no es posible obtener muestras cardíacas. Por ello, el estudio en linfocitos incluye individuos sanos, en un número mayor al de los donantes cardíacos, pacientes con hipertensión arterial de reciente diagnóstico y no sometidos a tratamiento antihipertensivo, pacientes con IC antes y después del trasplante, pacientes con IP y un grupo de pacientes con alteraciones genéticas que les predisponen para sufrir muerte súbita (MS) por taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica, pero que, clínicamente, no manifiestan ningún tipo de patología cardiovascular.

En primer lugar, confirmamos, en nuestras condiciones experimentales, la expresión de eNOS, nNOS (Saluja y cols., 2011) y NT-3 en linfocitos circulantes (Kalinowska-Lyszczarz y cols., 2011) aunque, en el caso de la nNOS, los niveles detectados son prácticamente imperceptibles por lo que no continuamos su estudio en los restantes grupos. Es de destacar que, en el caso de la NT-3, también se obtienen niveles muy bajos con una de las sondas utilizadas por lo que, habiendo demostrado la correlación existente entre ambas sondas, proseguimos el trabajo con la que nos da niveles mejor cuantificables.

Realizando un análisis comparativo de la expresión de eNOS entre los distintos grupos de pacientes, se observa una ligera disminución en linfocitos procedentes de pacientes con HTA, pero sin alcanzar significación estadística con respecto a la expresión en pacientes sin sintomatología de patología cardiovascular (Sanos y MS). Sin embargo, esta disminución sí que alcanza significación estadística en linfocitos de pacientes con patologías cardiovasculares como IC o IP.

Es de señalar que, tras el trasplante, aunque los niveles de expresión de eNOS continúan disminuidos respecto a los controles sanos, han aumentado significativamente si los comparamos con los pacientes con IC antes del trasplante. Esto indica que la menor expresión de eNOS tiene lugar como resultado del desarrollo de la patología cardiovascular, y que se normaliza cuando el corazón insuficiente es trasplantado y el sistema cardiovascular recupera su funcionamiento normal.

Como ya se ha comentado anteriormente, el NO juega un papel trascendental a nivel cardiovascular y su importancia en el endotelio vascular ha sido profusamente estudiada como mediador de la vasodilatación, angiogénesis, apoptosis y proliferación celular,... (Marti y cols., 2012), sin embargo, su papel en los linfocitos, en relación con la patología cardiovascular no ha sido establecido.

Por lo que respecta al análisis de expresión de NT-3 en linfocitos circulantes, se observa que, al revés de lo que ocurre con la expresión de eNOS, los niveles de ARNm de NT-3 se encuentran incrementados en pacientes con HTA o IC con respecto a individuos sanos o con antecedentes familiares de muerte súbita pero sin sintomatología de patología cardiovascular (MS). Sin embargo, los niveles de NT-3 en linfocitos se normalizan tras el trasplante al igual que no están

aumentados ni disminuidos significativamente en linfocitos de pacientes con IP. Dado que no se conoce el papel que NT-3 desempeña en la funcionalidad del linfocito, los cambios observados solo pueden interpretarse, en el presente trabajo, en un sentido general como posibles marcadores de cambios a nivel cardiovascular.

Concretamente, en pacientes con IC, diversos autores han sugerido que los niveles de expresión de ARNm para un determinado gen en linfocitos circulantes podrían ser el reflejo de lo que ocurre en el corazón insuficiente (Brodde y cols., 1986; Hata y cols., 2006; Iaccarino y cols., 2005; Oliver y cols., 2010) lo que podría hacerse extensivo a otros territorios del sistema cardiovascular. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados previos publicados por nuestro grupo de investigación (Oliver y cols., 2010; Agüero y cols., 2009; Monto y cols., 2012), éste escenario no tiene lugar de forma generalizada, sino que podemos hablar de dos situaciones diferentes. El linfocito puede ser un buen marcador de cambios generales, que afectan por igual a todo el sistema cardiovascular y que por tanto, vamos a encontrar tanto en las células sanguíneas circulantes como en los distintos tipos celulares que integran este sistema. Este sería el caso de la regulación al alza de las quinasas acopladas a proteína G (GRKs) cuando se produce una elevación de las catecolaminas circulantes en pacientes con hipertensión o IC (Michel y cols., 1986; Brodde y cols., 1989; Gros y cols., 1997; Gros y cols., 2000; Dzimiri y cols., 2002; Oyama y cols., 2005; Hata y cols., 2006; Cohn y cols., 2009). Sin embargo, en otras ocasiones, se produce una regulación específica de la expresión de un gen en un determinado tejido y esto no está reflejado en los linfocitos circulantes, como es el caso de la disminución drástica de la expresión de los ARs β_1 en corazón insuficiente que no se observa en los linfocitos circulantes (Agüero y cols., 2009; Montó et al., 2012).

Según los resultados del presente trabajo, en los grupos de pacientes en los que hemos obtenido simultáneamente muestras de corazón y linfocitos (IC, TC e IP) los cambios detectados en linfocitos no se reflejan en corazón en el caso de eNOS, que no varía en corazón y disminuye en linfocitos de pacientes con IC, TC o IP. Sin embargo, sí encontramos cambios similares en el caso de NT-3, que aumenta tanto en linfocitos como en Vi en pacientes con IC, lo que sugiere la existencia de un mecanismo general de regulación génica de NT-3 a nivel cardiovascular en los pacientes con esta patología.

1.2.2. Trascendencia fisiopatológica de los cambios observados en linfocitos

No podemos determinar la trascendencia fisiopatológica de los cambios en la expresión de eNOS y NT-3 en linfocitos porque, según los resultados obtenidos y a diferencia de lo que se ha observado en corazón, sus niveles en linfocitos no correlacionan con ninguna de las variables clínicas analizadas. Tampoco en este caso se ha encontrado una correlación entre ambos genes que sustente un mecanismo regulador común, como habíamos propuesto en corazón, y que podría estar basado en la participación en una vía de señalización común (Meuchel y cols., 2011; Delgado y cols., 2013). En los linfocitos, los cuales no expresan el receptor TrkC, la NT-3 sería liberada y actuaría de forma paracrina modulando diversas rutas, incluida eNOS, presentes en otros tipos celulares. Esto explicaría que no sea necesaria una regulación conjunta de la expresión de NT-3 y eNOS en el linfocito.

Es necesario comentar el caso particular de los pacientes trasplantados, en los que encontramos unos niveles de NT-3 elevados en corazón pero no en linfocitos. Esta discordancia podría explicarse si consideramos la necesidad de una

regulación al alza de la NT-3 específica del miocardio para favorecer la reinervación del mismo.

De la misma forma que ocurre en miocardio, en linfocitos también se observa una correlación entre los niveles de expresión de eNOS y los días post trasplante, que corrobora la implicación de una normalización en la función endotelial cuando el sistema cardiovascular va adecuando su funcionamiento gracias al injerto, y se restauran los valores clínicos que indican una funcionalidad cardíaca recuperada (FEVI, PAP,...).

2. ANGIOGÉNESIS

2.1 Puesta a punto de la técnica

La angiogénesis es el proceso de crecimiento de nuevos vasos a partir de otros ya existentes (Bir y cols., 2012). Uno de los principales objetivos de la presente tesis fue analizar la influencia del NO sobre el proceso angiogénico, por lo que iniciamos el trabajo con la puesta a punto de un modelo experimental adecuado. Existen diferentes métodos “*in vivo*”, “*ex vivo*” e “*in vitro*” que tratan de reproducir las condiciones fisiológicas. De todos ellos, se seleccionó el método de cultivo de vasos en matriz tridimensional de Matrigel™ “*ex vivo*”, porque, a diferencia de los cultivos de células endoteliales, permite mantener la integridad del vaso y, a diferencia de los métodos “*in vivo*”, permite un análisis más preciso de los mecanismos que intervienen en el proceso al eliminar la regulación neurohumoral. Este método de angiogénesis “*ex vivo*”, ha sido desarrollado fundamentalmente con aorta de rata y ratón (Nicosia, 2009; Nicosia y cols., 2011) pero en la presente tesis se determinó que el crecimiento de nuevos vasos tiene lugar independientemente del tipo de vaso utilizado, ya que se observó en aorta

de rata y ratón, al igual que en 2ª rama de arteria mesentérica de rata. Además, nuestro grupo ha demostrado que el crecimiento angiogénico también tiene lugar en arterias femorales humanas (Hernández y cols., 2010).

Numerosos son los factores que regulan el crecimiento de nuevos vasos, entre los que se encuentran principalmente factores de crecimiento como el VEGF (Ziche y Morbidelli, 2000; Cooke, 2003; Bir y cols., 2012) o el FGF-2, entre otros (Ziche y Morbidelli, 2000). Para determinar su incidencia en el cultivo se cultivaron los diversos explantes en presencia y ausencia de factores de crecimiento, observándose una respuesta angiogénica más marcada en presencia de éstos. Con el fin de reproducir las mejores condiciones fisiológicas, los ensayos se realizaron utilizando aorta de rata en presencia de factores de crecimiento.

Para cuantificar la cinética de crecimiento, se utilizan con frecuencia marcadores fluorescentes como la calceína, que al introducirse en las células permiten cuantificar el crecimiento en función de las unidades de fluorescencia que, arbitrariamente, se definen en cada caso. Este método, que facilita la obtención de imágenes representativas del crecimiento, implica un sesgo en los resultados al incluir en la cuantificación todas las células del campo seleccionado, sin discriminar las que están integradas en las estructuras de los nuevos vasos de aquellas que se encuentran libremente dispersas en el medio y, además el crecimiento tridimensional de los nuevos vasos enmascara la medición de la intensidad de fluorescencia.

Para evitar este sesgo, en el presente trabajo se estableció como método de seguimiento la medida de la distancia en μm de los ejes correspondientes a los cuatro polos terrestres tomando como punto origen en cada caso la superficie externa del anillo. La medición se realizó desde el "día 3" hasta el "día 7" del

cultivo, momento en el que el crecimiento longitudinal se detiene por alcanzar los extremos del pocillo y a partir del cual los anillos comienzan a retraerse.

2.2 Implicación de las capas vasculares en angiogénesis

Con el fin de determinar la implicación de las células endoteliales (Nicosia, 2009), pero también la de células precursoras localizadas en la capa más externa del vaso (Diglio y cols., 1989), se cultivaron los vasos en presencia o ausencia de la capa endotelial y adventicia. Se observa como, en ausencia de la capa endotelial, la longitud de crecimiento de los nuevos vasos se produce de la misma forma que en presencia de ella. En cambio, tras eliminar la capa adventicia, se observa como los anillos, con el tiempo, pierden su capacidad angiogénica además de su morfología. Por tanto, la presencia de la capa adventicia es determinante en el proceso.

Existen diversos trabajos publicados en los últimos años donde se sugiere la existencia de una zona en la pared de los vasos sanguíneos de tamaño mediano-grande a la que han denominado “zona vasculogénica” (Zengin y cols., 2006; Tilki y cols., 2009). Esta zona se encuentra localizada entre la capa muscular lisa y la capa adventicia, y en ella se albergan un conjunto de células madre pluripotenciales mesenquimales (MSCs) y hematopoyéticas (HSCs), así como células progenitoras endoteliales (EPCs), musculares (MPCs) y hematopoyéticas (HPCs) (Tilki y cols., 2009). Por lo que respecta a las EPCs, esta zona presente en la pared vascular fue considerada el primer lugar donde se localizaron fuera de la médula ósea. Tanto las EPCs como las células endoteliales diferenciadas son participantes activas en la formación de nuevos vasos (Tilki y cols., 2009) por lo que la localización de las EPCs en la adventicia explica que la presencia de esta capa sea indispensable para que se produzca el crecimiento angiogénico.

2.3 Angiogénesis y expresión de eNOS, nNOS y NT-3

Como ya se ha comentado, el NO está implicado en el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares como la HTA o IC y, a su vez, la angiogénesis se ve alterada en enfermedades que cursan con disfunción endotelial como la HTA (Ie Noble y cols., 1998) o los procesos isquémicos (Bir y cols., 2012).

Para hacer un análisis de la intervención del NO en el proceso angiogénico, se planteó determinar, en primer lugar, si la expresión de las isoformas constitutivas de NOS se alteraba a lo largo del proceso. Para ello, se determinaron los niveles de ARNm de eNOS y nNOS antes y después del cultivo. Además, como hemos visto que NT-3 actúa fosforilando la eNOS, y sabiendo que la aorta de rata expresa NT-3 (Delgado y cols., 2013), se planteó determinar también la expresión de esta neurotrofina.

En el caso de eNOS, es interesante observar que su expresión es mayor en el anillo aórtico que en los nuevos vasos formados, a pesar de que estos están formados en su mayoría por células endoteliales, mientras que en la estructura del anillo de aorta las células endoteliales suponen una parte proporcionalmente mucho menor. En cualquier caso, la expresión se mantiene durante el cultivo salvo en el caso en el que se separan los nuevos vasos del anillo original. Cuando se extraen y se resiembran los nuevos vasos sin anillo, la expresión de eNOS cae significativamente, lo que nos indica la existencia de un factor modulador procedente del anillo que mantiene la expresión génica de eNOS en los nuevos vasos formados. No existen evidencias previas que hayan descrito un resultado semejante o ayuden a clarificar la naturaleza de este factor.

Para tratar de aclarar la participación del anillo en la expresión de eNOS en los nuevos vasos, se realizaron nuevos experimentos en los que los nuevos

vasos se separan del anillo original y se resiembran junto con este anillo situado en un inserto a fin de evitar el contacto directo con los nuevos vasos (Delgado y cols., 2013). También en este caso se observa que la expresión de eNOS disminuye drásticamente, luego el factor modulador de su expresión, procedente del anillo, no es un mediador que se libera al medio de cultivo sino que requiere el contacto directo entre las células.

Tratando de hacer una interpretación del interés de estos resultados se puede plantear que la presencia de la isoforma endotelial (eNOS) en las células endoteliales puede ser un elemento necesario cuando existe comunicación entre estas células endoteliales y las células adyacentes (células de músculo liso vascular, fibroblastos, pericitos,...) pero no tanto cuando se elimina dicha comunicación. Si tenemos en cuenta la peculiaridad del NO de sintetizarse en la célula endotelial y difundir a las células adyacentes (Ignarro y cols., 1999), donde ejerce su acción, se podría pensar que, cuando no existen estas células adyacentes, la expresión de eNOS en la célula endotelial ya no resulta necesaria y se regula a la baja.

En el caso de nNOS, se observó cómo, tras 7 días de crecimiento, los niveles de expresión fueron muy bajos tanto en el anillo como en los nuevos vasos formados, y lo mismo ocurre con la NT-3. Dado que nNOS y NT-3 están directamente relacionadas con el desarrollo neuronal (Zhou y Rush, 1996; Caporali y Emanuelli, 2009; Försterman y Sessa, 2012), la pérdida de expresión de ambos genes podría ser una consecuencia de la eliminación de las terminaciones nerviosas que se produce al diseccionar la arteria. Para sustentar esta hipótesis, y descartar que la pérdida de expresión se derive de las condiciones del cultivo angiogénico, se cuantificaron los niveles de ARNm de nNOS y NT-3 en anillos aórticos aislados y mantenidos en un medio de cultivo que no permite el

crecimiento angiogénico pero que, al incubarlos en las condiciones adecuadas, inician dicho crecimiento (anillos quiescentes, Nicosia, 2009). Los resultados muestran como, en el caso de eNOS, la expresión génica es similar en anillos quiescentes con respecto a la expresión en el anillo original, sin embargo, en el caso de nNOS y NT-3, la expresión se pierde en los anillos quiescentes, lo mismo que ocurría cuando estaban sometidos al proceso angiogénico. Estos resultados novedosos muestran que la pérdida de expresión de nNOS y NT-3 no se debe a las condiciones experimentales ya que la expresión desaparece tanto en aorta normal como en anillos quiescentes, sino que la causa más probable de la pérdida de expresión está relacionada con la pérdida de la inervación que se produce tras la disección del anillo.

2.4 Angiogénesis, enfermedades cardiovasculares y NO

Una vez visto como afecta el cultivo sobre los niveles de expresión de los 3 genes, se determinó la función del NO sobre el crecimiento de nuevos vasos. Para ello se utilizó L-NAME como inhibidor no selectivo de las tres isoformas de NOS (Victor y cols., 2009; Flacco y cols., 2013b), y SMTC como inhibidor selectivo de la isoforma neuronal de NOS (nNOS) (Dautzenberg y cols., 2011), además de DETA-NO como donador de NO (Mooradian y cols., 1995), NTG como liberador de especies nitrogenadas (Nuñez y cols., 2005) y ODQ como inhibidor de la enzima guanilato ciclasa (Garthwaite y cols., 1995; Flacco y cols., 2013b).

La inhibición no selectiva de la síntesis de NO con L-NAME da lugar a un incremento en la longitud de crecimiento de nuevos vasos en aorta de rata que se observa a lo largo de todo el cultivo, lo que sugiere que el NO endógeno puede estar ejerciendo un efecto antiangiogénico. Ya que se ha comprobado que nNOS desaparece e iNOS no se induce en nuestras condiciones experimentales, el NO

endógeno que modula el proceso procedería de eNOS. Otra prueba de la participación exclusiva del NO liberado por eNOS en el proceso es que el SMTC, inhibidor selectivo de nNOS, no afecta el proceso.

La literatura proporciona numerosas discrepancias acerca del papel del NO en la angiogénesis (Pipili-Synetos y cols., 1994; Ziche y Morbidelli, 2000; Bir y cols., 2012). Estas discordancias pueden ser debidas a las diferentes rutas metabólicas en las que se encuentra implicado el NO (Hare y Colucci, 1995; Liu y Huang, 2008; Zhang y Casadei, 2012) junto a diversas limitaciones metodológicas. La mayoría de los estudios sustentan un efecto potenciador del NO sobre el proceso, teniendo en cuenta resultados indirectos como el efecto estimulante que tiene el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) liberado en los vasos sobre la síntesis del NO (Ziche y Morbidelli, 2000; Cooke, 2003) o el uso de donadores de NO que, actuando a través de la enzima guanilato ciclasa (Ziche y Morbidelli, 2000; Bir y cols., 2012), también pueden potenciar la angiogénesis. Además, se ha visto que la inhibición de las enzimas que regulan la síntesis de NO, da lugar a ciertas anormalidades en el crecimiento de nuevos vasos (Ziche y Morbidelli, 2000). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se realizaron “*in vivo*”, con la posible intervención de mecanismos reguladores neurohumorales, o con células endoteliales cultivadas, en las que sólo se observa proliferación y una disposición más o menos ordenada. Otros autores, trabajando en condiciones más semejantes a las del presente trabajo, encuentran un efecto anti-angiogénico del NO (Pipili-Synetos y cols., 1994; Sakkoula y cols., 1997; Pipili-Synetos y cols., 2000).

El efecto antiangiogénico del NO se corroboró en nuestras condiciones con el uso del donante de NO, DETA-NO, que a elevadas dosis inhibe significativamente el crecimiento angiogénico. El hecho de que la adición del

ODQ, un inhibidor de la GCs, no modifique este efecto inhibitor, excluye la participación de esta enzima en el proceso, al menos en nuestras condiciones. A estos resultados hay que añadir que la nitroglicerina, un agente capaz de liberar especies nitrogenadas que activan la GCs (Nuñez y cols., 2005), tampoco afecta al proceso de crecimiento de nuevos vasos a las concentraciones en que esta activación es máxima. La incubación del anillo con nitroglicerina junto con ODQ no modifica tampoco el proceso angiogénico.

Únicamente la concentración de nitroglicerina que produce una vasodilatación moderada inhibe el crecimiento angiogénico y esta acción no se observa en presencia de DMSO como vehículo, por lo que parece estar relacionada con la liberación de especies nitrogenadas que pueden ser alteradas por la actividad captadora de radicales libres del DMSO (Ali, 2001).

Hay que recordar que, aunque la activación de la GCs pueda favorecer el proceso angiogénico (Namkoong y cols., 2005), otra de las dianas biológicas del NO es la enzima CcO mitocondrial (Victor y cols, 2009; Larsen y cols., 2012), compitiendo con el O₂ a este nivel y produciendo una disminución del consumo del O₂ mitocondrial más evidente cuanto menor es la concentración de O₂. Este mecanismo permite que, en condiciones de hipoxia moderada, la presencia de NO en la célula redireccione el O₂ de la mitocondria (su principal consumidor) a las otras dianas celulares del O₂, favoreciendo así su redistribución y evitando al máximo los efectos deletéreos de la hipoxia en la célula (Hagen y cols 2003 Victor y cols., 2009; Larsen y cols., 2012). De hecho, se ha visto que gracias a la presencia del NO, la enzima prolilhidroxilasa (PHD2) se mantiene activa en hipoxia, al disponer de un nivel de O₂ adecuado para mantener su actividad y evita la acumulación de HIF-1 α (Hagen y cols., 2003; Victor y cols., 2009), el mediador más importante del proceso angiogénico en hipoxia. Por ello, la actividad

antiangiogénica manifestada por el NO procedente de eNOS en nuestras condiciones experimentales, podría atribuirse a su acción sobre la CcO mitocondrial y podría derivar de la disminución en la capacidad metabólica de la célula al disminuir el consumo de O₂ (Victor y cols, 2009; Larsen y cols., 2012). Esta capacidad del NO para mantener un nivel de “quiescencia” celular ya ha sido explorada sobre las células madre neurales y se ha observado que la activación de eNOS de las células madre neurales por NT-3 y la consiguiente liberación de NO reduce la proliferación de estas células, manteniendo una población quiescente de las mismas (Delgado y cols., 2013).

Una vez visto lo que ocurre en aorta de rata Wistar, completamos el estudio analizando la acción del L-NAME en aorta procedente de ratas hipertensas (SHR) o con síndrome metabólico (ratas Zucker).

Se ha comprobado que en situaciones patológicas como diabetes, aterosclerosis, HTA e IC, la síntesis excesiva de ROS o la disminución de la biodisponibilidad de NO, dan lugar a disfunción endotelial, proliferación celular, migración, inflamación, apoptosis, fibrosis, hipertrofia cardiovascular y remodelado (Bir SC, 2012) y existen estudios que relacionan directamente la HTA con un crecimiento angiogénico alterado o reducido (Wang y cols., 2004; Kruzliak y cols., 2013). Estos resultados coinciden con los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral, donde el crecimiento de nuevos vasos en ratas SHR y Zucker no es modificado por L-NAME o SMTC, lo que puede interpretarse por una falta de biodisponibilidad de NO procedente de la eNOS en estas patologías.

Asumiendo que una angiogénesis terapéutica podría ser un avance médico para el tratamiento de enfermedades isquémicas (Bir y cols., 2012; Ziche y Morbidelli, 2000) o para la hipertensión arterial (Kruzliak y cols., 2012) al asegurar

la vasodilatación y la neovascularización, el efecto del NO a este nivel no está claro y dependerá de numerosos factores, pudiendo ser distinto en función de la ruta y el mecanismo implicado. Se requieren más estudios acerca del posible papel terapéutico del NO sobre la angiogénesis en patologías cardiovasculares.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La correlación existente entre la expresión de eNOS en el miocardio y el diámetro sistólico y diastólico del Vi sugiere una doble actividad moduladora específica de esta isoforma: por un lado facilita la distensibilidad en corazón trasplantado y por otro, modera la hipertrofia cardiaca propia del corazón insuficiente.
2. La expresión de eNOS y NT-3 en el Vi sigue una correlación inversa con la PAP en pacientes con IC. Los niveles de eNOS en Vi son menores en pacientes con hipertensión pulmonar lo que indica que la regulación al alza de la enzima podría mejorar la hipertensión pulmonar asociada a la insuficiencia cardiaca. Existe además una correlación entre NT-3 y eNOS, lo que sugiere una vía de señalización común como posible diana terapéutica en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.
3. El óxido nítrico liberado por nNOS en el corazón insuficiente ejerce un efecto modulador de la función cardiaca evidenciado por su relación directa con el gasto cardiaco.
4. En miocardio de pacientes sometidos a trasplante cardiaco se observa mayor expresión de nNOS y NT-3 pudiendo ser un indicativo del proceso de reinervación. También existe una correlación directa entre la expresión génica de NT-3 y la de los ARs α_{1A} , β_1 y β_2 , implicados en la inervación simpática del corazón.
5. Los linfocitos circulantes reflejan los cambios en la expresión de NT-3 en corazón insuficiente, pero no los cambios de eNOS, lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulador para NT-3 común en miocardio y

- linfocitos. No se detecta nNOS en cantidades adecuadas para hacer una valoración de los cambios en su expresión génica en linfocitos.
6. En pacientes trasplantados, la relación directa encontrada entre los niveles de expresión de eNOS en miocardio y linfocitos y los días postrasplante, sugiere una recuperación de la función endotelial a medida que se restauran los valores clínicos que indican una funcionalidad cardíaca adecuada.
 7. El crecimiento de nuevos vasos a partir de anillos vasculares incubados en una matriz tridimensional es un proceso reproducible y cuantificable. La presencia de la capa adventicia, pero no de la endotelial, es imprescindible para dicho proceso.
 8. Los niveles de ARNm de nNOS y NT-3 disminuyen drásticamente cuando el vaso se disecciona, independientemente de que se produzca o no el proceso angiogénico. Por el contrario, la expresión de eNOS se mantiene, salvo cuando los nuevos vasos formados se separan del anillo original.
 9. El NO endógeno o exógeno inhibe el crecimiento de nuevos vasos por un mecanismo independiente de GCs, que no se observa en ratas hipertensas o ratas Zucker.

Resumen

RESUMEN

El óxido nítrico es un mediador implicado en el desarrollo de la patología cardiovascular, la principal causa de mortalidad en nuestro entorno, pero su papel no ha sido completamente esclarecido. Recientemente, se ha establecido el mecanismo a través del cual actúa la NT-3 liberada en el endotelio vascular y se ha demostrado su capacidad para, a través de la activación de su receptor TrkC, fosforilar la eNOS y, como consecuencia, aumentar la síntesis de NO en las células que expresan este receptor junto con eNOS. A su vez, también se ha demostrado recientemente la implicación de la otra isoforma constitutiva de la NOS, la nNOS, en la homeostasis cardiovascular. Por todo ello, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el papel de NT-3, eNOS y nNOS en la patología cardiovascular humana, focalizando la atención en el proceso angiogénico por ser un factor clave tanto en el desarrollo como en la recuperación de los trastornos cardiovasculares. Para ello se ha trabajado con muestras humanas de corazón y linfocitos circulantes procedentes de sujetos sanos y de pacientes con distintas patologías cardiovasculares como hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca o pulmonar, trasplante cardiaco o antecedentes de muerte súbita por taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica. Además, se ha analizado en animal de experimentación el papel de eNOS, nNOS y NT-3 en el proceso angiogénico, seleccionando para ello un modelo “*ex vivo*” que permite el crecimiento de nuevos vasos a partir de un anillo de aorta de rata incubado en una matriz tridimensional.

Por lo que respecta a la patología cardiovascular humana, se ha observado que existe variabilidad de expresión de eNOS y nNOS en pacientes con IC que no depende del tratamiento farmacológico ni de las distintas etiologías de la enfermedad, lo cual justifica las discrepancias de resultados descritos en la

literatura. Además, la distinta localización celular y subcelular de ambas isoformas puede ser el motivo por el cuál los niveles de expresión son tan distintos a nivel de miocardio. En cambio, los niveles de NT-3 se encuentran aumentados en IC con respecto a voluntarios sanos y ese aumento coincide con los pacientes con miocardiopatía dilatada.

Tras realizar diversas correlaciones entre los niveles de ARNm de los 3 genes y las variables clínicas propias de cada patología, los resultados obtenidos muestran que el NO procedente de la isoforma endotelial (eNOS) correlaciona de forma inversa con el diámetro del Vi en pacientes insuficientes pero de manera directa en los trasplantados, lo cual sugiere una doble actividad del NO, por un lado como cardioprotector evitando una excesiva hipertrofia cardiaca en corazones insuficientes y, por otro lado, como regulador de la distensibilidad en corazones trasplantados. Además, eNOS también correlaciona inversamente con la PAP de pacientes insuficientes pero, a su vez, su expresión es superior en pacientes con niveles normales de PAP con respecto a pacientes con HP, de manera que, la regulación selectiva al alza de la enzima podría ser un objetivo prometedor en el tratamiento de la hipertensión pulmonar asociada a la insuficiencia cardiaca. Por lo que respecta a nNOS, existe correlación directa entre nNOS y el gasto cardiaco, como parámetro que determina la funcionalidad del corazón, lo que sustenta la posibilidad de la relación del NO con la inervación nitrérgica implicada en la contractilidad cardiaca. Diversos estudios han determinado la regulación común existente entre NT-3 y eNOS a nivel vascular. Nuestros resultados corroboran dicha observación en miocardio, ya que existe correlación directa entre ambos genes independientemente de la cavidad estudiada. Además, la correlación inversa existente entre los niveles de ARNm de NT-3 y la PAP diastólica corrobora de nuevo el mecanismo común de regulación

de eNOS y la neurotrofina y sugiere, nuevamente, importantes dianas terapéuticas.

Teniendo en cuenta que tanto nNOS como NT-3 son dos moléculas implicadas en el desarrollo y función neuronal, nos propusimos determinar su posible implicación en la inervación cardiaca del miocardio. Efectivamente, existe un aumento de expresión de ambos genes en los corazones trasplantados que están siendo sometidos a un proceso de reinervación y, además, en el caso de NT-3, se corrobora su implicación en la inervación simpática del corazón por la correlación directa encontrada con los adrenoceptores.

Además del miocardio, también trabajamos con linfocitos circulantes, utilizados como biomarcadores del estado del músculo cardiaco. Los resultados obtenidos demuestran que este no es un escenario general para todos los genes. En el caso de NT-3 sí que existe similitud en su expresión en linfocitos y miocardio en corazones insuficientes, pero no ocurre lo mismo con eNOS.

Por otra parte, se trató de ver si alguno de los 3 genes correlacionaba con los días transcurridos desde el TC. Los resultados muestran como solo en el caso de eNOS existe correlación directa tanto en linfocitos como en miocardio, lo cual puede ser indicativo de que el NO parece que dirige hacia una normalización en la función endotelial guiada por la enzima mientras se restauran los valores clínicos que indican una funcionalidad cardiaca recuperada.

La angiogénesis es un proceso implicado en diversas patologías cardiovasculares. Por ello, se ha tratado de poner a punto la técnica en nuestro modelo y, además, se ha analizado los cambios de expresión de eNOS, nNOS y NT-3 durante el proceso. Además, puesto que el NO juega un papel trascendental a nivel cardiovascular y su importancia en el endotelio vascular ha sido

profundamente estudiada como mediador de la angiogénesis, se ha determinado su función en nuestras condiciones experimentales. Por todo ello, se ha trabajado con aorta de rata en medio de cultivo adicionado con factores de crecimiento como condiciones que reproducen lo que ocurre fisiológicamente. Además, se demuestra como tanto la capa endotelial como la capa adventicia de aorta están implicadas en el crecimiento de nuevos vasos, sin embargo, la pérdida de la capa adventicia supone la destrucción de las células precursoras endoteliales, lo cual da lugar a la supresión del inicio del proceso.

Por otro lado, la pérdida de expresión de nNOS y NT-3 en distintas etapas del proceso angiogénico y en anillos quiescentes, hace pensar que no son las condiciones del cultivo lo que dan lugar a la pérdida, si no la eliminación de las terminaciones nerviosas que irrigan el vaso. En el caso de eNOS, su expresión no se pierde ni durante el proceso, ni en anillos quiescentes. Sin embargo, la separación del anillo y los nuevos vasos formados, da lugar a la pérdida de expresión de la isoforma endotelial en estos últimos, lo cual parece indicar que el NO procedente de eNOS es indispensable para la comunicación entre células.

En el cultivo angiogénico, el aumento de crecimiento de nuevos vasos utilizando L-NAME y la disminución de éste con elevadas dosis de NO demuestran la implicación del mediador como protector del crecimiento anómalo de nuevos vasos. Además, parece que las rutas implicadas son distintas. Sin embargo, el crecimiento de nuevos vasos alterado que tienen los animales con hipertensión arterial o síndrome metabólico, no es revertido utilizando L-NAME o SMTC, lo cual demuestra, nuevamente, que el NO está implicado activamente en el proceso.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aguero J, Almenar L, D'Ocon P, Oliver E, Monto F, Rueda J, Vicente D, Martinez-Dolz L, Salvador A (2009) Myocardial and peripheral lymphocytic transcriptomic dissociation of beta-adrenoceptors and G protein-coupled receptor kinases in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 28:1166-1171.
- Aguero J, Almenar L, Monto F, Oliver E, Sanchez-Lazaro I, Vicente D, Martinez-Dolz L, D'Ocon P, Rueda J, Salvador A (2012) Myocardial G protein receptor-coupled kinase expression correlates with functional parameters and clinical severity in advanced heart failure. *J Card Fail*. 18:53-61.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357:593-615.
- Ali BH (2001) Dimethyl sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. *Vet Hum Toxicol*. 43:228-231.
- Amezcuca JL, Palmer RM, de Souza BM, Moncada S (1989) Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol*. 97:1119-1124.
- Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB (1995) The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 182:2097-2102.
- Anderson RG (1993) Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10909-10913.
- Ashley E, Sears C, Bryant S, Watkins H, Casadei B (2002) Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and β -adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation*. 105:3011-3016.
- Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, Stewart DJ (1998) Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Research*. 82:1007-1015.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM (2002) Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 416:337-339.

- Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V, Marty I, Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation*. 110:2368-2375.
- Bengel FM, Ueberfuhr P, Schiepel N, Nekolla SG, Reichart B, Schwaiger M (2001) Myocardial efficiency and sympathetic reinnervation after orthotopic heart transplantation: a noninvasive study with positron emission tomography. *Circulation*. 103:1881-1886.
- Bengel FM, Ueberfuhr P, Ziegler SI, Nekolla S, Reichart B, Schwaiger M (1999) Serial assessment of sympathetic reinnervation after orthotopic heart transplantation. A longitudinal study using PET and C-11 hydroxyephedrine. *Circulation*. 99:1866-1871.
- Bir SC, Xiong Y, Kevil CG, Luo J (2012) Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc Res*. 95:7-18.
- Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K (1999) Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res*. 43:675-684.
- Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD (2000) A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci*. 20:8012-8020.
- Boukhaddaoui H, Sieso V, Scamps F, Valmier J (2001) An activity-dependent neurotrophin-3 autocrine loop regulates the phenotype of developing hippocampal pyramidal neurons before target contact. *J Neurosci*. 21:8789-8797.
- Boyum A (1964) Separation of White Blood Cells. *Nature*. 204:793-794.
- Brack KE, Coote JH, Ng GA (2011) Vagus nerve stimulation protects against ventricular fibrillation independent of muscarinic receptor activation. *Cardiovasc Res*. 91:437-446.
- Bras-Silva C, Monteiro-Sousa D, Duarte AJ, Guerra M, Fontes-Sousa AP, Moura C, Areias JC, Leite Moreira AF (2008) Nitric oxide and prostaglandins - important players in endothelin-1 induced myocardial distensibility. *Physiol Res*. 57:165-174.
- Bristow MR (1990) The surgically denervated, transplanted human heart. *Circulation*. 82:658-660.
- Brodde OE, Bruck H, Leineweber K (2006) Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci*. 100:323-337.

- Brodde OE, Kretsch R, Ikezono K, Zerkowski HR, Reidemeister JC (1986) Human beta-adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte beta-adrenoceptor density. *Science*. 231:1584-1585.
- Brodde OE, Michel MC, Gordon EP, Sandoval A, Gilbert EM, Bristow MR (1989) Beta-adrenoceptor regulation in the human heart: can it be monitored in circulating lymphocytes? *Eur Heart J*. 10 Suppl B: 2-10.
- Bronzwaer JG, Zeitz C, Visser CA, Paulus WJ (2002) Endomyocardial nitric oxide synthase and the hemodynamic phenotypes of human dilated cardiomyopathy and of athlete's heart. *Cardiovasc Res*. 55:270-278; discussion 225-228.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O (2001) Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem*. 276:32663-32669.
- Bruno MA, Cuello AC (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6735-6740.
- Buendia Fuentes F, Martinez-Dolz L, Almenar Bonet L, Sanchez-Lazaro I, Navarro Manchon J, Sanchez-Gomez JM, Raso Raso R, Agüero-Ramon-Llin J, Sancho-Tello de Carranza MJ, Salvador Sanz A (2010) Normalization of the heart rate response to exercise 6 months after cardiac transplantation. *Transplant Proc*. 42:3186-3188.
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG (1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 345:346-347.
- Caporali A, Emanuelli C (2009) Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol Rev*. 89: 279-308.
- Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 9:653-660.
- Cartwright JE, Johnstone AP, Whitley GS (2000) Endogenously produced nitric oxide inhibits endothelial cell growth as demonstrated using novel antisense cell lines. *Br J Pharmacol*. 131:131-137.
- Casadei B (2006) The emerging role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of myocardial function. *Exp Physiol*. 91:943-955.

- Castro-Chaves P, Fontes-Carvalho R, Pintalhão M, Pimentel-Nunes P, Leite-Moreira AF (2009) Angiotensin II-induced increase in myocardial distensibility and its modulation by the endocardial endothelium in the rabbit heart. *Exp Physiol.* 94:665-674.
- Chao MV, Bothwell M (2002) Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron.* 33:9-12.
- Chen AF, Ren J y Miao CY (2002) Nitric oxide synthase gene therapy for cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol.* 89:327-336.
- Chen CH, Cartwright J, Jr., Li Z, Lou S, Nguyen HH, Gotto AM Jr., Henry PD (1997) Inhibitory effects of hypercholesterolemia and ox-LDL on angiogenesis-like endothelial growth in rabbit aortic explants. Essential role of basic fibroblast growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:1303-1312.
- Chen X, Niroomand F, Liu Z, Zankl A, Katus HA, Jahn L, Tiefenbacher CP (2006) Expression of nitric oxide related enzymes in coronary heart disease. *Basic Res Cardiol.* 101:346-353.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C (1996) Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim.* 30:293-316.
- Cohn HI, Xi Y, Pesant S, Harris DM, Hyslop T, Falkner B, Eckhart AD (2009) G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans. *Hypertension.* 54:71-76.
- Cooke JP (2003) NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl.* 4:53-60.
- Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet.* 363:1365-1367.
- Dautzenberg M, Keilhoff G, Just A (2011) Modulation of the myogenic response in renal blood flow autoregulation by NO depends on endothelial nitric oxide synthase (eNOS), but not neuronal or inducible NOS. *J Physiol.* 589:4731-4744.
- Dawson D, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B (2005) nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation.* 112:3729-3737.
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (1994) Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 738:76-85.

- Delgado AC, Ferrón SC, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalva A, Trujillo CM, D'Ocon P, Fariñas I (2013) Vascular neurotrophin-3 supports long-term maintenance of neural stem cells by NO induction. *Nature*. (En revisión).
- Diglio CA, Grammas P, Giacomelli F, Wiener J (1989) Angiogenesis in rat aorta ring explant cultures. *Lab Invest*. 60:523-531.
- Dobutovic B, Smiljanic K, Soskic S, Dürgen HD e Isenovic ER (2011) Nitric oxide and its role in cardiovascular diseases. *The open nitric oxide journal* 3:65-71.
- Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL (1996) Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet*. 14:210-213.
- Drexler H, Kastner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G (1998) Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*. 32:955-963.
- Dzimiri N, Basco C, Moorji A, Afrane B, Al Halees Z (2002) Characterization of lymphocyte beta 2-adrenoceptor signalling in patients with left ventricular volume overload disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29:181-188.
- Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J (1996) Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA tissue-specific regulation and induction by cytokines. *J Biol Chem*. 271:27184-27187.
- Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, Lohse MJ (1996) Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 27:146-154.
- Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell*. 102:499-509.
- Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R (2000) Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*. 87:241-247.
- Fernandez B, Duran AC, Fernandez-Gallego T, Fernandez MC, Such M, Arque JM, Sans-Coma V (2009) Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *J Am Coll Cardiol*. 54:2312-2318.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 271:22810-22814.

- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T (1998) The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem.* 273:3125-3128.
- Flacco N, Pares J, Serna E, Segura V, Vicente D, Perez-Aso M, Noguera MA, Ivorra MD, McGrath JC, D'Ocon P (2013a) $\alpha 1D$ -Adrenoceptors are responsible for the high sensitivity and the slow time-course of noradrenaline-mediated contraction in conductance arteries. *Pharmacology Research & Perspectives.* doi: 10.1002/prp2.1.
- Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller JF, Jimenez-Altayo F, Noguera MA, D'Ocon P, Vila E, Ivorra MD (2013b) Different beta-adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol.* 169:413-425.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33:829-837, 837a-837d.
- Fraisl P (2013) Crosstalk between oxygen- and nitric oxide-dependent signaling pathways in angiogenesis. *Exp Cell Res.* 319:1331-1339.
- Freedman SB, Isner JM (2001) Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 33:379-393.
- Fukuchi M, Hussain SN, Giaid A (1998) Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and beta-adrenergic receptor therapy. *Circulation.* 98:132-139.
- Furchgott RF (1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vasodilatation 4. Vanhoutte PM (ed): 401-414. Raven Press, New York.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-376.
- Galvin KA, Oorschot DE (2003) Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study. *Neuroscience.* 118:1023-1032.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 392:821-824.

- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 272:25437-25440.
- Garcia-Sevilla JA, Meana JJ (2008) Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. *Farmacología humana* (Flórez J, Armijo JA y Mediavilla A, eds) p.295-320. Elsevier Masson.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336:385-388.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 48:184-188.
- Ghafourifar P, Richter C (1999) Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol Chem.* 380:1025-1028.
- Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ (2012) Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 14:198-205.
- Gisbert R, Madrero Y, Sabino V, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P (2003) Functional characterization of alpha 1-adrenoceptor subtypes in vascular tissues using different experimental approaches: a comparative study. *Br J Pharmacol.* 138:359-368.
- Gonzalez MC, Arribas SM, Molero F, Fernandez-Alfonso MS (2001) Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H2876-2881.
- Govoni S, Pascale A, Amadio M, Calvillo L, D'Elia E, Cereda C, Fantucci P, Ceroni M, Vanoli E (2011) NGF and heart: Is there a role in heart disease? *Pharmacol Res.* 63:266-277.
- Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD (1997) G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest.* 99:2087-2093.
- Gros R, Chorazyczewski J, Meek MD, Benovic JL, Ferguson SS, Feldman RD (2000) G-Proteincoupled receptor kinase activity in hypertension : increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension.* 35:38-42.

- Guglin M, Khan H (2010) Pulmonary hypertension in heart failure. *J Card Fail.* 16:461-474.
- Guimaraes S and Moura D (2001) Vascular Adrenoceptors: an Update. *Pharmacol Rev.* 53:319-356.
- Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7809-7813.
- Haddad F, Kudelko K, Mercier O, Vrtovec B, Zamanian RT, de Jesus Perez V (2011) Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies. *Prog Cardiovasc Dis.* 54:154-167.
- Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S (2003) Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science.* 302:1975-1978.
- Hare JM, Colucci WS (1995) Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Dis.* 38:155-166.
- Hare JM, Lofthouse RA, Juang GJ, Colman L, Ricker KM, Kim B, Senzaki H, Cao S, Tunin RS, Kass DA (2000) Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 86:1085-1092.
- Hasan W (2013) Autonomic cardiac innervation. Development and adult plasticity. *Organogenesis.* 9:176-193.
- Hata JA, Williams ML, Schroder JN, Lima B, Keys JR, Blaxall BC, Petrofski JA, Jakoi A, Milano CA, Koch WJ (2006) Lymphocyte levels of GRK2 (betaARK1) mirror changes in the LVAD-supported failing human heart: lower GRK2 associated with improved beta-adrenergic signaling after mechanical unloading. *J Card Fail.* 12:360-368.
- Heerssen HM, Segal RA (2002) Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci.* 25:160-165.
- Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W (2006) Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 10:45-55.
- Hernández B, Montó F, Vicente D, Oliver E, Segura V, Baretino D, Mirabet V, Montesinos MC, D'Ocon P (2010) Angiogenic ability of blood vessels after cryopreservation. *Eur J Clin Pharmacol.* 66:S1-S135.
- Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JG, Shah AM, Paulus WJ (1999) Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 99:3009-3016.

- Hiltunen JO, Arumae U, Moshnyakov M, Saarma M (1996) Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart. *Circ Res.* 79:930-939.
- Hoehn T, Stiller B, McPhaden AR, Wadsworth RM (2009) Nitric oxide synthases in infants and children with pulmonary hypertension and congenital heart disease. *Respir Res.* 10:110.
- Howe CL, Mobley WC (2005) Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 15:40-48.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72:609-642.
- Hudlicka O (1998) Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation.* 5:7-23.
- Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, Koch WJ (2005) Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur Heart J.* 26:1752-1758.
- Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30:535-560.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 34:879-886.
- Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD (2005) Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:13141-13146.
- Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP (2000) Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 102:1414-1419.
- Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD (2004) Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res.* 94:1256-1262.
- Ji GJ, Fleischmann BK, Bloch W, Feelisch M, Andressen C, Addicks K, Hescheler J (1999) Regulation of the L-type Ca²⁺ channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J.* 13:313-324.
- Jugdutt BI (2002) Nitric oxide in heart failure: friend or foe. *Heart Fail Rev.* 7:385-389.

- Kalinowska-Lyszczarz A, Pawlak MA, Michalak S, Paprzycki W, Losy J (2011) Immune cell NT-3 expression is associated with brain atrophy in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 240-241:109-113.
- Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL (2004) Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:12277-12281.
- Kaplan NM (2005) Hypertension in the population at large, in *Kaplan's Clinical Hypertension* pp 1-24, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kawaguchi-Manabe H, Ieda M, Kimura K, Manabe T, Miyatake S, Kanazawa H, Kawakami T, Ogawa S, Suematsu M, Fukuda K (2007) A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically downregulated in cardiac hypertrophy. *Life Sci.* 81:385-392.
- Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM (2003) Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res.* 92:1322-1329.
- Kiefer FN, Misteli H, Kalak N, Tschudin K, Fingerle J, Van der Kooij M, Stumm M, Sumanovski LT, Sieber CC, Battegay EJ (2002) Inhibition of NO biosynthesis, but not elevated blood pressure, reduces angiogenesis in rat models of secondary hypertension. *Blood Press.* 11:116-124.
- Kreusser MM, Buss SJ, Krebs J, Kinscherf R, Metz J, Katus HA, Haass M, Backs J (2008) Differential expression of cardiac neurotrophic factors and sympathetic nerve ending abnormalities within the failing heart. *J Mol Cell Cardiol.* 44:380-387.
- Krum H, Driscoll A (2013) Management of heart failure. *Med J Aust.* 199:334-339.
- Kruzliak P, Kovacova G, Pechanova O (2013) Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of angiogenesis-inhibitor-induced hypertension. *Angiogenesis.* 16:289-295.
- Lamping KG, Nuno DW, Shesely EG, Maeda N, Faraci FM (2000) Vasodilator mechanisms in the coronary circulation of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279:1906-1912.
- Larsen FJ, Schiffer TA, Weitzberg E, Lundberg JO (2012) Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radic Biol Med.* 53:1919-1928.
- le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA (1998) Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens.* 16:1563-1572.

- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 294:1945-1948.
- Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ (2000) Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 101:2345-2348.
- Lepic E, Burger D, Lu X, Song W, Feng Q (2006) Lack of endothelial nitric oxide synthase decreases cardiomyocyte proliferation and delays cardiac maturation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291:C1240-1246.
- Lindman BR, Chakinala MM (2010) Modulating the nitric oxide - cyclic GMP pathway in the pressure-overloaded left ventricle and group II pulmonary hypertension. *Int J Clin Pract Suppl*. 15-22.
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjo BK, Persson H (1992) Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:648-652.
- Liu N, Ruan Y, Priori SG (2008) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis*. 51:23-30.
- Liu VW, Huang PL (2008) Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res*. 77:19-29.
- Liu Y, Feng Q (2012) NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation*. 84:54-61.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ. Res*. 93:896-906.
- Loyer X, Damy T, Chvojikova Z, Robidel E, Marotte F, Oliviero P, Heymes C, Samuel JL (2007) 17beta-estradiol regulates constitutive nitric oxide synthase expression differentially in the myocardium in response to pressure overload. *Endocrinology*. 148:4579-4584.
- Macdonald P, Schyvens C, Winlaw D (1996) The role of nitric oxide in heart failure. Potential for pharmacological intervention. *Drugs Aging*. 8:452-458.
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V y cols., (2007) 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 25:1105-1187.

- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazzieri R, Mignatti P, Pepper MS (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 270:9709-9716.
- Manoury B, Montiel V, Balligand JL (2012) Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. *Cardiovasc Res.* 94:304-315.
- Marrugat J, Elosua R, Gil M (1999) [Epidemiology of sudden cardiac death in Spain]. *Rev Esp Cardiol.* 52:717-725.
- Marti CN, Gheorghide M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J (2012) Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 60:1455-1469.
- Martinez-Quintana E, Rodriguez Gonzalez F, Agredo Munoz J, Garcia Mendieta JS, Brito Perez JM, Llorens Leon R, Nieto Lago V (2008) [Chronic pulmonary insufficiency after tetralogy of Fallot and pulmonary stenosis intervention. Pulmonary valve replacement with mechanical prosthesis]. *An Pediatr (Barc).* 69:215-220.
- Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tunon J, Munoz-Garcia B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Vega de Ceniga M, Egido J (2009) Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp Cardiol.* 62:677-688.
- Massion PB, Balligand JL (2003) Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol.* 546:63-75.
- Mateo J, Garcia-Lecea M, Cadenas S, Hernández C, Moncada S (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem J.* 376:537-544.
- Meuchel LW, Thompson MA, Cassivi SD, Pabelick CM, Prakash YS (2011) Neurotrophins induce nitric oxide generation in human pulmonary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 91:668-676.
- Michel MC, Beckeringh JJ, Ikezono K, Kretsch R, Brodde OE (1986) Lymphocyte beta 2-adrenoceptors mirror precisely beta 2-adrenoceptor, but poorly beta 1-adrenoceptor changes in the human heart. *J Hypertens. Suppl* 4:S215-S218.
- Michel T (1999) Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res.* 32:1361-1366.

- Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem.* 277:42344-42351.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142.
- Monto F, Oliver E, Vicente D, Rueda J, Aguero J, Almenar L, Ivorra MD, Baretino D, D'Ocon P (2012) Different expression of adrenoceptors and GRKs in the human myocardium depends on heart failure etiology and correlates to clinical variables. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 303:H368-376.
- Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK (1995) Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol.* 25:674-678.
- Morais C, Ebrahim Q, Anand-Apte B, Parat MO (2012) Altered angiogenesis in caveolin-1 gene-deficient mice is restored by ablation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Pathol.* 180:1702-1714.
- Mortara A (2001) [The neurovegetative system in heart failure and heart transplantation]. *Ital Heart J Suppl.* 2:871-887.
- Mount PF, Fraser SA, Watanabe Y, Lane N, Katsis F, Chen ZP, Kemp BE, Power DA (2006) Phosphorylation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in the kidney with high and low salt diets. *Nephron Physiol.* 102:p36-50.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 276:12660-12666.
- Moyssakis IE, Rallidis LS, Guida GF, Nihoyannopoulos PI (1997) Incidence and evolution of carcinoid syndrome in the heart. *J Heart Valve Dis.* 6:625-630.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 101:2567-2578.
- Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM (1999) Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1156-1161.

- Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, Han JA, Ha KS, Kwon YG, Kim YM (2005) Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med.* 37:588-600.
- Narisawa-Saito M, Nawa H (1996) Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats. *J Neurochem.* 67:1124-1131.
- Naseem KM (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 26:33-65.
- Nava E, Noll G, Luscher TF (1995) Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation.* 91:2310-2313.
- Nicosia RF (2009) The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *J Cell Mol Med.* 13:4113-4136.
- Nicosia RF, Ottinetti A (1990) Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest.* 63:115-122.
- Nicosia RF, Zorzi P, Ligresti G, Morishita A, Aplin AC (2011) Paracrine regulation of angiogenesis by different cell types in the aorta ring model. *Int J Dev Biol.* 55:447-453.
- Nunez C, Victor VM, Tur R, Alvarez-Barrientos A, Moncada S, Esplugues JV, D'Ocon P (2005) Discrepancies between nitroglycerin and NO-releasing drugs on mitochondrial oxygen consumption, vasoactivity, and the release of NO. *Circ Res.* 97:1063-1069.
- Oliver E, Rovira E, Monto F, Valldecabres C, Julve R, Muedra V, Ruiz N, Baretino D, D'Ocon P (2010) beta-Adrenoceptor and GRK3 expression in human lymphocytes is related to blood pressure and urinary albumin excretion. *J Hypertens.* 28:1281-1289.
- Oriowo B, Thirunavukkarasu M, Selvaraju V, Adluri RS, Zhan L, Takeda K, Fong GH, Sanchez JA, Maulik N (2013) Targeted Gene deletion of Prolyl Hydroxylase Domain Protein 3 Triggers Angiogenesis And Preserves Cardiac Function by stabilizing Hypoxia inducible Factor 1 Alpha Following Myocardial Infarction. *Curr Pharm Des.*
- Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Atsuzawa K, Takayasu M (2013) Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser(1412) in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Neurochem Int.* 63:269-274.

- Oyama N, Urasawa K, Kaneta S, Sakai H, Saito T, Takagi C, Yoshida I, Kitabatake A, Tsutsui H (2005) Chronic beta-adrenergic receptor stimulation enhances the expression of G-Protein coupled receptor kinases, GRK2 and GRK5, in both the heart and peripheral lymphocytes. *Circ J*. 69:987-990.
- Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabo C (2005) Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci*. 26:302-310.
- Palko ME, Coppola V, Tessarollo L (1999) Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J Neurosci*. 19:775-782.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327:524-526.
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 43:509-520.
- Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M (2001) The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J*. 15:1487-1489.
- Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM (1995) Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. *Circulation*. 92:2119-2126.
- Pechanova O, Simko F (2007) The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res* 56 Suppl 2:S7-S16.
- Pelikka PA, Tajik AJ, Khandheria BK, Seward JB, Callahan JA, Pitot HC, Kvols LK (1993) Carcinoid heart disease. Clinical and echocardiographic spectrum in 74 patients. *Circulation*. 87:1188-1196.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 181:902-906.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 189:824-831.
- Perrault LP, Malo O, Bidouard JP, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM (2003) Inhibiting the NO pathway with intracoronary L-NAME infusion increases endothelial dysfunction and intimal hyperplasia after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 22:439-451.

- Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL (2003) Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 57:456-467.
- Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, Athanassiadou A, Flordellis C, Maragoudakis ME (2000) Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol.* 129:207-213.
- Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Haralabopoulos G, Andriopoulou P, Peristeris P, Maragoudakis ME (1994) Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator. *Br J Pharmacol.* 111:894-902.
- Powell JA, Mohamed SN, Kerr JS, Mousa SA (2000) Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J Cell Biochem.* 80:104-114.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimone L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A (2002) Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 106:69-74.
- Pyriochou A, Beis D, Koika V, Potytarchou C, Papadimitriou E, Zhou Z, Papapetropoulos A (2006) Soluble guanylyl cyclase activation promotes angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 319:663-671.
- Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S (1989a) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol.* 96:418-424.
- Rees DD, Palmer RM, Moncada S (1989b) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:3375-3378.
- Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:73-91.
- Sakkoula E, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME (1997) Involvement of nitric oxide in the inhibition of angiogenesis by interleukin-2. *Br J Pharmacol.* 122:793-795.
- Saluja R, Jyoti A, Chatterjee M, Habib S, Verma A, Mitra K, Barthwal MK, Bajpai VK, Dikshit M (2011) Molecular and biochemical characterization of nitric oxide synthase isoforms and their intracellular distribution in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta.* 1813:1700-1707.

- Saraiva RM, Minhas KM, Raju SV, Barouch LA, Pitz E, Schuleri KH, Vandegaer K, Li D, Hare JM (2005) Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. *Circulation*. 112:3415-3422.
- Sase K, Michel T (1997) Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med*. 7:28-37.
- Saygili E, Schauerte P, Kuppers F, Heck L, Weis J, Weber C, Schwinger RH, Hoffmann R, Schroder JW, Marx N, Rana OR (2010) Electrical stimulation of sympathetic neurons induces autocrine/paracrine effects of NGF mediated by TrkA. *J Mol Cell Cardiol*. 49:79-87.
- Scarlsbrick IA, Jones EG, Isackson PJ (1993) Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. *J Neurosci*. 13:875-893.
- Schwaiger M, Hutchins GD, Kalff V, Rosenspire K, Haka MS, Mallette S, Deeb GM, Abrams GD, Wieland D (1991) Evidence for regional catecholamine uptake and storage sites in the transplanted human heart by positron emission tomography. *J Clin Invest*. 87:1681-1690.
- Sears CE, Ashley EA, Casadei B (2004) Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 359:1021-1044.
- Seddon M, Shah AM, Casadei B (2007) Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*. 75:315-326.
- Shao Z, Wang Z, Shrestha K, Thakur A, Borowski AG, Sweet W, Thomas JD, Moravec CS, Hazen SL, Tang WH (2012) Pulmonary hypertension associated with advanced systolic heart failure: dysregulated arginine metabolism and importance of compensatory dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1. *J Am Coll Cardiol*. 59:1150-1158.
- Shimokawa H, Tsutsui M (2010) Nitric oxide synthases in the pathogenesis of cardiovascular disease: lessons from genetically modified mice. *Pflugers Arch*. 459:959-967.
- Stark RP, McGinn AL, Wilson RF (1991) Chest pain in cardiac-transplant recipients. Evidence of sensory reinnervation after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 324:1791-1794.
- Stassen FR, Maas RG, Schiffers PM, Janssen GM, De Mey JG (1998) A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1A adrenoceptors in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 284: 399-405.

- Stein B, Eschenhagen T, Rudiger J, Scholz H, Forstermann U, Gath I (1998) Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 32:1179-1186.
- Story GM, Dicarlo SE, Rodenbaugh DW, Dluzen DE, Kucera J, Maron MB, Walro JM (2000) Inactivation of one copy of the mouse neurotrophin-3 gene induces cardiac sympathetic deficits. *Physiol Genomics.* 2:129-136.
- Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N, Shimokawa H (2008) Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med.* 205:2053-2063.
- Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolucci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA (2005) Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest.* 115:1221-1231.
- Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Delpon E (2010) Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 87:593-600.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpon E (2006) Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl.* 6:3A-20A.
- Thorsby E, Bratlie A (1970) A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions in *Histocompatibility Testing* (P.I. Terasaki ed) pp 665-666.
- Tilki D, Hohn HP, Ergun B, Rafii S, Ergun S (2009) Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol Med.* 15:501-509.
- Tousoulis D, Papageorgiou N, Briasoulis A, Androulakis E, Charakida M, Tsiamis E, Stefanadis C (2012) Conflicting effects of nitric oxide and oxidative stress in chronic heart failure: potential therapeutic strategies. *Heart Fail Rev.* 17:65-79.
- Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N (2010) Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacol Ther.* 128:499-508.
- Umar S, van der Laarse A (2010) Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem.* 333:191-201.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 153:557-562.

- van der Werf C, Wilde AA (2013) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: from bench to bedside. *Heart*. 99:497-504.
- Vandsburger MH, French BA, Helm PA, Roy RJ, Kramer CM, Young AA, Epstein FH (2007) Multi-parameter in vivo cardiac magnetic resonance imaging demonstrates normal perfusion reserve despite severely attenuated beta-adrenergic functional response in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Eur Heart J*. 28:2792-2798.
- Victor VM, Nunez C, D'Ocon P, Taylor CT, Esplugues JV, Moncada S (2009) Regulation of oxygen distribution in tissues by endothelial nitric oxide. *Circ Res*. 104:1178-1183.
- Vigers AJ, Baquet ZC, Jones KR (2000) Expression of neurotrophin-3 in the mouse forebrain: insights from a targeted LacZ reporter. *J Comp Neurol*. 416:398-415.
- Waller BF, Howard J, Fess S (1995) Pathology of pulmonic valve stenosis and pure regurgitation. *Clin Cardiol*. 18:45-50.
- Wang H, Olszewski B, Rosebury W, Wang D, Robertson A, Keiser JA (2004) Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 315:363-368.
- Wharton J, Polak JM, Gordon L, Banner NR, Springall DR, Rose M, Khagani A, Wallwork J, Yacoub MH (1990) Immunohistochemical demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation. *Circ Res*. 66:900-912.
- Williams B, Poulter NR, Brown MJ, Davis M, McInnes GT, Potter JF, Sever PS, McG TS (2004) Guidelines for management of hypertension: report of the fourth working party of the British Hypertension Society, 2004-BHS IV. *J Hum Hypertens* 18:139-185.
- Williams JL, Cartland D, Hussain A, Egginton S (2006) A differential role for nitric oxide in two forms of physiological angiogenesis in mouse. *J Physiol*. 570:445-454.
- Wilson RF, Christensen BV, Olivari MT, Simon A, White CW, Laxson DD (1991) Evidence for structural sympathetic reinnervation after orthotopic cardiac transplantation in humans. *Circulation*. 83:1210-1220.
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279:234-237.
- Yoshida K (2009) Pursuing enigmas on ischemic heart disease and sudden cardiac death. *Leg Med (Tokyo)*. 11:51-58.
- Yue ZJ, Yu ZB (2011) [Cardioprotection by the inhibitory effect of nitric oxide]. *Sheng Li Xue Bao*. 63:191-197.

Bibliografía

- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*. 133:1543-1551.
- Zhang SH, Rush RA (2001) Neurotrophin 3 is increased in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 19:2251-2256.
- Zhang WR, Kitagawa H, Hayashi T, Sasaki C, Sakai K, Warita H, Shiro Y, Suenaga H, Ohmae H, Tsuji S, Itoh T, Nishimura O, Nagasaki H, Abe K (1999) Topical application of neurotrophin-3 attenuates ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 842:211-214.
- Zhang YH, Casadei B (2012) Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 52:341-350.
- Zhao X, Lu X, Feng Q (2002) Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283:H2371-2378.
- Zhou XF, Rush RA (1996) Functional roles of neurotrophin 3 in the developing and mature sympathetic nervous system. *Mol Neurobiol*. 13:185-197.
- Ziche M, Morbidelli L (2000) Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*. 50:139-148.
- Zuckerbraun BS, George P, Gladwin MT (2011) Nitrite in pulmonary arterial hypertension: therapeutic avenues in the setting of dysregulated arginine/nitric oxide synthase signalling. *Cardiovasc Res*. 89:542-552.