



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
&
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA LA FE

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

**ALTERACIONES EN LA PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN
DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS
MOLÉCULAS RELACIONADAS EN PACIENTES CON
INSUFICIENCIA CARDIACA. RELACIÓN CON LA
FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO**

**TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR**

**ESTEFANÍA TARAZÓN MELGUIZO
VALENCIA, 2016**

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE
Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco

“ALTERACIONES EN LA PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN
DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS
MOLÉCULAS RELACIONADAS EN PACIENTES CON
INSUFICIENCIA CARDÍACA. RELACIÓN CON LA
FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO”

Memoria para optar al grado de
Doctora en Biotecnología presentada por:
ESTEFANÍA TARAZÓN MELGUIZO

Y dirigida por:
Dr. J. Miguel Rivera Otero
Dr. Manuel Portolés Sanz
Dra. Esther Roselló Lletí

Valencia, 2016



Instituto de
Investigación
Sanitaria La Fe

HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE

Instituto de Investigación Sanitaria

Valencia

D. J. MIGUEL RIVERA OTERO, Investigador Principal del grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia,

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

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

CERTIFICAN:

Que **Dña. ESTEFANÍA TARAZÓN MELGUIZO**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, en el grupo de Disfunción Miocárdica y Trasplante Cardíaco, el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de investigación destinada a Tesis Doctoral, que se presenta bajo el título de: "ALTERACIONES EN LA PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA. RELACIÓN CON LA FUNCIÓN DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO".

Y para que así conste, expido el presente en Valencia a 11 de Marzo de 2016.

Fdo. Dr. Miguel Rivera

Fdo. Dr. Manuel Portolés

Fdo. Dra. Esther Roselló

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- “Cinética del transporte núcleo-citoplasmático de los cardiomiocitos humanos en la insuficiencia cardiaca. Análisis celular y de expresión génica”. PI10/00275, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias. IP J. Miguel Rivera Otero.
- “Transporte núcleo-citoplasma y cambios de expresión génica en la insuficiencia cardiaca. Puesta en marcha de una nueva estrategia terapéutica”. PI13/00100, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias. IP J. Miguel Rivera Otero.
- “Seguimiento de pacientes sometidos a trasplante cardiaco. Estudio de marcadores de rechazo implicados en el transporte núcleo-citoplasma”. PI14/01506, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias. IP Esther Roselló Lletí.
- “Implantación de un programa multidisciplinar de gestión de pacientes con insuficiencia cardiaca”. RD 06/0003/1001, Red de Investigación en Insuficiencia Cardiaca (REDINSCOR), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias. IP J. Miguel Rivera Otero.
- “Alteraciones moleculares y estructurales en la insuficiencia cardiaca”. RD 12/0042/0003, Red de Investigación Cardiovascular (RIC), Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias. IP J. Miguel Rivera Otero.
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Tras cinco años de aventura esta etapa llega a su fin y es el momento de dar las gracias a todas aquellas personas que han formado parte de ella.

En primer lugar, mi agradecimiento a mis directores de tesis. A Miguel, por darme la oportunidad de dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, y por su perseverante exigencia que me ha hecho crecer tanto profesional como personalmente. A Manolo, por saber transmitirme su experiencia y su forma de ver la vida. Y a Esther, por poder recurrir a ella en todo momento y saber guiarme, apoyándome en todos los aspectos.

A mis compañeras, Ana y Esther. Mil gracias, han sido un regalo, esta experiencia no habría sido lo mismo sin ellas, espero volver a cruzarme en su camino. Y a Carolina, que aunque en menos tiempo, hemos compartido muchas cosas.

A los compañeros del centro de investigación, a Amparo Hernández, Ana Latorre, Ana Romero, Guillermo Esteban, Inma Azorín, Inma Monserrat, Jaime Renau, Lorena Gómez, Pili Marín, Raquel Cortés y Roger Vilchez; gracias por la ayuda recibida, los consejos y todos los buenos momentos. Y al resto de personas que he tenido el placer de conocer en este centro y que de una forma u otra han formado parte de esta tesis.

A Matt, Frances, Mark y Yu-Fen de la Universidad de Oxford, gracias por acogerme, por su inmensa paciencia y por todo lo que me enseñaron. Una experiencia inolvidable.

A mis amigas, a las de siempre, las que nunca fallan, por interesarse por mi trabajo e intentar entender el mundo de la investigación.

Y finalmente, a Ernesto, por estar siempre a mi lado y compartir su vida conmigo.

A todos, gracias por formarme como profesional y como persona.

ABREVIATURAS

AG, aparato de Golgi

ANP, péptido natriurético atrial

BNP, péptido natriurético tipo B

CNP, péptido natriurético tipo C

CNT, control

DM, diabetes mellitus

DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo

DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo

ECG, electrocardiograma

FA, fracción de acortamiento

FE, fracción de eyección

IC, insuficiencia cardiaca

MCD, miocardiopatía dilatada

MCI, miocardiopatía isquémica

NEP, endopeptidasa neutra

NPPA, precursor del péptido natriurético atrial

NPPB, precursor del péptido natriurético tipo B

NPPC, precursor del péptido natriurético tipo C

NPR1, receptor de péptidos natriuréticos 1

NPR2, receptor de péptidos natriuréticos 2

NPR3, receptor de péptidos natriuréticos 3

PN, péptidos natriuréticos

RE, retículo endoplasmático

RNA-seq, secuenciación de ARN

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. INSUFICIENCIA CARDÍACA	2
1.1. DEFINICIÓN	2
1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	3
1.2.1. Prevalencia, incidencia y pronóstico	3
1.2.2. Etiología	5
1.2.3. Fisiopatología	9
1.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	13
1.3.1. Diagnóstico	13
1.3.2. Tratamiento	16
1.4. FACTORES DE RIESGO Y COMORBILIDADES	16
2. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	19
2.1. PAPEL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA	19
2.1.1. Diagnóstico	19
2.1.2. Pronóstico y monitorización del tratamiento	20
2.1.3. Tratamiento	21
2.2. TIPOS DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	22
2.2.1. ANP	24
2.2.2. BNP	26
2.2.3. CNP	28
2.2.4. Otros	30
2.3. RECEPTORES DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	31
2.3.1. NPR1	31
2.3.2. NPR2	32
2.3.3. NPR3	33
2.4. ENZIMAS DE PROCESADO DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	34
2.4.1. Corina	34
2.4.2. Furina	36
2.4.3. NEP	38
2.5. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	39
3. EL APARATO DEL GOLGI	43
3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	43
3.2. SECRECIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	45
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48

III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. GRUPOS CLÍNICOS	52
2. MUESTRAS BIOLÓGICAS	56
2.1. OBTENCIÓN	56
2.2. PROCESADO Y ALMACENAJE	57
3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS	58
3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	58
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS TOTALES	58
3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS	60
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	60
3.3.2. Transferencia en seco	62
3.3.3. Inmunodetección	64
3.3.4. Tinción de geles	67
3.3.5. Secado de geles	67
3.4. AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS DEL APARATO DE GOLGI	68
3.5. INMUNOCITOQUIMIA	69
3.5.1. Inclusión en resinas Epon 812	69
3.5.2. Corte y tinción de rejillas de cobre	70
3.5.3. Análisis estereológico mediante microscopía electrónica de transmisión	70
3.6. EXTRACCIÓN DE ARN	72
3.6.1. Extracción de ARN total	72
3.6.2. Tratamiento con DNasa y precipitación de ARN total	73
3.6.3. Extracción de ARN poli(A)	74
3.7. RETROTRANSCRIPCIÓN A ADNc	76
3.8. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	77
3.9. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN DE ARN	80
3.9.1. Técnica de RNA-seq	80
3.9.2. Fragmentación del transcriptoma completo de ARN	82
3.9.3. Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo	84
3.9.4. Preparación de <i>Templated Beads</i>	87
3.9.5. Secuenciación	93
3.10. DETERMINACIÓN DE CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES	96
3.11. ANÁLISIS DE DATOS	97
3.11.1. Cuantificación relativa de la expresión génica (RT-qPCR)	97
3.11.2. Análisis computacional de los resultados de RNA-seq	99

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	100
4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO _____	102
IV. RESULTADOS _____	103
1. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	104
1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES _____	104
1.2. NIVELES DE ARNm DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	108
1.3. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA _____	112
2. EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	114
2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES _____	114
2.2. NIVELES PROTEICOS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y LAS ENZIMAS CORINA Y FURINA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	115
2.2.1. Niveles proteicos de BNP _____	115
2.2.2. Niveles proteicos de ANP _____	117
2.2.3. Niveles proteicos de CNP _____	118
2.2.4. Niveles proteicos de las endoproteasas corina y furina _____	118
2.3. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PROTEICOS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y LAS ENZIMAS CORINA Y FURINA _____	120
2.4. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PROTEICOS DE LAS MOLÉCULAS ESTUDIADAS Y LA FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA _____	124
3. ALTERACIÓN DEL APARATO DE GOLGI Y EL TRANSPORTE VESICULAR DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS _____	125
3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES _____	125
3.2. NIVELES DE ARNm DE LOS COMPONENTES DE GOLGI EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	127
3.3. NIVELES DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN LAS VESÍCULAS DEL APARATO DE GOLGI EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	131
3.4. MORFOLOGÍA DE LAS VESÍCULAS DEL APARATO GOLGI EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA _____	135

3.5. RELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS VESÍCULAS DEL APARATO DE GOLGI CON LA FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA _____	137
V. DISCUSIÓN _____	139
1. PRODUCCIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y MOLÉCULAS RELACIONADAS EN EL VENTRÍCULO IZQUIERDO DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA _____	140
2. SECRECIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN EL VENTRÍCULO IZQUIERDO DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA _____	147
VI. CONCLUSIONES _____	151
VII. REFERENCIAS _____	153

I. INTRODUCCIÓN

1. INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1. DEFINICIÓN

La insuficiencia cardiaca (IC) es un síndrome clínico que puede manifestarse como consecuencia de cualquier trastorno estructural o funcional cardiaco que deteriora la capacidad del ventrículo para llenar o expulsar la sangre. En consecuencia, el corazón no puede suministrar oxígeno a una frecuencia adecuada a las necesidades metabólicas de los tejidos, a pesar de presiones normales de llenado, o solo puede hacerlo a costa de presiones de llenado elevadas (1, 2).

Desde el punto de vista clínico, de acuerdo con las guías sobre diagnóstico y tratamiento de la IC, ésta puede definirse como un síndrome en el que los pacientes presentan una serie de síntomas (falta de aire en reposo o durante el ejercicio, fatiga, cansancio, edema de tobillos...) y signos (taquicardia, taquipnea, estertores pulmonares, derrame pleural, elevación de la presión yugular venosa, edema periférico, hepatomegalia...), además de evidencias objetivas de esta anomalía (cardiomegalia, tercer sonido, soplos cardiacos, anomalías electrocardiográficas, concentraciones elevadas de péptidos natriuréticos (PN)...) (1, 3).

La manifestación más común de este síndrome es la de un estado de IC crónica con exacerbaciones agudas ocasionales (4), es decir, con aparición repentina de síntomas y signos relacionados con una función cardiaca anormal, con o sin enfermedad cardiaca previa (5).

Además, debemos diferenciar entre IC sistólica y diastólica. La IC sistólica se produce por una alteración en la capacidad de contracción del ventrículo

izquierdo, observándose una reducción en la fracción de eyección (FE <40%) mientras que en la IC diastólica existe una alteración en la relajación y una dificultad de llenado por parte de los ventrículos, manteniendo la FE preservada. En la mayoría de los pacientes con IC hay evidencia de disfunción sistólica y diastólica, tanto en reposo como en el ejercicio, por lo que ambos tipos no deben considerarse como entidades fisiopatológicas separadas (3, 4).

1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.2.1. Prevalencia, incidencia y pronóstico

Actualmente, la prevalencia de la IC puede estimarse en el 2% de la población occidental, pero aumenta más del 10% en personas mayores de 70 años (1, 6). Las personas menores de 50 años no suelen padecer IC, pero en los mayores de 50 años, la prevalencia y la incidencia aumentan progresivamente con la edad (6). Un estudio poblacional basado en síntomas y signos de la IC, mostró que la prevalencia general era del 2,2%, incrementándose desde el 0,7% en personas de 45-54 años hasta el 8,4% en personas ≥ 75 años (7). Estos datos coinciden con estudios previos, donde la prevalencia de la IC era el 1% en el grupo de edad de 55-64 años, el 3% en el grupo de edad de 65-74 años, el 7% en el grupo de edad de 75-84 años y más del 10% en el grupo de edad de ≥ 85 años (8). En los grupos más jóvenes, el desarrollo de IC es más frecuente en varones debido a que la enfermedad coronaria empieza a edades más tempranas, pero a edades avanzadas, es similar en ambos sexos (3). La prevalencia total de la IC está en aumento debido al envejecimiento de la población, a una mayor

supervivencia de los pacientes que sufren eventos coronarios y a la eficacia de la prevención. En España, de 1991 a 2012 la población mayor de 65 años se incrementó en un 50%, además la esperanza de vida se incrementó en 1-2 años entre las edades de 65-76 años y 77-87 años (9).

La incidencia de la IC se aproxima a 5-10 casos por cada 1.000 habitantes al año (6). Estas estimaciones están basadas en los estudios de Rotterdam y Hillingdon (10-12). En el estudio Hillingdon la incidencia de la IC se incrementa desde 0,2 casos por cada 1.000 habitantes al año en personas de 45-55 años hasta 12,4 casos por cada 1.000 habitantes al año en personas >85 años, con una media de edad de 76 años. Mientras que en el estudio Rotterdam la incidencia aumenta desde 2,5 casos por cada 1.000 habitantes al año en personas de 55-64 años hasta 44 casos por cada 1.000 habitantes en personas >85 años. La IC es más común en hombres que en mujeres (15 y 12 casos de cada 1.000 habitantes por año, respectivamente).

La IC es una causa común de hospitalización, particularmente en personas mayores de 65 años (13). El tratamiento efectivo de estos pacientes ha mejorado las tasas de hospitalización y la supervivencia, pero sigue teniendo un gran impacto económico en la sanidad. Es la causa del 5% de los ingresos hospitalarios urgentes, ocupa el 10% de las camas hospitalarias y representa aproximadamente el 2% de los gastos sanitarios nacionales, debido en gran parte al coste de las hospitalizaciones (14). Su pronóstico es comparable a las formas más comunes de cáncer. Excepto en el caso de cáncer de pulmón, la IC se asocia con la peor tasa de supervivencia a los 5 años (25% para ambos sexos). Con una tasa de mortalidad del 59% a los 5

años y una pérdida de esperanza de vida de 6,8 años/1.000 habitantes en hombres y 5,1 años/1.000 habitantes en mujeres (13, 15).

1.2.2. Etiología

La IC es un síndrome resultado de un número importante de enfermedades, frecuentemente se produce debido a la combinación de varias causas que acaban desencadenando la patología.

La importancia de la clasificación etiológica de la IC radica en identificar la condición responsable, contribuyendo a tratarla de manera más eficaz y potencialmente reversible. No existe una clasificación consensuada de la etiología de este síndrome, frecuentemente se producen solapamientos entre las potenciales categorías en las que se clasifica. La Tabla 1 muestra una posible agrupación de etiologías que pueden llevar a IC.

Tabla 1. Etiología de la insuficiencia cardiaca.

<p>Miocardopatías</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Enfermedad arterial coronaria 2. Hipertensión 3. Miocardopatía <ol style="list-style-type: none"> a. Familiar <ol style="list-style-type: none"> I. Hipertrófica II. Dilatada III. Miocardopatía arritmogénica ventricular derecha IV. Restrictiva V. Ausencia de compactación ventricular derecha b. Adquirida <ol style="list-style-type: none"> I. Miocarditis (miocardopatía inflamatoria) <p>Infeciosa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacteriana • Por espiroquetas • Fúngica • Protozoica • Parasítica • Por raquitismo • Viral <p>Inmunomediada:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Toxoide tetánico, vacunas, enfermedad sérica • Fármacos • Miocarditis linfocítica o de células gigantes • Sarcoidosis • Autoinmunidad • Eosinofílica (Churg-Strauss) <p>Tóxica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fármacos/drogas (p. ej., quimioterapia, cocaína, etc.) • Alcohol • Metales pesados (cobre, hierro, plomo) II. Endocrina/nutricional <ul style="list-style-type: none"> • Feocromocitoma • Déficit vitamínico (p. ej., tiamina) • Déficit de selenio • Hipofosfatemia • Hipocalcemia III. Embarazo IV. Infiltración <ul style="list-style-type: none"> • Amiloidosis • Malignidad 	<p>Valvulopatías</p> <p>Mitral Aórtica Tricuspídea Pulmonar</p> <p>Enfermedades pericárdicas</p> <p>Pericarditis constrictiva Efusión pericárdica</p> <p>Enfermedades endocárdicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Afección endomiocárdica con hipereosinofilia (síndrome hipereosinofílico [SHE]) • Afección endomiocárdica sin hipereosinofilia (p. ej., fibrosis endomiocárdica [FEM]) • Fibroelastosis endocárdica <p>Cardiopatías congénitas</p> <p>Arritmias</p> <p>Taquiarritmia <ul style="list-style-type: none"> • Auricular • Ventricular Bradiarritmia <ul style="list-style-type: none"> • Disfunción del nódulo sinusal </p> <p>Trastornos de la conducción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueo auriculoventricular <p>Estados de alto rendimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anemia • Sepsis • Tirotoxicosis • Enfermedad de Paget • Fístula arteriovenosa <p>Sobrecarga de volumen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia renal • Iatrogénica (p. ej., por infusión de fluidos posoperatoria)
---	---

(Modificada de McMurray et al 2012 (1)).

Resulta inapropiado realizar un *screening* diagnóstico de todas las posibles causas de IC para llegar finalmente al diagnóstico etiológico de la misma. Es de gran valor tener en cuenta las etiologías más frecuentes y orientar la búsqueda de la causa en función de esto último y de la presunción diagnóstica en base a la anamnesis y el examen clínico.

La miocardiopatía dilatada (MCD) es una de las principales causas de IC (16), en la mayoría de los casos su causa es desconocida (MCD idiopática) pero puede ser el resultado de una variedad de agentes tóxicos, metabólicos, infecciosos, hereditarios o autoinmunes. A pesar de la predominancia de los casos idiopáticos, y debido a que la mortalidad por infarto de miocardio ha disminuido, son cada vez más frecuentes los casos de MCD isquémica. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los pacientes con enfermedad coronaria presentan dilatación.

Una de las clasificaciones más comunes es la que divide la IC en MCD no isquémica y miocardiopatía isquémica (MCI). Por todo ello, en esta tesis doctoral nos centraremos en el estudio de pacientes con MCD idiopática y MCI:

- ❖ En la MCD existe un daño miocárdico continuado que con el tiempo conduce a la pérdida de cardiomiocitos, fibrosis y dilatación ventricular. Se caracteriza, en la mayoría de casos, por un aumento de la masa ventricular y de la cavidad ventricular; la dilatación de las cuatro cavidades es habitual, así como la disminución del grosor de las paredes ventriculares, lo que compromete la contractibilidad cardíaca y la función ventricular (17) (Figura 1). La MCD puede ocurrir a cualquier edad, pero es más común en hombres a partir

de los 30 (18). La supervivencia a los 5 años después del diagnóstico es del 50%, los pacientes con frecuencia desarrollan IC congestiva progresiva y complicaciones tales como tromboembolismo y arritmias (19).

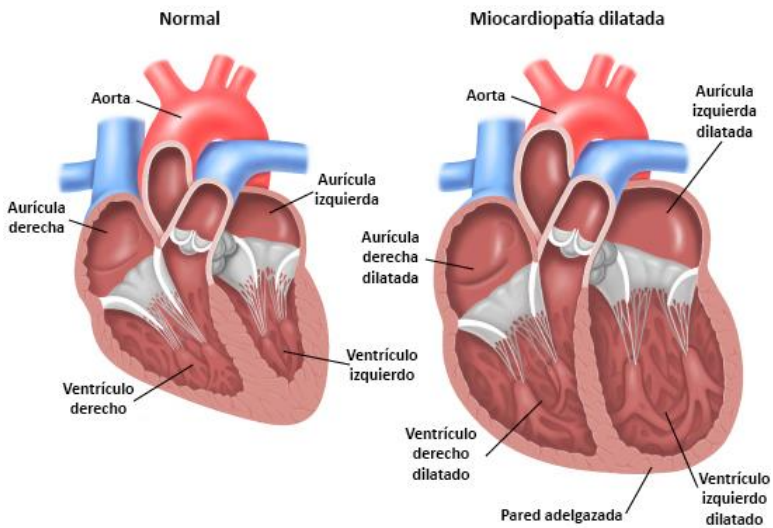


Figura 1. Miocardiopatía dilatada. (Modificada de <http://www.petmc.com>).

- ❖ La MCI es un conjunto de trastornos que se caracterizan por la reducción del suministro sanguíneo al miocardio, debido generalmente a aterosclerosis (Figura 2). Por tanto, se asocia con hipoxemia y un déficit de los sustratos necesarios para la producción de ATP, además de un acúmulo anormal de productos de desecho del metabolismo celular (20). La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que produce el endurecimiento de los vasos sanguíneos, especialmente de las arterias grandes y medianas, por la acumulación local de fibras y lípidos (principalmente ésteres y cristales de colesterol) en su pared interna; formándose lesiones

focales o placas que pueden ocluir directamente la luz de los vasos o mediante complicación trombótica (21).

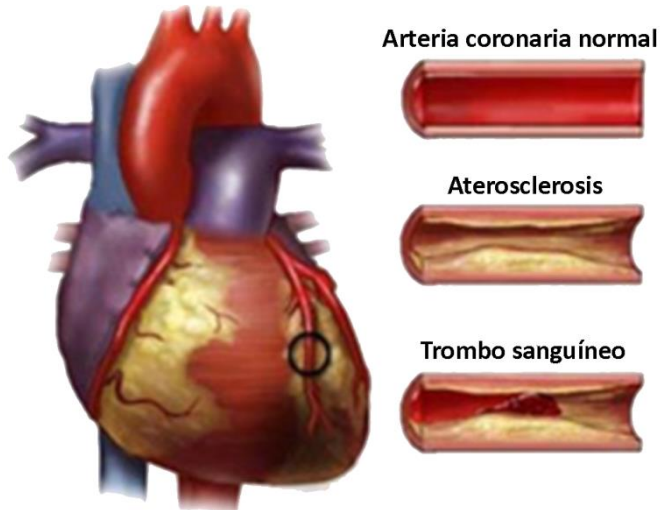


Figura 2. Miocardiopatía isquémica. (Modificada de <http://institutocardiovascularesanluis.com>).

La MCI ha sido, y continúa siendo, la principal causa de muerte en el mundo. Solo en 2013 causó más de 8 millones de muertes en todo el mundo, el 14,8% de todas las muertes y un 41,9% más de las muertes por MCI producidas en 1990 (más de 5 millones) (22).

1.2.3. Fisiopatología

La IC se produce como resultado de un daño en el miocardio a partir de una gran variedad de causas (Tabla 1), ocasionando la pérdida de miocitos funcionales o la pérdida de la capacidad del miocardio de generar fuerza, lo que impide que el corazón se contraiga con normalidad (23).

Un paciente con IC tiene el gasto cardíaco deprimido, lo que a su vez conduce a una disminución de la presión arterial y, por tanto, a una disminución de la perfusión del tejido. Existen mecanismos compensatorios que intentan aumentar el gasto cardíaco y mantener la presión arterial, asegurando una adecuada perfusión de los tejidos, entre ellos el mecanismo de *Frank-Starling*, la activación neurohormonal y el remodelado ventricular (Figura 3). Aunque inicialmente los mecanismos compensatorios son beneficiosos en las etapas tempranas de la IC, un proceso a largo plazo puede ser perjudicial (23).

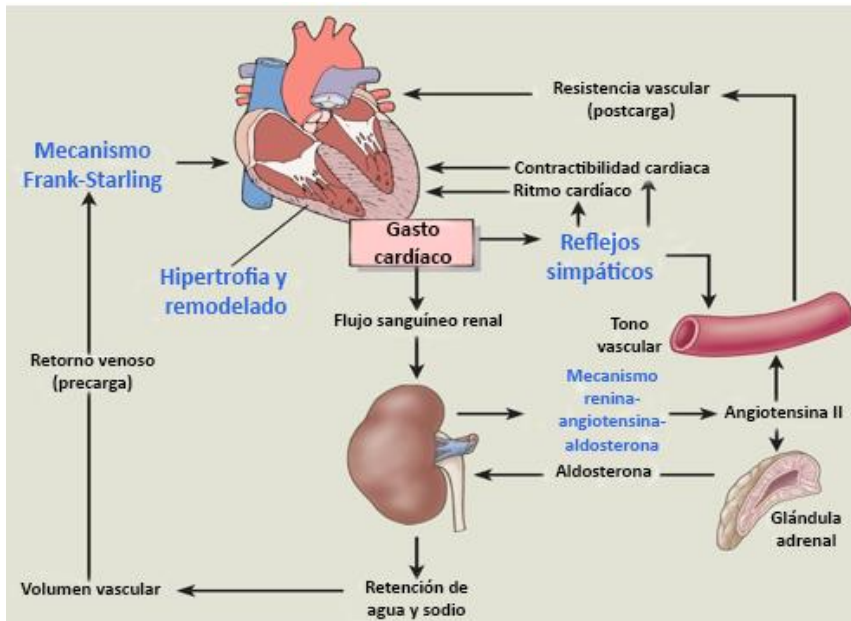


Figura 3. Mecanismos compensatorios en la insuficiencia cardíaca. (Modificada de Porth 2011 (24)).

El mecanismo de *Frank-Starling* describe la capacidad del corazón para cambiar su fuerza de contracción y, por tanto, el volumen sistólico en

respuesta a los cambios en el retorno venoso (25) (Figura 4). Este mecanismo juega un papel compensatorio muy importante en las primeras etapas de la IC (26).

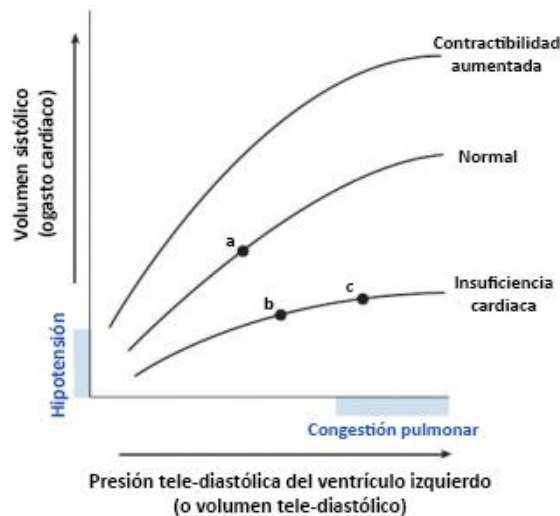


Figura 4. Curvas del mecanismo *Frank-Starling* para corazón con contractibilidad aumentada, corazón normal y corazón con insuficiencia cardíaca. El punto **a** representa un individuo sano en reposo. Los puntos **b** y **c** representan a un individuo con disfunción sistólica. Inicialmente en el punto **b**, un aumento de la precarga conduce a un incremento compensatorio del gasto cardíaco, aunque en menor medida que en un corazón sano. La IC progresa, en el punto **c** se observa que el volumen sistólico aumenta ligeramente para el aumento del volumen tele-diastólico. Con el tiempo el mecanismo de compensación se agota y el aumento del volumen y presión tele-diastólicos conduce a congestión pulmonar con gasto cardíaco deprimido. (Modificada de Kemp & Conte 2011 (23)).

La activación neurohormonal es muy importante para el mantenimiento de la presión arterial y la compensación durante las primeras etapas de la IC (27). Hasta el momento se han descrito la activación del sistema nervioso adrenérgico y del sistema de la renina y la angiotensina, que son responsables del mantenimiento del gasto cardíaco mediante una mayor retención de sal y agua, una vasoconstricción arterial periférica y un

aumento de la contractilidad, y la activación de los mediadores inflamatorios responsables de la reparación y el remodelado cardiacos (28) (Figura 3).

El estrés hemodinámico crónico sobre el corazón lleva a alteraciones en el tamaño, forma, estructura y función del ventrículo. Este remodelado implica cambios en la masa ventricular, la composición y el volumen, y cambios generales en su geometría que inicialmente son compensatorios. El corazón se agranda para aumentar el volumen ventricular que conduce a un mayor volumen sistólico a pesar de una FE deprimida. El espesor de la pared del miocardio y la masa ventricular aumentan para aumentar la contractibilidad (23).

Aunque es importante la compensación durante etapas tempranas de la IC, los resultados a largo plazo de su activación resultan perjudiciales (23, 28). El agrandamiento y la hipertrofia del ventrículo conducen a un aumento de la tensión de la pared y de la fibrosis que finalmente perjudica la contractilidad. Además, también aumenta la apoptosis y necrosis miocárdica; y existe una asincronía contráctil significativa en el ventrículo dilatado y un remodelado que conduce a un bombeo menos eficaz (23).

El papel de los PN es muy importante en la regulación de la homeostasis del volumen y la presión sanguíneas, teniendo efectos beneficiosos y cardioprotectores que incluyen la natriuresis, vasodilatación y la modulación del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (27). Además, los PN inhiben la hipertrofia y el remodelado cardiaco y también actúan en el cerebro donde las acciones que realizan refuerzan sus acciones periféricas.

1.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

1.3.1. Diagnóstico

El diagnóstico de la IC puede ser complicado, especialmente en las etapas iniciales, ya que muchos de los síntomas y signos no son específicos, son poco sensibles y difíciles de detectar (1).

La historia clínica del paciente es importante; una historia cuidadosa y la exploración física siguen siendo las piedras angulares en la evaluación de los pacientes con IC. La historia ofrece pistas para la etiología de la miocardiopatía y también proporciona información sobre la gravedad de la enfermedad y su pronóstico e identifica las posibilidades del paciente para las intervenciones terapéuticas. El examen físico proporciona información acerca de la gravedad de la enfermedad y permite la evaluación del volumen cardíaco y la adecuación de la perfusión (2).

El ecocardiograma y el electrocardiograma (ECG) junto con la determinación de los PN son las pruebas más utilizadas en los pacientes con sospecha de IC. Ofrecen información crucial para determinar el tratamiento adecuado y permiten una impresión diagnóstica y un plan de tratamiento inicial para la mayoría de los pacientes (1).

La radiografía de tórax sirve para identificar una explicación pulmonar alternativa para los síntomas y signos del paciente, pero también puede revelar congestión venosa pulmonar o edema en un paciente con IC (1).

Los estudios hematológicos y bioquímicos también son importantes. Permiten determinar la función renal y los niveles de potasio, importantes

en el inicio del tratamiento del bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona, excluir anemia, determinar enfermedad tiroidea que imita o empeora la IC, diagnosticar diabetes mellitus (DM) no conocida previamente, muy común en estos pacientes, o determinar enzimas hepáticas, importantes en el inicio del tratamiento con amiodarona o warfarina. Además, la concentración en sangre de otras moléculas más específicas como PN o troponina T son útiles en el diagnóstico o exclusión de IC (1).

Por último, las pruebas no invasivas adicionales como resonancia magnética cardíaca, tomografía computarizada o gammagrafía cardíaca, se realizan en pacientes en los que la ecocardiografía no proporciona suficiente información, y en aquellos pacientes con sospecha de enfermedad coronaria; mientras que las pruebas invasivas como angiografía coronaria, cateterismo o biopsia, se indican cuando se quiere determinar la etiología de la enfermedad, obtener información pronóstica y para evaluar la necesidad de revascularización (3).

En la Figura 5 se muestra un algoritmo desarrollado por la *European Society of Cardiology* para el diagnóstico de la IC (1). En los pacientes con sospecha de IC de inicio agudo se recomienda realizar precozmente una ecocardiografía. En el caso de medir un PN se debe utilizar un punto de corte concreto (péptido natriurético tipo B (BNP), ≥ 100 pg/ml o NT-proBNP, ≥ 300 pg/ml), también se puede utilizar MR-proANP (≥ 120 pmol/l). En los pacientes con sospecha de IC de inicio lento se puede utilizar un ECG y la determinación de un PN para identificar la necesidad de una ecocardiografía. Con este tipo de pacientes se debe utilizar un punto de

corde más bajo para evitar falsos negativos (BNP, ≥ 35 pg/ml; o NT-proBNP, ≥ 125 pg/ml). A los pacientes con alta probabilidad de IC se les puede realizar directamente una ecocardiografía.

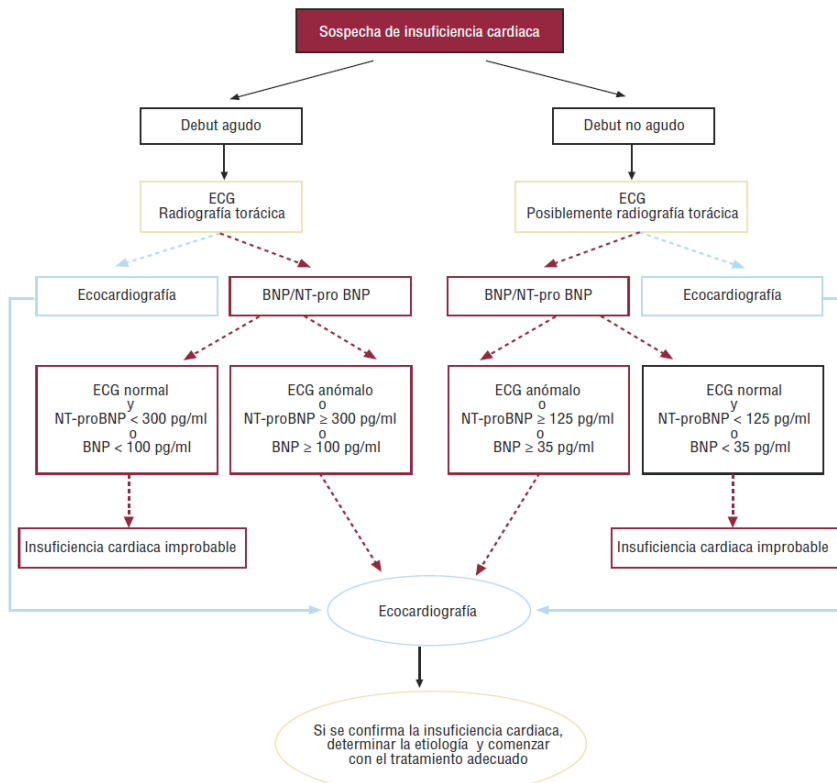


Figura 5. Diagrama de flujo para el diagnóstico de pacientes con sospecha de insuficiencia cardíaca, que muestra abordajes alternativos. BNP, péptido natriurético tipo B; ECG, electrocardiograma; NT-proBNP, fracción N-terminal del propéptido natriurético tipo B. (Modificada de McMurray et al 2012 (1)).

1.3.2. Tratamiento

Los objetivos del tratamiento en pacientes con IC establecida son aliviar los síntomas y signos, evitar el ingreso en el hospital y mejorar la supervivencia de acuerdo con las recomendaciones reflejadas en las guías de IC (1, 2). Además, es fundamental detectar y considerar el tratamiento de las comorbilidades cardiovasculares y no cardiovasculares más frecuentes.

1.4. FACTORES DE RIESGO Y COMORBILIDADES

Muchas condiciones o comorbilidades se asocian con un aumento de la predisposición a desarrollar IC, la mayoría conllevan estados clínicos peores y son factores predictivos de mal pronóstico. Además, pueden condicionar el tratamiento de los pacientes debido a que ciertos fármacos para tratar la comorbilidad pueden empeorar la IC o viceversa o existan interacciones entre los tratamientos de ambas. Esto ha hecho que algunas comorbilidades se conviertan en el objetivo del tratamiento.

La hipertensión se asocia con mayor riesgo de sufrir IC y su tratamiento reduce considerablemente su incidencia (1). Se ha estimado que el 47% de los casos de MCI son atribuibles a la hipertensión arterial (29). A su vez, la glucemia mal controlada y la DM son muy comunes en la IC y se asocian con un peor estado funcional y pronóstico (1). El 20-30% de los pacientes con IC padece DM (30) y ésta tiene un impacto negativo en la evolución natural de la IC, especialmente en pacientes con MCI, donde ambas interactúan acelerando el deterioro de la disfunción miocárdica y la progresión de la IC y tienen una influencia desfavorable en el pronóstico (31, 32). Además la DM es particularmente importante en mujeres, provoca un mayor impacto

negativo en los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares que en hombres, incrementando el riesgo en mujeres diabéticas (33).

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo claramente establecido que contribuye a la patogénesis de la aterosclerosis y se ha relacionado con el desarrollo de la IC (21). En todo el mundo, las concentraciones elevadas de colesterol provocan un 56% del total de las enfermedades cardíacas isquémicas y un 18% de los accidentes cerebrovasculares (28).

La exposición al tabaco se ha asociado con mayor riesgo en el desarrollo de IC en adultos de edad avanzada, independientemente de otros factores de riesgo y de eventos coronarios. El riesgo es mayor tanto en fumadores como en exfumadores. En los primeros este riesgo es alto independientemente de paquetes/años de exposición, mientras que en los exfumadores existe una asociación dosis/efecto. No parece existir ningún nivel seguro de consumo de tabaco en relación con el riesgo de IC (34).

La edad y el género masculino se han identificado de manera constante como factores de riesgo. Los hombres tienden a desarrollar enfermedad coronaria a edades más tempranas pero a partir de los 65 años el riesgo de IC en mujeres es prácticamente el mismo que en hombres (3). Las mujeres comparten muchos factores de riesgo con los hombres, como tabaquismo, hipertensión o colesterol alto, siendo particularmente importante la DM (33). En cuanto a la edad, la prevalencia y la incidencia de la IC incrementan progresivamente con la edad en personas mayores de 50 años tanto en hombres como en mujeres (6). A partir de la menopausia se incrementa el índice de enfermedades del corazón en la mujer, estando en discusión si

son causadas, principalmente, por el envejecimiento o son el resultado de la deficiencia de estrógenos (35, 36).

Existen otros muchos factores asociados a IC como son anemia, cáncer, depresión, disfunción eréctil, gota, obesidad, insuficiencia renal... Algunos pueden tratarse o modificarse y otros no. Pero el control del mayor número de factores posible puede reducir el riesgo cardiovascular.

2. PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

2.1. PAPEL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

2.1.1. Diagnóstico

Los niveles plasmáticos de los PN están incrementados bajo ciertas condiciones patológicas como la IC, por lo que su papel como herramienta útil en la evaluación de la IC en la práctica clínica ha sido ampliamente estudiado en los últimos 25 años. Los estudios iniciales demostraron que los niveles plasmáticos del péptido natriurético atrial (ANP) incrementaban en proporción a la severidad de la IC congestiva sintomática (37). De igual forma, en pacientes con IC grave aumentaban los niveles de ANP y BNP y su perfil de secreción variaba de acuerdo con la condición cardíaca subyacente (38). Muchos estudios han mostrado que los niveles plasmáticos de ANP están significativamente elevados en pacientes asintomáticos con disfunción ventricular izquierda.

Inversamente, la gravedad de la IC se ha evaluado basándose en los niveles plasmáticos de BNP, los cuales se correlacionan con la clase funcional y la hemodinámica (39). Además, los niveles plasmáticos de ANP aumentan en respuesta a incrementos en la presión auricular derecha y/o izquierda, mientras que aumentos en BNP reflejan el grado de sobrecarga ventricular. Los niveles plasmáticos de BNP son también útiles para identificar pacientes con disfunción ventricular izquierda asintomática, y muchos investigadores han descubierto que podrían servir como marcadores de diagnóstico de la disfunción sistólica ventricular izquierda, tanto en la población general como en pacientes con enfermedad cardiovascular (40).

Por otra parte, los bajos niveles de BNP se pueden utilizar para descartar IC congestiva en pacientes sintomáticos con valores predictivos negativos altos. En urgencias hospitalarias, la medición rápida de valores de BNP es útil para establecer o excluir un diagnóstico de IC congestiva en pacientes con disnea aguda (41).

Por lo tanto, la medición de los niveles de BNP es útil tanto para la evaluación de la gravedad de la IC, como para excluir y detectar la disfunción ventricular izquierda y la IC. Por estas razones, las Guías de práctica clínica reconocen el valor potencial de los PN para el diagnóstico y manejo de la IC (1-3).

2.1.2. Pronóstico y monitorización del tratamiento

Numerosos estudios están demostrando que los niveles plasmáticos de BNP (40, 42-45) y NT-proBNP (46-51) son altamente predictivos para los eventos de origen cardiaco. Además, en los últimos años muchos artículos han evaluado la capacidad pronóstica del porcentaje de cambio de los PN (BNP y NT-proBNP), mostrando que ambas moléculas predicen la mortalidad y los eventos cardiovasculares en pacientes con IC avanzada o descompensada (52-54).

En cuanto a la monitorización de BNP o NT-proBNP como guía en la evaluación de la eficacia y optimización de la terapia en la IC existen varios estudios que la evalúan (55-58) con resultados que indican que una terapia que conduzca a un descenso de PN facilitarían el uso óptimo de los fármacos y una reducción de los eventos clínicos adversos. Sin embargo, es necesario aclarar primero el efecto de los diferentes tratamientos cardiacos sobre los

niveles de PN ya que se ha visto que ejercen efectos ambiguos debidos, posiblemente, a la duración del tratamiento y/o a la selectividad farmacológica de los diferentes componentes (59-62).

2.1.3. Tratamiento

El uso potencial de los PN para el beneficio terapéutico es prometedor y se ha estudiado ampliamente. Los estudios iniciales probaron el uso de ANP y BNP como agentes terapéuticos potenciales en el tratamiento de la IC. Así, por ejemplo, la infusión de ANP sintético (anaritida) en pacientes con IC crónica (63, 64) dio lugar a una mayor excreción de sodio y agua, y a una disminución de la presión sanguínea. En pacientes con IC aguda mostró respuestas hemodinámicas beneficiosas, sugiriendo que las inyecciones de ANP podrían ser útiles en el tratamiento de la IC (65).

El BNP humano recombinante (nesiritida) imita las acciones del BNP endógeno y causa vasodilatación potente acompañado de natriuresis y diuresis, así como la disminución en los niveles de aldosterona y endotelina plasmáticos en pacientes con IC aguda (66). La FDA aprobó el uso de nesiritida para el tratamiento de IC aguda en 2001, pero todavía se está investigando debido al mayor riesgo de disfunción renal y mortalidad de los pacientes bajo este tratamiento (67, 68).

Los usos terapéuticos del péptido natriurético tipo C (CNP) todavía no se han explorado, pero podría ser un fármaco cardiovascular prometedor, ya que se ha encontrado que puede prevenir la remodelación cardiaca después de un infarto de miocardio en ratones (69).

2.2. TIPOS DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

Los PN son una familia de hormonas/factores paracrinicos de naturaleza peptídica, estructuralmente relacionados pero genéticamente diferentes, liberados principalmente por los cardiomiocitos en respuesta a una sobrecarga de volumen o presión. Regulan el volumen de sangre, presión arterial, hipertrofia ventricular, hipertensión pulmonar, metabolismo graso y crecimiento de los huesos largos. Se conocen cinco péptidos: ANP, BNP, CNP, péptido natriurético *Dendroaspis* (DNP) y péptido natriurético ventricular (VNP). La estructura básica de los PN consiste en un anillo intramolecular altamente conservado de 17 aminoácidos y secuencias N- y C- terminales de diferentes longitudes (70) (Figura 6). Así como tres receptores: receptor de péptidos natriuréticos 1 (NPR1), receptor de péptidos natriuréticos 2 (NPR2) y receptor de péptidos natriuréticos 3 (NPR3). Los dos primeros tienen actividad guanilil ciclasa, mientras que el último carece de actividad enzimática intrínseca conocida (Figura 7).

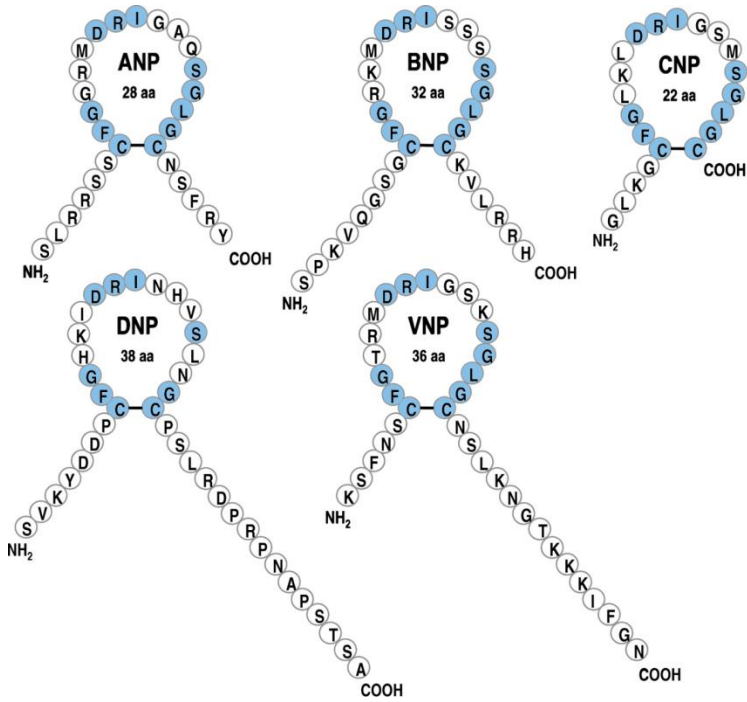


Figura 6. Secuencia y estructura del péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético tipo B (BNP), péptido natriurético tipo C (CNP), péptido natriurético *Dendroaspis* (DNP) y péptido natriurético ventricular (VNP). (Modificada de Tota et al 2010 (71)).

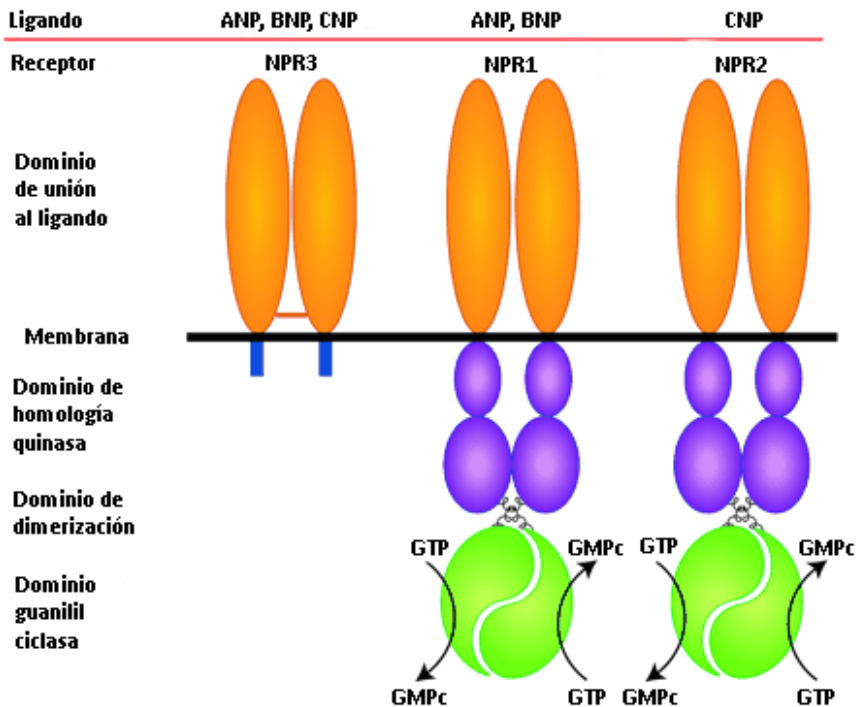


Figura 7. Topología de los receptores de los péptidos natriuréticos y preferencias de ligando. ANP, péptido natriurético auricular; BNP, péptido natriurético tipo B; CNP, péptido natriurético tipo C; NPR1, receptor de péptidos natriuréticos 1; NPR2, receptor de péptidos natriuréticos 2; NPR3, receptor de péptidos natriuréticos 3; GTP, guanosín trifosfato; GMPC, guanosín monofosfato cíclico. (Modificada de Potter et al 2006 (72)).

2.2.1. ANP

En 1981, Bold *et al* encontraron que la inyección intravenosa de extractos miocárdicos en ratas provocaba una rápida disminución de la presión arterial que iba acompañado por aumento de la excreción renal de sodio y agua (73), descubriendo de esta forma ANP (Figura 6).

NPPA es el gen que codifica ANP y se localiza en el cromosoma 1 (1p36.21). Está compuesto de 3 exones y 2 intrones, con un tamaño aproximado de 2

kb (74) (Figura 8). Todos los PN son sintetizados como prehormonas, el ARNm de ANP es traducido en preproANP de 151 aminoácidos. Esta molécula contiene un péptido señal de 25 aminoácidos que es cortado para producir proANP (γ -ANP) de 126 aminoácidos, la forma predominante almacenada en los gránulos auriculares (75). Una vez secretado proANP, corina, una serina proteasa transmembrana, escinde este propéptido en el péptido biológicamente activo, ANP (α -ANP), de 28 aminoácidos y el extremo N-terminal inactivo, NT-proANP (72, 74, 76).

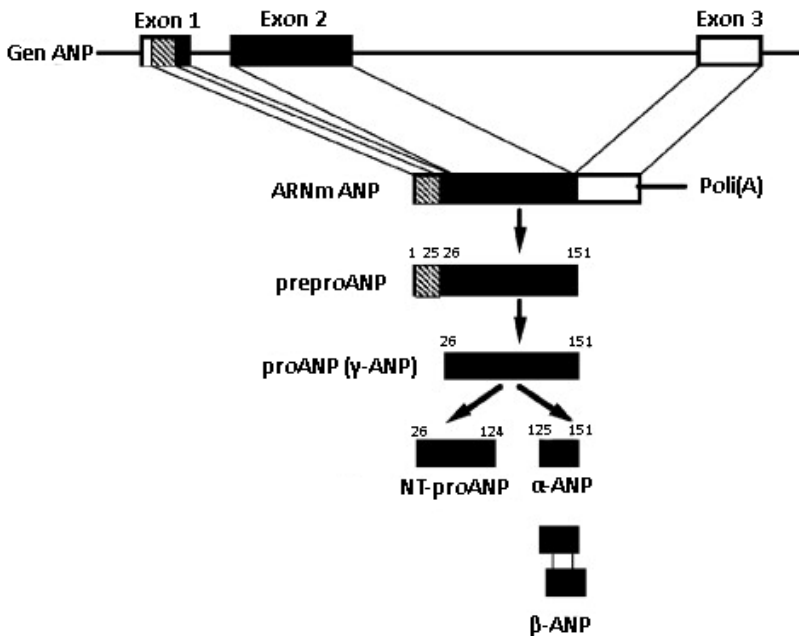


Figura 8. Estructura del gen y biosíntesis de ANP. El exón 1 codifica la región 5' no traducida, los 25 aminoácidos del péptido señal y los primeros 16 aminoácidos de proANP; el exón 2 codifica la mayor parte de la secuencia de proANP; y el exón 3 codifica la tirosina terminal y la región 3' no traducida. (Modificada de Nishikimi et al 2011(74)).

ANP se expresa abundantemente en corazón, se sintetiza y se secreta en condiciones normales en las aurículas, y en el miocardio ventricular durante el desarrollo fetal, hipertrofia, o IC (77). El ARNm de ANP también se ha detectado en otros tejidos extracardiacos, incluyendo el hipotálamo, la glándula pituitaria y el pulmón (78), pero la expresión extracardiaca es generalmente débil.

Las células auriculares almacenan el péptido en gránulos de secreción, mientras que las células ventriculares lo secretan rápidamente una vez sintetizado. Se piensa que ANP es liberado por una vía secretora constitutiva en el ventrículo, mientras que en la aurícula se almacena y se libera por una vía regulada (79).

La liberación de proANP de los gránulos auriculares se estimula principalmente por el estiramiento de la pared auricular causada por el aumento de volumen intravascular (80-82). Una vez secretado y escindido, ANP entra en la circulación para distribuirse a sus órganos diana. En la circulación además de ANP y NT-proANP se encuentran otros fragmentos como urodilatina de 32 aminoácidos generada en el riñón y que podría ser importante en la regulación de la excreción renal de agua y sodio (83); el dímero antiparalelo de ANP, β -ANP, detectado en plasma y miocardio de pacientes con IC (84, 85); y el fragmento de la región media de proANP (MR-proANP) con papel diagnóstico de la IC crónica y aguda (86, 87).

2.2.2. BNP

BNP fue aislado por primera vez en 1988 en extractos de tejido cerebral de cerdo, por lo que se llamó péptido natriurético cerebral (88). Más tarde, se

encontraron concentraciones mucho más altas en corazón, donde actúa como hormona cardiaca (89).

NPPB es el gen que codifica BNP y se localiza en el cromosoma 1 (1p36.2). Como *NPPA*, este gen consta de 3 exones y 2 intrones (90) (Figura 9). El ARNm de BNP es traducido en preproBNP de 134 aminoácidos, del cual se elimina el péptido señal de 26 aminoácidos produciendo proBNP (γ -BNP) de 108 aminoácidos. proBNP es escindido, por corina y más eficientemente por furina (91), en BNP, biológicamente activo, de 32 aminoácidos y NT-proBNP, inactivo, de 76 aminoácidos; ambos son liberados constitutivamente a la circulación (72, 74, 76). Esta escisión podría ocurrir en la red *trans* Golgi (92) y tanto la molécula intacta proBNP, como BNP y NT-proBNP circulan en plasma (93).

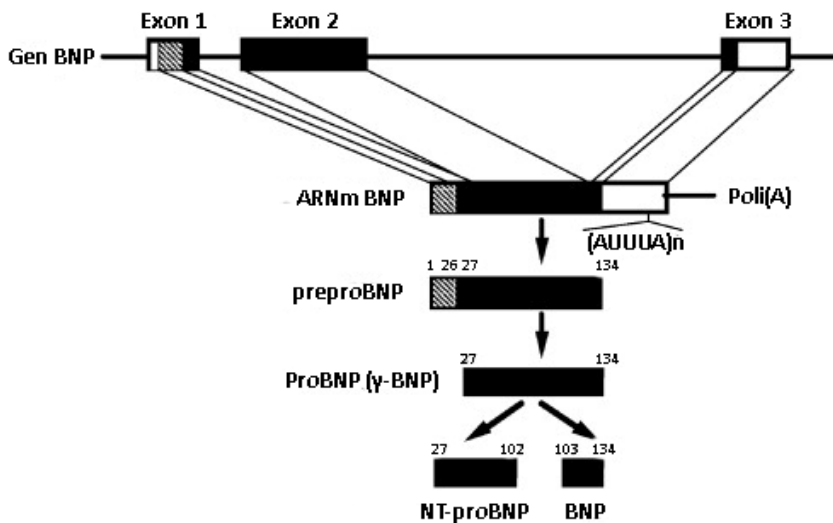


Figura 9. Estructura del gen y biosíntesis de BNP. El exón 1 codifica los 26 aminoácidos del péptido señal y los primeros 15 aminoácidos de proBNP; el exón 2 codifica la mayor parte de la secuencia de proBNP; y el exón 3 codifica la tirosina terminal y la región 3' no traducida. (Modificada de Nishikimi et al 2011(74)).

En aurícula BNP se almacena en los gránulos auriculares junto con ANP, mientras que su producción en ventrículo se encuentra regulada transcripcionalmente en respuesta a estados de estrés cardiaco tales como la sobrecarga de volumen (76), y bajo el control de GATA-4 (94, 95). Además, se ha encontrado expresión extracardiaca en cerebro, pulmones, riñones, aorta y glándulas suprarrenales, aunque en concentraciones menores que en el ventrículo (96).

2.2.3. CNP

CNP fue aislado por primera vez en 1990 en extractos de cerebro (97). La estructura en anillo es homóloga a ANP y BNP pero se pierde la extensión C-terminal (Figura 6).

El gen que codifica CNP es *NPPC*, se localiza en el cromosoma 2 (2q37.1) y está formado por 3 exones y 2 intrones (74) (Figura 10). El ARNm de CNP codifica un polipéptido de 126 aminoácidos, un péptido señal de 23 aminoácidos seguido de proCNP de 103 aminoácidos. El péptido señal se escinde y resulta en proCNP de 103 aminoácidos, el cual es procesado adicionalmente en NT-proCNP y CNP de 53 o 22 aminoácidos. En el primer caso furina es la enzima responsable de esta escisión (98), mientras que en el segundo caso se desconoce la proteasa responsable, aunque algunos autores piensan que PC2 o PC1/3 podrían ser los encargados de esta escisión (74).

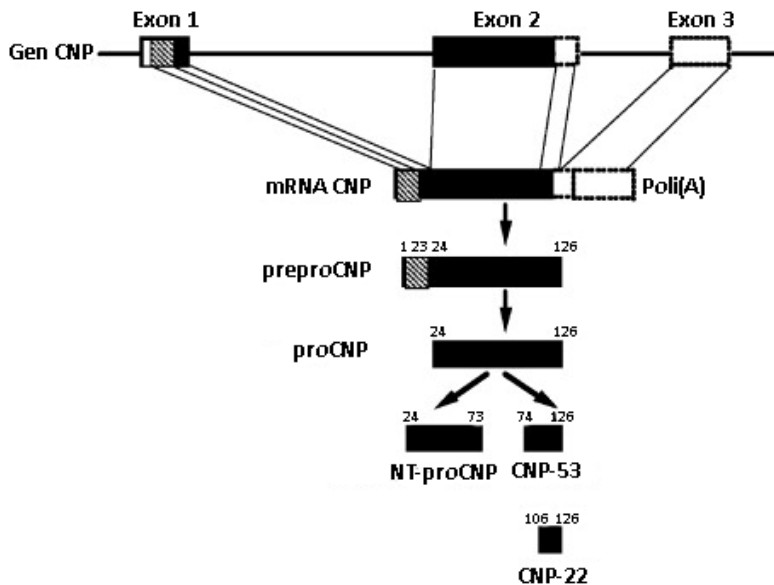


Figura 10. Estructura del gen y biosíntesis de CNP. El exón 1 codifica los 23 aminoácidos del péptido señal y los primeros 7 aminoácidos de proCNP; el exón 2 codifica el resto de la secuencia de proCNP; y el exón 3 codifica la región 3' no traducida. (Modificada de Nishikimi et al 2011 (74)).

CNP se expresa en cerebro pero también se expresa en condrocitos (99) y células endoteliales (100). No se almacena en gránulos y su secreción en las células endoteliales está regulada por TGF- β (100), TNF- α , IL-1, lipopolisacárido (101) y también por el estrés (102), mientras que la insulina lo inhibe (103).

CNP es el PN mas conservado, de hecho un análisis filogenético confirmó que el gen ancestral de la familia de los PN era CNP-4, que codifica para 4 tipos de CNP (104); ANP y BNP evolucionaron de eventos de duplicación génica de CNP (105).

2.2.4. Otros

Además de los PN de mamíferos (ANP, BNP y CNP), otros PN con estructura y propiedades similares han sido aislados en el reino animal.

En 1992 se purificó y se secuenció el péptido natriurético *Dendroaspis* (DNP) del veneno de la serpiente mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*) (106). Es un péptido de 38 aminoácidos estructuralmente homólogo a los otros PN (Figura 6). Se ha encontrado en aurícula y plasma humanos (107), pero no está claro si es o no un péptido endógeno ya que no se ha encontrado el gen que lo codifica (108). Sin embargo, DNP es un potente péptido natriurético y diurético (109) que, igual que ANP y BNP, actúa a través del receptor NPR1 y se elimina a través de NPR3 (106); pero es más estable a la endopeptidasa neutra (NEP) lo que podría explicar las colas N- y C- terminales alargadas (110).

En 1991 se identificó el péptido natriurético ventricular (VNP) en ventrículos de la anguila japonesa (*Angilla japonica*) (111). Se trata de un péptido de 36 aminoácidos con una larga cola C-terminal (Figura 6). Realiza las mismas acciones que los otros PN, pero sus efectos vasculares y renales parecen ser más potentes que los de sus otros PN, tanto en anguila como en rata (111).

2.3. RECEPTORES DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

2.3.1. NPR1

NPR1 es una guanilil ciclasa transmembrana, también conocida como NPR-A o GC-A. Contiene un dominio extracelular de unión al ligando de aproximadamente 450 aminoácidos, una sola región que atraviesa la membrana de 20-25 residuos y un dominio intracelular formado por el dominio de homología quinasa, dominio de dimerización y dominio C-terminal de la guanilil ciclasa, de aproximadamente 570 aminoácidos (76) (Figura 7). El gen que codifica NPR1, también llamado *NPR1*, está situado en el cromosoma 1 (1q21-q22), tiene aproximadamente 16 kb y contiene 22 exones y 21 intrones (112). Este receptor es el más abundante en los vasos sanguíneos grandes, y también está presente en las glándulas adrenales y el riñón (113).

NPR1 es el principal receptor de ANP y BNP. El orden de activación por los PN es ANP>BNP>>CNP (114). En condiciones normales, NPR1 es fosforilado en cuatro residuos de serina y dos de treonina localizados en la porción N-terminal, dominio de homología quinasa. Esta fosforilación es esencial para la activación del receptor (115) y la desfosforilación es un mecanismo de desensibilización en respuesta a una exposición prolongada a los PN o la activación de la proteína quinasa C (116, 117). La unión de los PN al receptor activa la guanilil ciclasa que conduce a una elevación del GMPc intracelular (113).

La internalización y degradación de NPR1 es controvertida. Mientras unos autores afirman que se produce una internalización y degradación por vía

lisosomal con reciclaje de una pequeña parte de los receptores que volverían a la membrana (118), otros indican que NPR1 es un receptor de membrana que no experimenta internalización ni degradación aguda (119-121).

2.3.2. NPR2

NPR2 es igualmente una guanilil ciclasa transmembrana, también conocida como NPR-B o GC-B; con topología, patrones de glicosilación y puentes disulfuro similares a NPR1 (Figura 7). Ambos receptores comparten un 78% de similaridad a nivel de aminoácidos de la región interna, mientras que el dominio externo es solo un 43% idéntico (122). El gen que codifica NPR2 es conocido como *NPR2* y se localiza en el cromosoma 9 (9p21-p12) (123), mide aproximadamente 16,5 kb y tiene 22 exones y 21 intrones (124). Este receptor predomina en el cerebro pero también puede encontrarse en los vasos sanguíneos grandes, las glándulas adrenales y el riñón (113).

NPR2 se une a los PN con una preferencia de $CNP \gg ANP \geq BNP$ (114), y como ocurre con NPR1 la unión de los PN al receptor activa la guanilil ciclasa que conduce a una elevación del GMPc intracelular (113). Esta activación es dependiente de la fosforilación del receptor; en NPR2 se han identificado 4 sitios de fosforilación de serina y uno de treonina en la porción N-terminal del dominio de homología quinasa (125). De forma similar a NPR1, la defosforilación media la desensibilización en respuesta a una exposición prolongada de CNP (126), activación de la proteína quinasa C (127) y elevación de calcio intracelular (128). A diferencia de NPR1 solo existe un estudio sobre el tráfico de NPR2 en el cual no se han encontrado evidencias de que este receptor se internalice o degrade (119).

2.3.3. NPR3

NPR3 es también conocido como NPR-C o receptor de aclaramiento. El dominio extracelular de unión al ligando posee un 35% de similitud con los otros dos receptores. Sin embargo, a diferencia de NPR1 y NPR2, este receptor solo tiene un dominio intracelular de 37 residuos y carece de actividad guanilil ciclasa (Figura 7) (129). El gen de NPR3 (*NPR3*) está localizado en el cromosoma 5 (5p13.3), contiene 8 exones y 7 intrones y se extiende más de 65 kb (123, 130). NPR3 es el receptor más abundantemente expresado, constituye aproximadamente el 94% de los sitios de unión de ANP en las células endoteliales (131). Además, se encuentra en glándulas suprarrenales, cerebro, corazón, riñón, mesenterio y tejido vascular de músculo liso (132-134).

La principal función de NPR3 es eliminar de la circulación los PN a partir del proceso de internalización mediada por receptor y degradación. Esta internalización ocurre también sin unión al ligando por lo que se trata de un proceso constitutivo. Además, tiene lugar el reciclaje del receptor a la membrana (135). NPR3 se une a los PN con una preferencia de ligando ANP>CNP>BNP (114) y con una estequiometría 2:1 (receptor:ligando) (136). Esta diferente afinidad por los PN puede contribuir a las diferencias en sus vidas medias en suero. Mientras que BNP permanece una media de 20 minutos en la circulación (137), ANP y CNP son eliminados más rápidamente (vida media de 2 y 2,6 minutos, respectivamente) (138-140).

2.4. ENZIMAS DE PROCESADO DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

Las enzimas responsables de procesar proANP, proBNP y proCNP difieren considerablemente, a pesar de que sus genes derivan de un origen común (105); probablemente estas diferencias reflejen requisitos funcionales específicos en diferentes células.

2.4.1. Corina

Corina es una serina proteasa transmembrana tipo II que se expresa abundantemente en cardiomiocitos fetales y adultos, pero también se han detectado niveles más bajos en otros tejidos, incluyendo riñón y hueso (141, 142).

Su gen (*CORINA*) se localiza en el cromosoma 4 (4p12-13), está formado por 22 exones y 21 intrones y se extiende a lo largo de más de 200 kb (143). Existe una región 5' flanqueante que contiene sitios de unión conservados para los factores de transcripción TBX5, GATA, NKX2.5, NFAT y Kruppel-like. Entre ellos, un sitio de unión a GATA es crítico para interactuar con el factor de transcripción GATA-4, importante para la expresión génica específica de corazón (143).

CORINA codifica un polipéptido de 1.042 aminoácidos caracterizado por un dominio transmembrana integral cerca de su extremo N-terminal, una cola citoplasmática corta y una compleja región extracelular. La región extracelular está compuesta por dos dominios tipo *frizzled* ricos en cisteína, ocho dominios del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), un dominio del receptor barredor (SRCR) y un dominio catalítico serina proteasa tipo tripsina en el extremo C-terminal (144) (Figura 11).

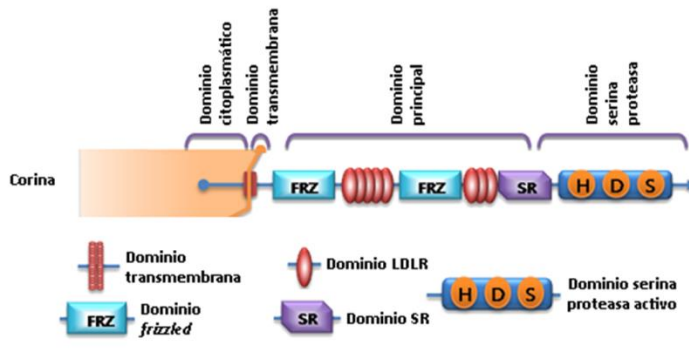


Figura 11. Estructura multidominio de corina humana. FRZ, dominio *frizzled*; LDLR, dominio receptor lipoproteína baja densidad; SR, dominio del receptor barredor. Las letras H, D y S en el dominio serina proteasa indican la posición de los tres residuos catalíticos histidina, aspartato y serina, respectivamente. (Modificada de Park 2010 (145)).

Corina es sintetizada como zimógeno y necesita de la escisión de Arg801 en el sitio conservado de activación, R↓ILGG, para su actividad. Sin embargo, el dominio transmembrana es dispensable para su actividad, ya que corina soluble sin este dominio ha mostrado actividad similar a corina de tipo “salvaje” (146).

Wu *et al* identificaron a corina como la enzima responsable de convertir proANP en ANP activo de una forma específica de secuencia (147, 148). Además, se observó que también escindía a proBNP aunque la reacción era menos eficiente que para proANP (91). Sin embargo, corina no escinde proCNP (98). Estos resultados son consistentes dado que las secuencias del sitio de escisión de proANP y proBNP son similares, pero difieren de proCNP.

2.4.2. Furina

Furina es una serina endoproteasa transmembrana tipo I que pertenece a la familia de las proproteínas convertasas. Es codificada por el gen *FURINA* localizado en el cromosoma 15 (15q25-q26) (149, 150). Codifica una preproenzima de 794 aminoácidos que contiene: un péptido señal que permite el acceso a la vía secretora; un prodominio que es eliminado autocatalíticamente por escisión en el sitio Arg-Ala-Lys-Arg y conduce a la activación de la enzima; un dominio catalítico cuya estructura está estrechamente relacionada con enzimas similares a subtilisina; un dominio homo B o P que es esencial para la actividad catalítica; una región rica en cisteína; un dominio hidrofóbico transmembrana que ancla la enzima a las membranas cerca del extremo C-terminal; y un dominio citoplasmático, implicada en la translocación de la proteasa de un orgánulo a otro (151) (Figura 12).

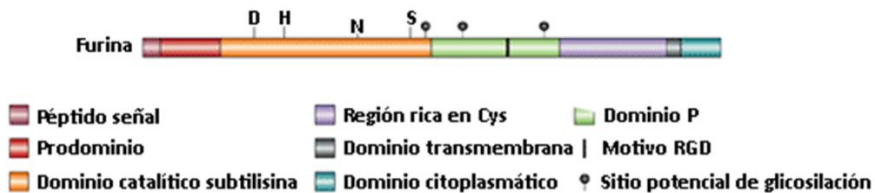


Figura 12. Estructura multidominio de furina humana. Las letras D, H y S en el dominio catalítico indican la posición de los tres residuos activos aspartato, histidina y serina, respectivamente. (Modificada de Thomas 2002 (152)).

Esta preproenzima necesita ser activada, para ello, tras la eliminación de la secuencia señal, el propéptido actúa como una chaperona intramolecular facilitando el plegado del dominio catalítico en la conformación activa. Es

escindido autocatalíticamente en Arg107 en el retículo endoplasmático (RE) pero permanece unido covalentemente a furina porque actúa como autoinhibidor *trans* durante el transporte a la vía secretora. Más adelante, en la zona *trans* Golgi, el propéptido sufre una segunda escisión en el sitio interno Arg75, y los fragmentos se disocian, provocando la activación de furina (153).

Furina está ubicuamente distribuida (154). Se localiza principalmente en la red *trans* Golgi aunque una parte de las moléculas de furina pueden translocarse entre este compartimento y la superficie celular (155, 156). Esta localización es dependiente de la secuencia primaria de aminoácidos del dominio citoplasmático y su estado de fosforilación (157).

Esta endoproteasa es capaz de escindir precursores de una amplia variedad de proteínas incluyendo factores de crecimiento, receptores, proteínas plasmáticas, metaloproteasas de la matriz, glicoproteínas de la envoltura viral y exotoxinas bacterianas (92). Preferentemente reconoce un sitio de escisión con secuencia Arg-Xaa-(Lis/Arg)-Arg (158).

Furina es responsable de convertir los precursores proBNP y proCNP en sus formas activas BNP y CNP (91, 98). Ambos precursores contienen la secuencia consenso de reconocimiento por furina en el sitio de escisión proteolítica (91, 159).

2.4.3. NEP

NEP (también conocida como neprilisina) es una metalopeptidasa integral de membrana tipo II, concretamente una endopeptidasa dependiente de zinc unida a membrana que hidroliza péptidos en la secuencia amino de residuos hidrofóbicos (160, 161).

El gen que codifica NEP (*MME*) se localiza en el cromosoma 3 (3q25) y contiene 24 exones y 23 intrones (162). Codifica una proteína de 749 aminoácidos formada por un corto dominio N-terminal citoplasmático, una única hélice transmembrana y un gran dominio extracelular C-terminal que contiene el sitio activo (163) (Figura 13).

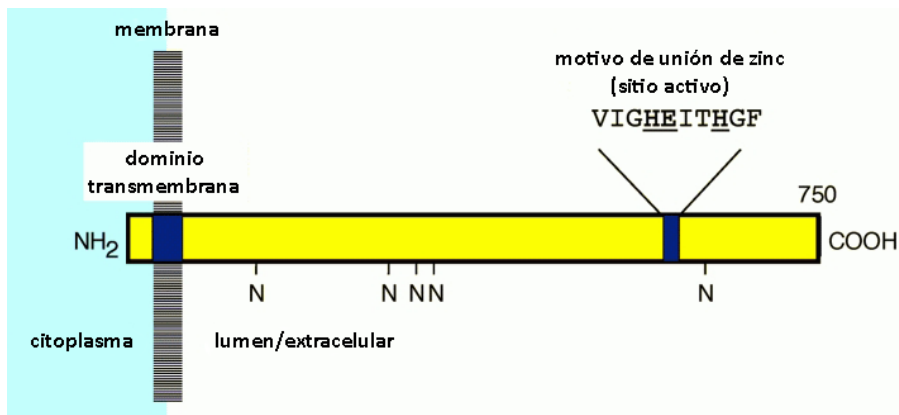


Figura 13. Representación esquemática de la estructura primaria de la endopeptidasa neutra (NEP). N, sitios de N-glicosilación. (Modificada de Saito & Nakahara 2000 (164)).

Esta endopeptidasa está ampliamente expresada en tejidos de mamíferos como riñón, pulmón, células endoteliales, células vasculares del músculo liso, miocitos, fibroblastos, neutrófilos, adipocitos, testículos y cerebro,

encontrándose las concentraciones más elevadas en el túbulo renal proximal, sin embargo, su expresión no es ubicua (165, 166).

NEP es una enzima con gran cantidad de sustratos, es importante en el procesado y catabolismo de péptidos vasoactivos y péptidos implicados en diuresis y natriuresis como los PN, angiotensina I, bradiquinina y endotelina-1 (167-169). Además, tiene muchos otros sustratos incluyendo péptidos opioides, péptidos implicados en la regulación de la inflamación, β -proteína amiloide y gastrina (166).

NEP inactiva los tres PN humanos; tiene una afinidad mayor por CNP que para ANP, y la afinidad por BNP es muy inferior a la de los otros dos péptidos (170).

2.5. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

Los PN y sus receptores median una amplia gama de efectos fisiológicos, desde el control de la presión arterial hasta la osificación endocondral. Esta variedad de respuestas se logra a partir de las acciones individuales de los PN interactuando con receptores específicos guanilil ciclasa.

La unión de ANP a NPR1 es una vía de señalización clave que regula la presión arterial normal homeostática. La disminución de la presión arterial dependiente de NPR1 se logra a través de la natriuresis y diuresis, vasodilatación, aumento de la permeabilidad del endotelio y antagonismo del sistema renina-angiotensina (76) (Figura 14). Los PN disminuyen la resistencia vascular periférica y bajan la presión sanguínea, en parte por la reducción de la precarga causada por la extravasación de fluido al

compartimento extravascular, aumento de la capacidad venosa y natriuresis, lo que a su vez reduce el volumen extravascular (como resultado del efecto directo de los péptidos sobre el riñón y la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona) (171-173).

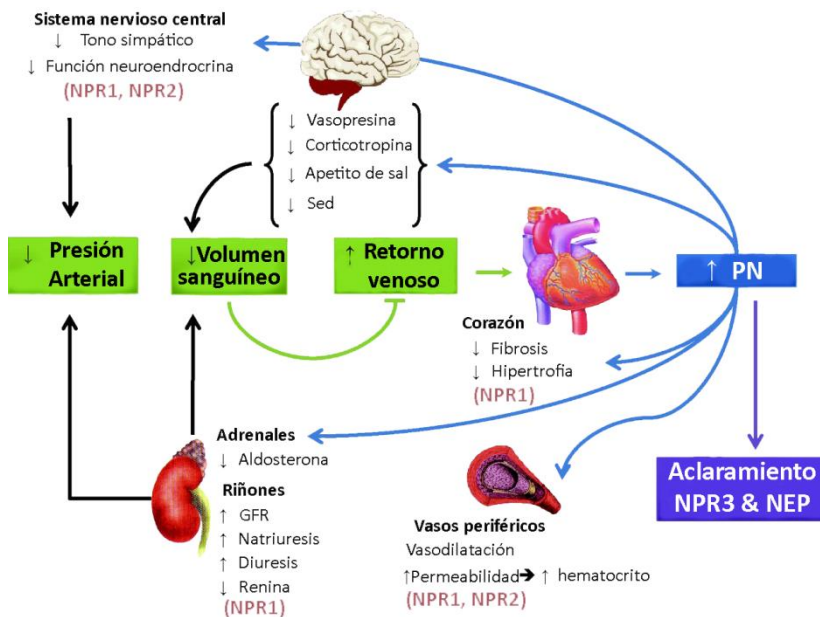


Figura 14. Principales efectos fisiológicos de los péptidos natriuréticos en respuesta a un cambio agudo en el volumen sanguíneo. GFR, índice de filtración glomerular; PN, péptidos natriuréticos; ↑, incremento; ↓, disminución. (Modificada de Moro & Lafontan 2013 (174)).

El aumento en el flujo renal sanguíneo se debe a dos mecanismos, primero estimula la dilatación de las arteriolas renales aferentes y la constricción de las arteriolas eferentes; lo cual lleva a un aumento de la presión dentro de los capilares glomerulares, este aumento en la presión va a provocar un aumento en la filtración glomerular. El segundo mecanismo de acción es debido a que los péptidos aumentan la concentración de GMPc en las

células mesenquimales, lo cual las relaja y aumenta el área de superficie efectiva para la filtración (172).

La natriuresis responde a diversos mecanismos regulados por los PN: 1) aumento de sodio en el túbulo colector de la médula renal a través de un descenso de la hipertonicidad medular interna; 2) efecto inhibitorio de la captación de Na⁺; y 3) estimulación de la secreción de Na⁺ y Cl⁻ en el túbulo colector medular (175-177). El ANP y BNP también inhiben la inducción del transporte de sodio y agua en el túbulo flexuoso proximal por angiotensina II, el transporte de agua por el antagonismo de vasopresina en el túbulo colector, y las acciones de aldosterona en el túbulo distal (178, 179). Finalmente, inducen el aumento del aporte de sodio a la mácula densa inhibiendo la secreción de renina y angiotensina II.

Además, los PN limitan potencialmente la proliferación miocárdica o la hipertrofia, regulando localmente el remodelado cardíaco (Figura 14). Mientras la activación de NPR1 por ANP/BNP inhibe la hipertrofia cardíaca, principalmente a través de mecanismos que dependen de GMPc (180, 181), el remodelado está regulado tanto por ANP/BNP/NPR1 como CNP/NPR2 (182, 183), que inhibiendo el crecimiento de fibroblastos cardíacos, retardan la deposición de colágeno y el remodelado proliferativo del corazón (175).

Todos los PN y sus receptores han sido encontrados en el cerebro, donde CNP y NPR2 son particularmente abundantes. Las acciones que realizan refuerzan sus acciones periféricas: inhiben el consumo de agua (184) y suprimen el apetito de sal (185) que complementan los efectos diuréticos renales, disminuyen la liberación de arginina-vasopresina por el hipotálamo

(186) y reducen la actividad simpática en el tronco cerebral (187, 188) (Figura 14).

La función más conocida de CNP/NPR2 es la estimulación del crecimiento de los huesos largos (189-191), regula muchos tipos de células óseas pero su principal objetivo son los condrocitos. Las mutaciones de NPR2 podrían tener un efecto significativo en la estatura de la población general (192).

Los tres receptores también se expresan abundantemente en pulmón, así ANP estimula la dilatación de las vías respiratorias pulmonares y los vasos sanguíneos (72), y CNP también reduce la hipertensión pulmonar (193) y la fibrosis (194).

En los últimos años se está evidenciando el papel de los PN en el metabolismo, siendo reconocidos como los principales reguladores de la homeostasis metabólica, y observándose efectos en órganos metabólicos como el músculo esquelético, la grasa parda y el páncreas (195, 196).

3. EL APARATO DEL GOLGI

3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El aparato de Golgi (AG) fue descubierto en 1898 por Camilo Golgi, estudiando el sistema nervioso con una nueva técnica de tinción desarrollada por el mismo, la tinción de plata (197).

Se trata de un orgánulo presente en todas las células eucariotas. Pertenece al sistema de endomembranas, como el RE, y constituye un centro de compactación, modificación y distribución, siendo el orgánulo responsable de la mayor parte de las modificaciones que sufren los lípidos y las proteínas una vez finalizada su síntesis en el RE (198). Está formado por dictiosomas y estos por cisternas o sáculos aplanados que se encuentran apilados unos encima de otros. Esta pila de cisternas tiene tres regiones definidas (Figura 15):

- Región *cis* Golgi: es la más interna y próxima al RE, del que recibe las vesículas con proteínas que han sido sintetizadas en él.
- Región medial: es una zona de transición.
- Región *trans* Golgi: es la más cercana a la membrana plasmática y donde se empaquetan las vesículas y se envían a su lugar correspondiente.

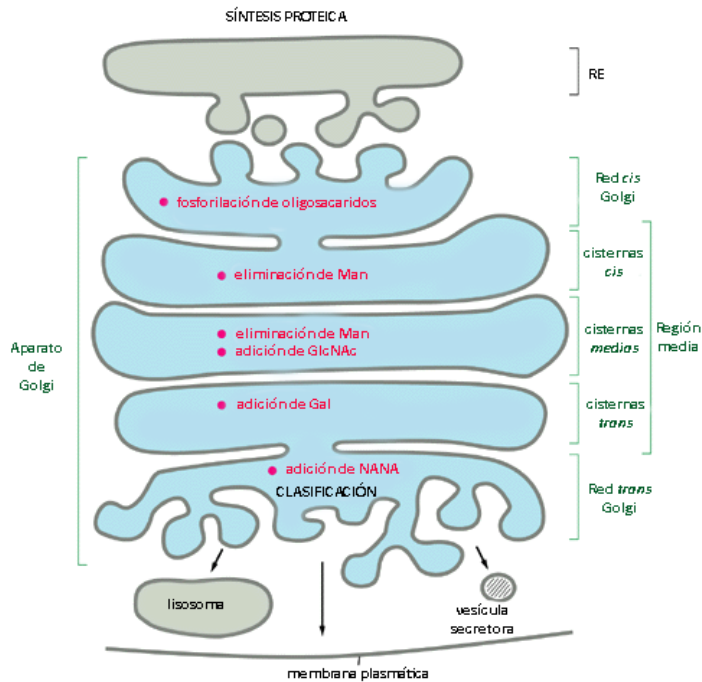


Figura 15. El aparato de Golgi. Compartimentalización funcional. (Modificada de <http://epidemiologiamolecular.com>)

En cada región hay enzimas que modifican las proteínas para ser secretadas o las proteínas de membrana de forma diferente, dependiendo de sus estructuras y destinos finales.

Además del transporte y la distribución celular de las moléculas sintetizadas en el RE y su modificación (glicosilación, fosforilación, sulfatación, proteólisis...), el AG tiene un importante papel en la regeneración de la membrana plasmática por fusión de vesículas, formación de lisosomas primarios, formación del acrosoma en los espermatozoides, polaridad de la célula y control del ciclo celular (199, 200).

3.2. SECRECIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

Tras la síntesis proteica en el RE, las proteínas correctamente plegadas y ensambladas son empaquetadas en vesículas recubiertas de COPII. Las cubiertas se desprenden poco después de que las vesículas se hayan formado, y las vesículas se fusionan formando una estructura llamada agregados túbulo-vesiculares. Estas agrupaciones se desplazan hacia el AG, madurando de forma continua. Las proteínas entran por la red *cis* Golgi y salen por la red *trans* Golgi, ambas redes son importantes en las modificaciones y clasificación de las proteínas que determina su destino final (201) (Figura 15).

Una célula capaz de realizar una secreción regulada tiene que separar al menos tres tipos de proteínas antes de abandonar la red *trans* Golgi, las destinadas a los lisosomas, las destinadas a las vesículas de secreción (secreción regulada) y las descargadas inmediatamente en la superficie celular (secreción constitutiva) (201). Las proteínas dirigidas a la membrana celular no requieren ninguna señal particular, mientras que las proteínas destinadas a las vesículas de secreción necesitan de una señal específica (201). Las vesículas se forman a partir de la red *trans* Golgi y liberan su contenido al exterior en cuanto alcanzan la membrana plasmática (liberación constitutiva) o esperan cerca de la membrana hasta que la célula reciba una señal específica para fusionarse (liberación regulada); por ejemplo, estiramiento de la pared auricular causada por el aumento de volumen intravascular (80-82). En ese tiempo las vesículas secretoras maduran y las proteínas de su interior son concentradas y, muchas veces, escindidas a su forma activa justo antes de la secreción (74, 76).

El trabajo de de Bold *et al* sobre natriuresis y diuresis en rata (73) sugirió por primera vez la actividad endocrina de la aurícula cardiaca. Junto con posteriores estudios proporcionó la base para considerar el corazón como un órgano endocrino (202, 203). Específicamente, la secreción de los PN parece depender de la ubicación cardíaca. ANP y BNP son almacenados en las aurículas en gránulos de secreción, mientras que la producción de BNP en el ventrículo está regulado transcripcionalmente en respuesta a estados de estrés cardiaco tales como la sobrecarga de volumen (76). También, ANP en las células ventriculares es secretado rápidamente una vez sintetizado. Se cree que los PN son liberados por una vía secretora constitutiva en el ventrículo, mientras que en la aurícula se almacenan y se liberan por una vía regulada (79).

En este sentido, desde su primera visualización en 1898, el AG ha sido un tema de intensa investigación morfológica. Particularmente, varios estudios en modelos animales han demostrado que su tamaño y complejidad se incrementan en los cardiomiocitos durante la IC (204-206). Además, los gránulos de secreción que contienen PN sufren alteraciones en este síndrome; mientras que disminuyen en aurículas (mostrando una disociación entre la síntesis y liberación), se han encontrado en ventrículo, lo que demuestra la posibilidad de la liberación a través de las dos vías a la vez: constitutiva y regulada (205-207).

Todos estos estudios sugieren que podrían existir alteraciones en el AG como se ha observado en diversas patologías tales como enfermedades neurológicas y musculares, desórdenes del sistema conectivo, hepático y multi-sistema, displasias esqueléticas y retrasos (208). Sin embargo, no hay

estudios en humanos que investiguen las alteraciones del AG en la IC. Dados los interesantes hallazgos en los estudios en modelos animales de IC, es necesario profundizar en el conocimiento de la secreción de los PN en la IC humana, tanto en las diferentes vías de liberación entre aurícula y ventrículo, como en las posibles alteraciones en sus componentes, morfológicas, o de otro tipo, que puedan ser causa o consecuencia de este síndrome.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El papel de los péptidos natriuréticos en la insuficiencia cardiaca está bien establecido (209-211), utilizando sus concentraciones en plasma para ayudar en el diagnóstico, pronóstico y también para determinar la gravedad de este síndrome, específicamente ANP y BNP (3, 211-214). Sin embargo, mucho menos se conoce sobre la función de CNP y su utilización en la clínica.

Nuestro grupo ha estudiado ampliamente los péptidos natriuréticos en plasma, orina y tejido cardiaco, y su valor en el seguimiento de pacientes con hipertensión e insuficiencia cardiaca (215-219). A pesar de estos resultados y resultados previos de otros autores, la comprensión de su compleja naturaleza aún está lejos de ser completa y exhaustiva, siendo esta información de vital importancia como posible objetivo para nuevos tratamientos que disminuyan la morbilidad y mortalidad de este síndrome. Prueba de ello, es el fármaco combinado aprobado recientemente por la FDA, que actúa sobre la inhibición de la angiotensina II y la neprilisina (220). Además, estudios previos en modelos animales han sugerido que la secreción de los péptidos natriuréticos durante la insuficiencia cardiaca está alterada y, a su vez, el aparato de Golgi presenta cambios morfológicos en este síndrome (204-207).

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo se basa en que podría existir una alteración en la producción tisular de los péptidos natriuréticos y las moléculas relacionadas implicadas en su biología, así como en la secreción de estos péptidos a través de las vesículas del aparato de Golgi en la insuficiencia cardiaca humana.

Analizando un grupo de pacientes sometidos a trasplante cardiaco, diagnosticados de miocardiopatía dilatada e isquémica y sujetos control, se pretende confirmar la hipótesis de esta tesis doctoral mediante los siguientes objetivos:

1. Evaluar los niveles de ARNm de los péptidos natriuréticos (ANP, BNP y CNP) y de las moléculas relacionadas implicadas en su biología (receptores *NPR1*, *NPR2* y *NPR3*; y enzimas de escisión *CORINA*, *FURINA* y *MME*) mediante secuenciación masiva de ARN en tejido ventricular izquierdo.
2. Analizar los niveles proteicos de los péptidos natriuréticos y de las enzimas que los escinden, mediante Western blot, en el ventrículo izquierdo de estos pacientes.
3. Evaluar los niveles de ARNm de los componentes del aparato de Golgi implicados en la secreción vesicular mediante secuenciación masiva de ARN en tejido ventricular izquierdo.
4. Aislar y analizar morfológicamente las vesículas del aparato de Golgi de tejido cardiaco humano y determinar los niveles de péptidos natriuréticos en las vesículas aisladas.
5. Estudiar la relación de los niveles de expresión de estas moléculas y los parámetros de la morfología vesicular con la función ventricular izquierda.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. GRUPOS CLÍNICOS

Las muestras de tejido de ventrículo izquierdo se obtuvieron de 63 pacientes caucásicos diagnosticados de IC siguiendo los criterios de la *European Society of Cardiology* y la *American Heart Association* (1-3), que habían sido sometidos a trasplante cardiaco en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. El 52% de los pacientes presentaban MCD no isquémica (n=33) y el 48% MCI (n=30), además contábamos con 10 muestras control (CNT) de donantes no enfermos.

Todos los donantes CNT tenían función ventricular izquierda normal (FE >50%) determinada por ecocardiografía y carecían de antecedentes de enfermedad cardiovascular o infección activa en el momento del trasplante. Los corazones CNT fueron considerados no aptos para trasplante cardiaco, bien por el tipo de sangre o por incompatibilidad de tamaño. La causa de la muerte fue accidente cerebrovascular (68%) o accidente de tráfico (32%).

Los pacientes fueron sometidos a un estudio pre-trasplante en el servicio de Cardiología del Hospital que incluyó análisis bioquímico y hematológico, radiografía de tórax, ECG, estudio eco-Doppler, estudio hemodinámico y coronariografía. Además, el hospital disponía de la historia clínica de cada paciente con antecedentes personales (hipertensión, DM, dislipemia, eventos cardiacos previos, fecha diagnóstico IC...).

El diagnóstico fue multifactorial, se estableció la etiología en base a un consenso establecido por la OMS junto con la *World Health Federation* (WHF) para la definición de las miocardiopatías (17). Se consideró que la etiología era isquémica si existían episodios previos documentados de

infarto agudo de miocardio, la ecocardiografía mostraba segmentos de contractibilidad normales coexistiendo con otros disquinéticos o aquinéticos y el ECG mostraba signos de isquemia o necrosis miocárdica. En cambio, se diagnosticó MCD no isquémica cuando los pacientes tenían disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (FE <40%) con el ventrículo izquierdo dilatado (diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo (DTDVI) >55 mm) en la ecocardiografía, sin antecedentes de angina de pecho típica o infarto de miocardio, y cuando el ECG no mostró signos de necrosis miocárdica y las coronarias eran normales en la coronariografía. Además ninguno de los pacientes tenía enfermedad valvular primaria existente o historia familiar de MCD.

Todos los pacientes habían sido sometidos a pruebas de esfuerzo y estaban clasificados funcionalmente de acuerdo con los criterios de la *New York Heart Association* (NYHA) (221), en las siguientes clases funcionales:

- ❖ Clase funcional III (NYHA III): los pacientes tienen enfermedad cardiaca que causa una marcada limitación de la actividad física. Se sienten confortables en reposo. La actividad física leve provoca fatiga, palpitaciones, disnea o angina de pecho.
- ❖ Clase funcional IV (NYHA IV): los pacientes presentan enfermedad cardiaca que causa incapacidad para realizar cualquier actividad física sin molestias. Los síntomas de la IC o síndrome anginoso pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza cualquier actividad física el malestar se incrementa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes se encontraban bajo tratamiento farmacológico siguiendo las guías de la *European Society of Cardiology* (1, 3) (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamiento farmacológico de los pacientes.

	MCD (n=33)	MCI (n=30)
IECA (%)	83	80
ARAI (%)	10	15
β-bloqueantes (%)	63	30*
Antagonistas aldosterona (%)	88	70
Digoxina (%)	67	45
Antidiabéticos (%)	17	50*
Diuréticos (%)	92	75
Estatinas (%)	25	80**
Antitrombóticos (%)	63	85
Antiarrítmicos (%)	21	15

MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII, antagonista de los receptores de angiotensina II. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

De las 73 muestras de tejido cardiaco, 32 se utilizaron en el ensayo de secuenciación de ARN (RNA-seq) (MCD, n=12; MCI, n=12; CNT, n=8). En el proceso de validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), se utilizaron 50 muestras de ventrículo izquierdo para mejorar la potencia estadística con un mayor número de pacientes y sujetos CNT (MCD, n=20; MCI, n=20; CNT, n=10). Del mismo modo en el estudio de cuantificación de proteínas se incrementó el número de muestras cardiacas, utilizando un total de 73 (MCD, n=33; MCI, n=30; CNT, n=10). Por otro lado, 15 muestras se utilizaron en el aislamiento de las vesículas de Golgi (MCD, n=7; CNT,

MATERIAL Y MÉTODOS

n=8). Las características clínicas de todos los pacientes según la etiología de la IC se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes según la etiología de la insuficiencia cardíaca.

	MCD (n=33)	MCI (n=30)
Edad (años)	49 ± 13	54 ± 7*
Sexo masculino (%)	77	100
Clase NYHA	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,4
IMC (kg/m²)	25 ± 6	28 ± 4
Hemoglobina (mg/ml)	13 ± 2	14 ± 2
Hematocrito (%)	40 ± 6	41 ± 5
Colesterol total (mg/dl)	143 ± 41	186 ± 51***
Hipertensión previa (%)	27	46
Diabetes mellitus previa (%)	16	54**
Fumadores (%)	67	86
FE (%)	21 ± 8	24 ± 6
FA (%)	11 ± 4	14 ± 4
DTSVI (mm)	65 ± 11	55 ± 8***
DTDVI (mm)	74 ± 11	63 ± 8***
Duración enfermedad (meses)	72 ± 57	44 ± 42

MCD, miocardiopatía dilatada, MCI, miocardiopatía isquémica, NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo. La duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.1. OBTENCIÓN

Las muestras se obtuvieron de corazones explantados procedentes de pacientes sometidos a trasplante cardiaco y CNT sanos. El corazón extraído se introdujo inmediatamente en un recipiente estéril con 0,9% de NaCl a 4°C durante un tiempo medio de $4,4 \pm 3$ horas tras la pérdida de circulación coronaria hasta su almacenamiento a -80°C. Las muestras se tomaron del ápex del ventrículo izquierdo. Mediante tijeras quirúrgicas se cortó un fragmento de aproximadamente 5 cm² (Figura 16) que se introdujo en un tubo con 0,9% de NaCl a 4°C para su transporte. Todas las muestras se obtuvieron con consentimiento informado de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y fue realizado en concordancia con las directrices de la Declaración de Helsinki (222).

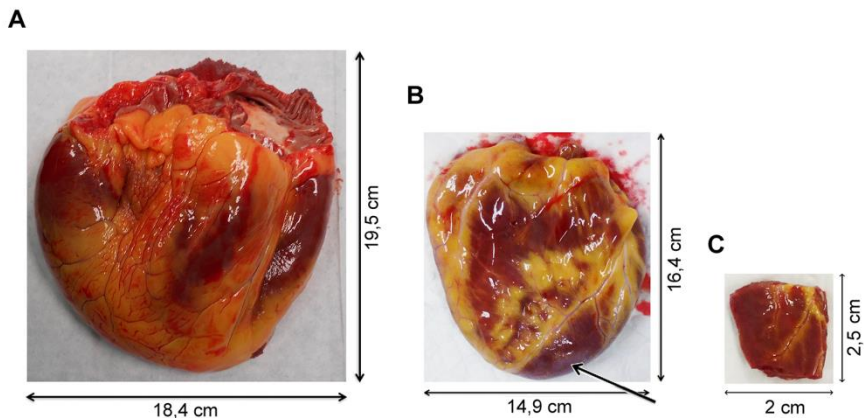


Figura 16. Imágenes de corazones inmediatamente después de la extracción. **A**, corazón con miocardiopatía dilatada. **B**, corazón con miocardiopatía isquémica (la flecha muestra un infarto agudo de miocardio apical anterior). Abundante grasa pericárdica en ambos. **C**, fragmento obtenido del ápex del ventrículo izquierdo de dimensiones aproximadas de 2 x 2,5 x 1 cm.

2.2. PROCESADO Y ALMACENAJE

Una vez en el laboratorio se procedió a la eliminación del epicardio y el endocardio, así como de los músculos papilares. Conservamos la capa de miocardio que se dividió en fragmentos más pequeños para su almacenaje. Todo el procesado de la muestra se realizó en suero fisiológico a 4°C. Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² que se introdujeron en criotubos y fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS

3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Se cortó una fracción de aproximadamente 25 mg de las muestras de ventrículo izquierdo previamente almacenadas a -80°C. Todas las fracciones se homogenizaron mediante tubos *Lysing Matrix D* (MP Biomedicals) diseñados para su uso en el sistema *FastPrep-24* (MP Biomedicals), en un tampón de extracción de proteína total (2% SDS, 10 mM EDTA, 6 mM Tris-HCl, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (25 µl/ml apronitina y 10 µl/ml leupeptina). Se utilizó el programa CY 24x2, realizándose 6 ciclos de 60 segundos a 6,5 m/s. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo a 4°C. Tras la homogenización, se transfirieron los homogenados a tubos estériles de 1,5 ml y se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 5 minutos (*Eppendorf modelo 5415 R*). Finalmente, el sobrenadante se traspasó a tubos estériles de 1,5 ml para la determinación de la cantidad de proteína.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS TOTALES

La valoración cuantitativa de proteínas de cada alícuota se determinó por el método espectrofotométrico de *Lowry*, modificado de *Peterson* (1977) (*Total Protein Kit, Micro Lowry, Sigma Diagnostics*). El método de *Lowry* se basa en que la intensidad de color de la disolución es proporcional a la concentración de proteínas según la Ley de *Lambert-Beer* que se resume en la ecuación:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorptividad molar dependiente de la longitud de onda ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l es la longitud del camino óptico (cm), y C es la concentración de la sustancia (mol/l).

Este método se basa en dos reacciones químicas complementarias (Figura 17): (a) reacción de las proteínas con sulfato cúprico en medio alcalino formando complejos de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico, y (b) reducción del ácido fosfomolibdotungstico, principal componente del reactivo *Folin & Ciocalteu* de color amarillo, por los grupos fenol presentes en las proteínas resultando un color azul intenso.

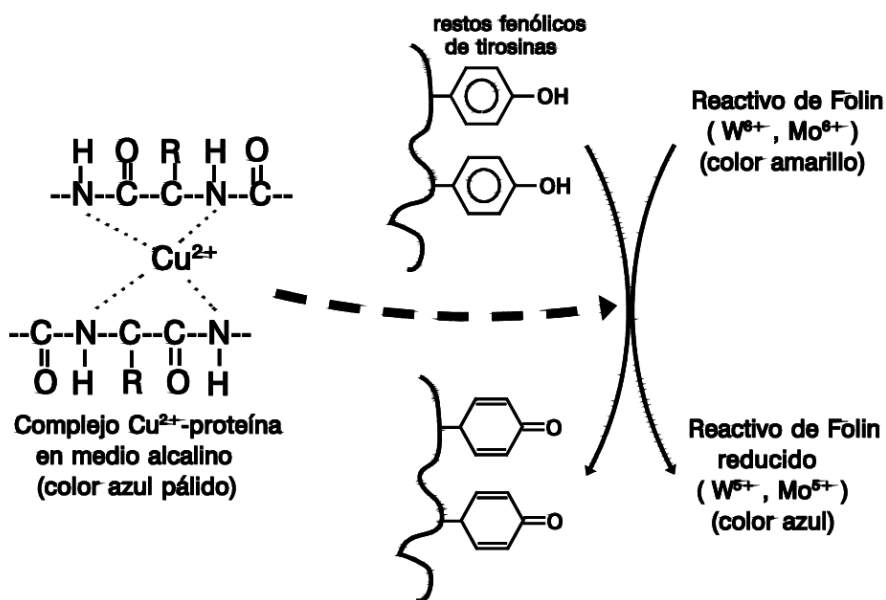


Figura 17. Reacciones químicas en las que se basa el método de Lowry. (Extraída de <http://yunelijo-k.blogspot.com.es>).

La absorbancia se midió a una longitud de onda de 620 nm, utilizando una longitud de onda de referencia de 450 nm. La concentración de proteínas se calculó por la interpolación de la absorbancia en una curva de calibración, utilizando como estándar distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) (223). Después de la determinación proteica se hicieron alícuotas de 60 µl de cada homogenado en tubos estériles de 0,5 ml.

3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS

3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

En primer lugar, las muestras se descongelaron a 4°C y se prepararon para la electroforesis en un volumen final de 25 µl o 15 µl (para geles de 20 o 26 pocillos, respectivamente) cada una de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 4. Preparación de las muestras de acuerdo con el tipo de gel de electroforesis.

	<i>NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel, 4–12% polyacrylamide</i>	<i>NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel, 10% polyacrylamide</i>
Muestra	*	*
<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)</i>	6,25 µl / 3,75 µl	6,25 µl
<i>NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)</i>	-	2,5 µl
Agua bidestilada	**	**

* Volumen de muestra necesario para tener una concentración de proteína de 45 µg/25 o 15 µl. ** Volumen de agua bidestilada necesario para completar el volumen final de 25 o 15 µl.

❖ NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel

Una vez preparadas las muestras se calentaron en un bloque termostático (*Thermolyne Analog High Temp Modular Dri Bath Blocks, Barnstead International*) a 70°C durante 10 minutos. Los geles se introdujeron en una cubeta de electroforesis (*XCell 4 SureLock™ Midi-Cell Runner, Invitrogen*) que contenía tampón de electroforesis MES 1X (*20X NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen*), y a continuación se cargaron los 25 o 15 µl de cada muestra en los pocillos correspondientes del gel, junto con un marcador de peso molecular conocido (*Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard, Invitrogen*. Rango 3,5-260 kDa), en el primer pocillo.

Las proteínas de las diferentes muestras se separaron en un rango de 3,5-260 kDa mediante geles *NuPAGE® Novex Bis-Tris*, geles verticales (13 x 8,3 cm) de poliacrilamida en gradiente (4-12% o 10%) con 20 o 26 pocillos. La separación se realizó según el procedimiento desarrollado por *Laemmli* en 1970 (224). Se utilizaron condiciones de voltaje constantes de 200 V y 200 mA durante 90 minutos a temperatura ambiente.

❖ NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel Reductor

La electroforesis SDS-PAGE separa las proteínas en función de su carga y tamaño, gracias al detergente aniónico SDS. Este detergente desnatura las proteínas eliminando su estructura secundaria y terciaria y aporta una carga negativa proporcional a su masa, pero sin alterar los enlaces disulfuro. Cuando se añade un agente reductor

como el ditioneitol (DTT) o el 2-mercaptoetanol se consigue reducir los enlaces disulfuro, esto se conoce como SDS-PAGE reductora.

Para reducir nuestras muestras añadimos, en su preparación, un décimo del volumen final de agente reductor (*NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X), Invitrogen*). La cubeta de electroforesis contenía tampón de electroforesis MES 1X (20X *NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Invitrogen*) en la cámara exterior y MES 1X con agente antioxidante (1/400; *NuPAGE® Antioxidant, Invitrogen*) en las cámaras interiores. El tratamiento de las muestras y las condiciones de separación fueron las anteriormente explicadas (*NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel*).

Una vez realizadas las electroforesis, los geles se tiñeron con *Coomassie* y se secaron o se sometieron a inmunotransferencia.

3.3.2. Transferencia en seco

Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a un soporte sólido, concretamente a una membrana de PVDF, utilizando el sistema en seco *iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen)*. Este sistema se basa en la transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana mediante un campo eléctrico (electrotransferencia). Para ello, se construye un sándwich con los componentes del sistema como muestra la Figura 18.

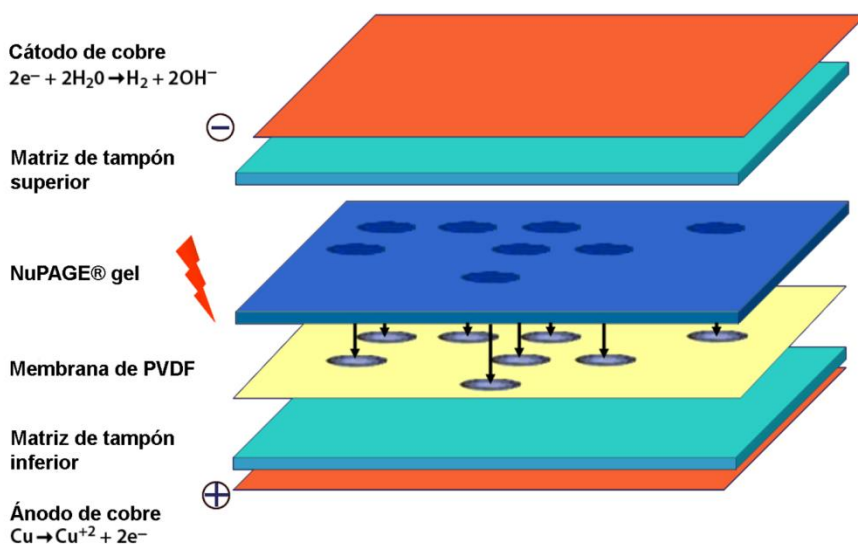


Figura 18. Esquema de la transferencia mediante el sistema en seco *iBlot™ Dry Blotting System*. (Extraída de Invitrogen).

En primer lugar se colocó el *iBlot® Anode Stack* sobre la superficie de la unidad *iBlot® Gel Transfer Device*. La capa de cobre quedó en la parte inferior y en su cara externa se encontraba la membrana de PVDF (0,2 μm). A continuación se colocó el gel extraído de la electroforesis sobre la membrana de PVDF, y sobre él un papel de filtro empapado (*iBlot® Filter Paper*). Se utilizó el *Blotting Roller* para eliminar cualquier burbuja entre el gel y la membrana que pudiera interferir en la transferencia. Después se colocó el *iBlot® Cathode Stack* sobre el papel de filtro, quedando la superficie de cobre en la cara externa. Se volvieron a eliminar las posibles burbujas con el *Blotting Roller*. Por último se colocó una esponja de melamina blanca (*iBlot® Disposable Sponge*), con un fragmento metálico en el extremo superior derecho, en contacto con la tapa de la unidad *iBlot® Gel Transfer Device*. Esta esponja absorbe el exceso de líquido generado durante la transferencia y ejerce una presión uniforme sobre la superficie

del sándwich. Al finalizar la construcción se cierra la tapa de la unidad *iBlot*[®] *Gel Transfer Device* y se elige el programa de transferencia de 20 V con una duración de 10 minutos.

Los *iBlot*[®] *Gel Transfer Stacks* actúan como depósitos de iones que contienen los tampones (ánodo y cátodo) en una matriz gelificada, además contienen los electrodos de cobre (ánodo y cátodo) que se requieren en la transferencia (Figura 18). Este procedimiento minimiza la manipulación y da lugar a un método más preciso. El diseño de la unidad *iBlot*[®] *Gel Transfer Device* reduce la distancia entre los electrodos y el voltaje necesario. Este sistema combinado con la tecnología de la matriz gelificada de los *iBlot*[®] *Gel Transfer Stacks* le permite generar una alta energía y corriente que aumentan la velocidad y reducen el tiempo de transferencia de las proteínas.

Terminada la transferencia los geles se tiñeron con *Coomassie* para comprobar la eficacia de la misma. Y la membrana de PVDF se incubó inmediatamente, para bloquear los sitios de unión inespecíficos, con tampón TBS con 0,05% de Tween (TBS-T) y 1% de BSA (*Tipo V, Sigma*), durante toda la noche a 4°C.

3.3.3. Inmunodetección

El protocolo utilizado para detectar las proteínas transferidas se basó en el descrito por Tobwin *et al* en 1979 (225). En primer lugar se sustituyó la solución de bloqueo en la que se encontraban las membranas por TBS-T con el anticuerpo primario incluido (Tabla 5) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 5. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección (Western blot).

Proteína	Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Corina	Anti-corin monoclonal de ratón	1/100	<i>Abcam</i>
Furina	Anti-furin policlonal de conejo	1/1.000	<i>Abcam</i>
GAPDH	Anti-GAPDH monoclonal de ratón	1/10.000	<i>Santa Cruz</i>
proANP y ANP	Anti-proANP y ANP monoclonal de ratón	1/5.000	<i>RayBiotech</i>
proBNP y BNP	Anti-proBNP y BNP monoclonal de ratón	1/1.000	<i>HyTest Ltd</i>
CNP	Anti-CNP monoclonal de ratón	1/100	<i>Santa Cruz</i>

Después se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos en agitación, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fosfatasa alcalina, 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se utilizaron anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados con fosfatasa alcalina (*Sigma-Aldrich*), a una dilución 1/10.000 en TBS-T con 1% de Nonidet-P40 (*Nonidet™ P 40 Substitute, Sigma-Aldrich*). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T y 3 lavados de 5 minutos con TBS, en agitación.

Para el revelado del antígeno se incubó la membrana con solución de revelado *BCIP/NBT (SigmaFast™BCIP®/NBT Tablet, Sigma-Aldrich)* preparada en el momento de uso (1 tableta + 10 ml de agua bidestilada).

El cloruro de *nitroblue tetrazolium* (NBT) es un compuesto formado por la unión de dos grupos tetrazol con un alto poder oxidante. Se utiliza comúnmente en inmunología para la detección de la actividad fosfatasa alcalina, que se usa como marcador conjugado a un anticuerpo. El 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (BCIP) es un sustrato cromogénico artificial utilizado para la detección colorimétrica sensible a la actividad fosfatasa alcalina, esta enzima hidroliza BCIP a 5-bromo-4-cloro-3-indolil y fosfato inorgánico (226). El bromo-cloro-indol, separado del grupo fosfato, sufre tautomerización y luego es oxidado por el NBT dando lugar a un compuesto insoluble de color violeta intenso (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo White) (Figura 19).

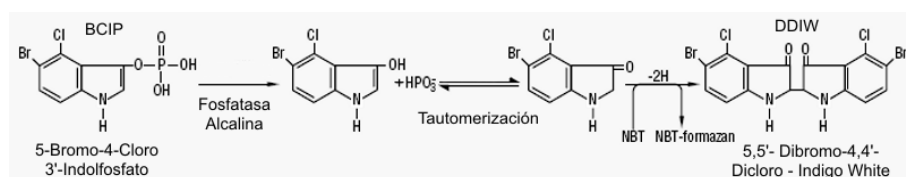


Figura 19. Reacción NBT/BCIP (Extraída de <http://www.lookfordiagnosis.com>).

La reacción se llevó a cabo en total oscuridad durante un máximo de 1 hora. Una vez se visualizaron las bandas se paró la reacción colorimétrica con agua bidestilada. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua bidestilada antes de dejar secar la membrana en papel de filtro durante al menos 24 horas.

Una vez seca, la membrana se digitalizó utilizando una estación de análisis de imagen para aplicaciones colorimétricas y fluorescencia (*DNR Bio-Imaging Systems*), equipado con un software de captura (*Gel Capture*) y de cuantificación de geles y membranas de Western blot (*GelQuant Pro*

v12.2). Los valores obtenidos se normalizaron a GAPDH y finalmente al grupo CNT.

3.3.4. Tinción de geles

Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con el kit de tinción de *Coomassie (Colloidal Blue Staining Kit, Invitrogen)*. El gel se agitó sumergido en la solución de tinción (20% *Stainer A*, 5% *Stainer B* y 20% metanol) durante un mínimo de 3 horas y un máximo de 12 horas. A continuación, se lavó con agua bidestilada, para eliminar el exceso de tinción, en agitación suave durante al menos 7 horas y un máximo de 3 días; o hasta que no se apreciaron cambios en la intensidad de las bandas.

3.3.5. Secado de geles

Los geles se secaron mediante el sistema *Gel Drying Frames* (24 x 24 cm, *Diversified Biotech*). En primer lugar, se sumergieron en solución de secado (20% etanol y 10% glicerol) durante 30 minutos en agitación suave. Al mismo tiempo se empaparon dos hojas de papel celofán en agua bidestilada durante unos segundos, no más de 2 minutos, y se colocó una de ellas sobre el soporte de plástico evitando la formación de burbujas. Después se colocó el gel con unas gotas de solución de secado y, sobre él, el otro papel celofán, formando un sándwich y evitando, de nuevo, la formación de burbujas. A continuación, se fijó el otro soporte de plástico (tipo marco de ventana) y se mantuvo en posición vertical de 12 a 36 horas, para eliminar el exceso de humedad. Finalmente, se desmontó la estructura y el gel se colocó bajo una superficie pesada durante varios días para prensarlo.

3.4. AISLAMIENTO DE LAS VESÍCULAS DEL APARATO DE GOLGI

El aislamiento de las vesículas del AG se realizó modificando el método descrito por Graham & Winterbourne (227) y adecuándolo al tejido cardíaco humano. Todos los pasos del aislamiento se llevaron a cabo a 4°C. En primer lugar, se cortó en pequeñas piezas (1 mm³) un fragmento de aproximadamente 100 mg de ventrículo izquierdo previamente almacenado a -80°C. El tejido se homogenizó en tampón (0,25 M de sacarosa, 10 mM Tris-Cl, pH 7,4) utilizando un homogeneizador de vidrio (*Potter-Elvehjem*) a 2.000 rpm, 15 pulsos. Los homogenados se traspasaron a tubos *Eppendorf* de 1,5 ml y se centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos (*Eppendorf modelo 5415 R*) para obtener y reservar el pellet nuclear. Los sobrenadantes se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos para obtener y reservar el pellet de la fracción mitocondrial pesada, y se volvió a centrifugar de nuevo a 17.000 g durante 20 minutos para obtener el pellet de la fracción mitocondrial ligera. A continuación este pellet se resuspendió por homogeneización suave en 1,55 M de sacarosa con 10 mM-Tris-Cl, pH 7,4. Las vesículas de Golgi se aislaron por flotación a través de un gradiente de sacarosa discontinuo usando 1,33 M, 1,20 M, 1,10 M, 0,77 M y 0,25 M de sacarosa (todas las soluciones contenían 10 mM Tris-Cl, pH 7,4), centrifugando a 150.000 g durante 1 hora (*Optima™ L-100 K Preparative Ultracentrifuge, Beckman Coulter*). Las vesículas se recogieron y se diluyeron con 2 volúmenes de 10 mM Tris-Cl, pH 7,4, finalmente se centrifugaron a 10.000 g durante 20 minutos. El pellet se resuspendió en Tris-Cl 10 mM para la determinación proteica o se procedió a su fijación para la inclusión en Epon.

La concentración proteica de cada una de las muestras se determinó mediante el método espectrofotométrico de *Lowry* descrito en el Apartado 3.2 de Material y Métodos.

Se realizó la cuantificación de proteínas específicas en estas vesículas como se describe en el Apartado 3.3 de Material y Métodos. Los anticuerpos primarios utilizados en este caso son los descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección (Western blot).

Proteína	Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
ANP	Anti-ANP monoclonal de ratón	1/50	<i>Santa Cruz</i>
BNP	Anti-BNP monoclonal de ratón	1/500	<i>HyTest Ltd</i>
CNP	Anti-CNP monoclonal de ratón	1/50	<i>Santa Cruz</i>
GM130	Anti-GM130 monoclonal de conejo	1/500	<i>Abcam</i>
Nucleolina	Anti-nucleolin monoclonal de ratón	1/250	<i>Merck Millipore</i>

3.5. INMUNOCITOQUIMIA

3.5.1. Inclusión en resinas Epon 812

Las vesículas aisladas de Golgi se fijaron en tampón cacodilato 0,1 M con 2% de glutaraldehído y 1% de paraformaldehído durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se lavaron con tampón cacodilato 0,1 M y se incubaron en una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 2% durante 3 horas a 4°C en oscuridad. Después los fragmentos se incubaron con una solución de

acetato de uranilo al 2% durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se deshidrataron en una batería de acetonas de gradación creciente (25, 50, 75, 90, 95 y 100%) a 4°C.

La inclusión se llevó a cabo embebiendo los fragmentos en mezclas sucesivas de Epon-acetona (proporción 1:3, 1:1 y 3:1, respectivamente) de 1 hora cada uno a 4°C. Después, tres inclusiones en Epon puro, la primera durante 1 hora y las siguientes durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, una última inclusión en Epon de un mínimo de 48 horas a 60°C.

3.5.2. Corte y tinción de rejillas de cobre

Se obtuvieron secciones ultrafinas de aproximadamente 80 nm en un ultramicrotomo (*Leica EM UC6*) y se montaron sobre rejillas de cobre con película *Formvar*[®]. Al día siguiente, las secciones se tiñeron primero con 1% de acetato de uranilo (2% uranilo, etanol 100°) durante un minuto en oscuridad y, después de lavarse con agua bidestilada, con 2,7% de citrato de plomo (citrato sódico dihidrato 0,2 M; nitrato de plomo 0,08 M; NaOH 1 M) durante 1 minuto (228, 229). Una vez lavadas y secas, las rejillas se conservaron hasta su análisis por microscopía electrónica de transmisión.

3.5.3. Análisis estereológico mediante microscopía electrónica de transmisión

Para la observación mediante microscopía electrónica de transmisión se utilizó un sistema JEOL (modelo JEM-1010) con aumentos en un rango de X4.500-25.000. Las micrografías que contenían las vesículas se obtuvieron mediante una selección sucesiva de secciones usando un muestreo aleatorio uniforme sistemático (230). Se realizó un análisis estereológico de

las micrografías para cuantificar la densidad numérica y analizar la morfología de las vesículas mediante el programa iTEM FEI (v 5.0, 2008, Olympus Soft Imaging+ Solutions GmbH). En primer lugar, se midió el perímetro de las vesículas utilizando la aproximación de Ramanujan para el perímetro de la elipse.

$$\text{Perímetro} \sim \pi \cdot \left[3 \cdot (r_{\text{menor}} + r_{\text{mayor}}) - \sqrt{(3 \cdot r_{\text{menor}} + r_{\text{mayor}}) \cdot (r_{\text{menor}} + 3 \cdot r_{\text{mayor}})} \right]$$

El cálculo del perímetro de una elipse requiere de integrales elípticas de segunda especie. Sin embargo, el matemático indio Ramanujan dio una expresión sencilla que se aproxima razonablemente a la longitud de la elipse.

El área se determinó de acuerdo a la expresión:

$$\text{Área} \sim \pi \cdot r_{\text{menor}} \cdot r_{\text{mayor}}$$

Finalmente el coeficiente de forma se determinó según la expresión (231):

$$CF = 4 \cdot \pi \cdot \frac{\text{área}}{(\text{perímetro})^2}$$

Basándonos en estudios previos (232, 233), analizamos vesículas que tenían una membrana definida y con un contenido electrodenso menor al 50%, excluyendo cuerpos multivesiculares y con doble membrana.

Analizamos, además, la reproducibilidad de las medidas. La variabilidad inter-observador se calculó a partir del análisis al azar de 500 vesículas por dos observadores, cada uno de ellos cegado a los resultados obtenidos por

el otro, para las medidas de número, área y coeficiente de forma de las vesículas. La variabilidad intra-observador se calculó en igual número de vesículas analizadas por el mismo observador en dos días consecutivos para las medidas de número, área y coeficiente de forma de las vesículas.

3.6. EXTRACCIÓN DE ARN

3.6.1. Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó con el kit de extracción *RNeasy® Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se cortó una fracción de aproximadamente 30 mg de las muestras de ventrículo izquierdo previamente almacenadas a -80°C y se introdujeron en tubos *Lysing Matrix D* que contenían 300 μl de tampón RLT (contiene isotiocianato de guanidina para la lisis) y 3 μl de β -mercaptoetanol a 4°C . Se utilizó el programa MP 24x2 del sistema *FastPrep-24*, 8 ciclos de 30 segundos a 6,5 m/s. Después se centrifugaron 1 minuto a 13.000 rpm (*centrífuga Eppendorf modelo 5415 R*) para bajar la espuma, se añadieron 590 μl de agua libre de RNasas (*UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen*) y 10 μl de proteinasa K y se incubó a 55°C durante 10 minutos. Tras centrifugar 3 minutos a 10.000 g se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió la mitad del volumen recuperado de etanol 96°, mezclando por inversión. Se pasó todo el volumen por tubos *mini column* que contienen una membrana de sílice donde queda adherido el ARN. La columna se lavó con 350 μl de tampón RW1 y las trazas de ADN se eliminaron con un tratamiento de DNasa disuelto en tampón RDD. Se volvió a lavar una vez con 350 μl de tampón RW1 y dos veces con tampón RPE, de

esta forma se eliminaron los restos de DNasa y cualquier contaminante que pudiera haber. Finalmente el ARN se eluyó con 35 µl de agua libre de RNasas y se conservó a -80°C.

La concentración de ARN se evaluó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 2000* y la calidad se evaluó mediante una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*). Todas las muestras de ARN alcanzaron un mínimo *RNA Integrity Number (RIN)* de 7,0, en un rango entre 7,0 y 9,4 (Figura 20).

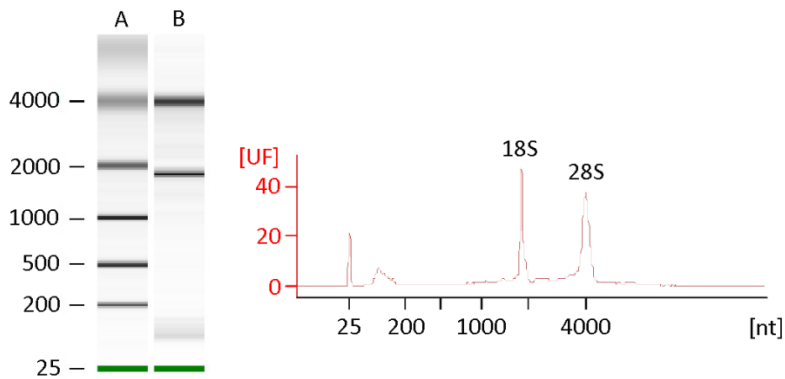


Figura 20. Ejemplo de la calidad de un ARN con un RIN de 9,4. El ejemplo muestra el gel de ARN (izquierda) con el marcador (A) y la muestra (B); y su correspondiente electroferograma (derecha), donde se aprecian los picos correspondientes a las subunidades 18S y 28S. UF, unidades de fluorescencia; nt, nucleótidos.

3.6.2. Tratamiento con DNasa y precipitación de ARN total

El ARN total se sometió a un segundo tratamiento con DNasas para eliminar cualquier traza de ADN persistente. Para ello, se incubó 1 µg de ARN total de todas las muestras con DNasa (*Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, Sigma-Aldrich*) a temperatura ambiente durante 10 minutos y,

posteriormente, se realizaron 3 extracciones consecutivas: dos con fenol-cloroformo (*Phenol:Chloroform 5:1, Sigma-Aldrich*) y una final con cloroformo isoamílico (*Chloroform - isoamyl alcohol mixture, FLUKA, Sigma-Aldrich*). A continuación se precipitó el ARN con etanol 100° y glicógeno (*Glycogen from Mytilus edulis, Sigma-Aldrich*) a -20°C durante toda la noche.

Para la resuspensión se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 45 minutos a 4°C. A continuación se lavó el pellet con etanol 70° y se dejó secar 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en hielo en 10 µl de agua libre de RNasas durante al menos 1 hora y se conservó a -80°C hasta su uso en la RT-qPCR.

3.6.3. Extracción de ARN poli(A)

La homogenización del tejido se llevó a cabo con el ensayo comercial *Tri[®] Reagent (Sigma-Aldrich)*. Se cortó una fracción de aproximadamente 25 mg de las muestras de ventrículo izquierdo previamente almacenados a -80°C y se homogenizó en presencia del tampón TRI, que contiene isotiocianato de guanidina y fenol, mediante el homogenizador *TissueLyser LT (Qiagen)* con bolas de carburo de tungsteno de 3 mm.

Las extracciones de ARN se realizaron con el kit *PureLink™ RNA (Ambion, Life Technologies)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar se añadió el mismo volumen de etanol 70°, mezclando por inversión, y se pasó todo el volumen por tubos *spin Cartridge* que contienen una membrana de sílice a la cual se adhiere el ARN. La columna se lavó con 700 µl de tampón de lavado I y dos veces con 500 µl de tampón

de lavado II para eliminar cualquier impureza. Finalmente, el ARN se eluyó con 35 μ l de agua libre de RNasas y se conservó a -80°C .

La concentración de ARN se evaluó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* y la pureza e integridad de las muestras se evaluó mediante una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*) con el kit *RNA 6000 Nano LabChip®*. Todas las muestras presentaron una proporción 260/280 mayor de 2,0 y alcanzaron un RIN mayor de 9 (Figura 20).

El ARN Poli(A) se aisló partiendo de 25 μ g de ARN mediante el kit *MicroPoly(A) Purist™ (Ambion by Life Technologies)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar se unió cada muestra de ARN a una celulosa de Oligo(dT). Para ello se transfirió la muestra de ARN a un tubo que contenía la celulosa de Oligo(dT) y se mezcló por inversión para resuspender completamente la resina. A continuación se calentó la mezcla durante 5 minutos a 65°C , esto desnaturaliza la estructura secundaria y maximiza la hibridación entre las secuencias poli(A) del ARN y las secuencias poli(T) de la resina. Se facilitó esta unión con la incubación en balanceo constante a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se precipitó la resina y se lavó para eliminar la muestra no unida específicamente y el ARN ribosomal.

Finalmente, se recuperó el ARN poli(A) con la solución de almacenamiento previamente calentada a 70°C . Este ARN se precipitó con acetato de amonio 5 M, glicógeno y etanol 100° ; se lavó con etanol y se resuspendió en solución de almacenamiento. El ARN poli(A) se conservó a -80°C hasta su uso en el análisis de secuenciación de ARN.

3.7. RETROTRANSCRIPCIÓN A ADNc

La *Taq* polimerasa (producida por la bacteria *Thermus aquaticus*) es un tipo de ADN polimerasa termoestable, utilizada en las técnicas de PCR. El ARN no es un sustrato adecuado para esta polimerasa, además es menos estable que el ADN. Por ello, es necesario retrotranscribir el ARN a moléculas de ADN antes de iniciar la amplificación por PCR. La retrotranscripción o transcripción reversa es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN usando para ello la enzima transcriptasa reversa (Figura 21). El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN y puede ser amplificado por la *Taq* polimerasa.

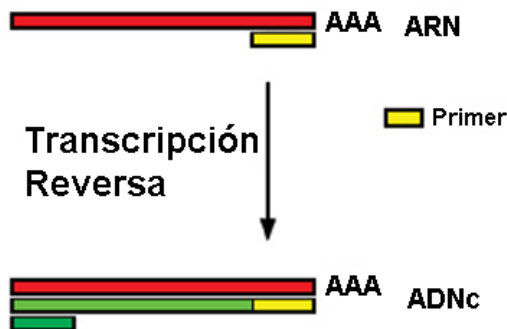


Figura 21. Transcripción reversa. (Modificada de <http://www.aun.edu.eg>).

Para llevar a cabo la reacción se incubó un mix de cada muestra (10 μ l de ARN, 1 μ l de *random primers*, 1 μ l de *dNTPs Mix* 10 mM; *Invitrogen*) a 65°C durante 5 minutos, al que se le añadió 4 μ l de tampón *FS* 5X, 2 μ l de *DTT* 0,1 M y 1 μ l de *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (*Invitrogen*). Se incubó a 37°C durante 2 minutos y se le añadió inmediatamente 1 μ l de

la transcriptasa reversa (*M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen*). Se realizaron dos incubaciones, una a 25°C durante 10 minutos y otra a 37°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo el ADNc se almacenó a -20°C inmediatamente.

Paralelamente se realizó el mismo protocolo con las muestras de ARN pero sin transcriptasa reversa, con 1 µl de agua libre de RNasas. De esta forma teníamos un control negativo que nos revelaría la contaminación por ADN. Estas muestras también se congelaron inmediatamente después de las incubaciones a -20°C.

3.8. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

La RT-qPCR es una variante de la PCR convencional que se utiliza para la amplificación y cuantificación absoluta del producto de la amplificación. Esta técnica monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en el que ocurre a través de la fluorescencia. El termociclador alberga sensores para medir la fluorescencia que emite un fluoróforo al excitarlo a la longitud de onda adecuada, esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADNc en estudio (234). Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo (*Ct, cycle threshold*) deben ser determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del *background* en la fase exponencial de la reacción de la PCR, es decir, el valor *Ct* está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (235).

Para llevar a cabo la RT-qPCR se preparó un mix para cada muestra con 3 μ l de ADNc (de una dilución 1/20 previamente preparada), 10 μ l de *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*[®]), 1 μ l de la sonda *TaqMan*[®] correspondiente (Tabla 7) y 6 μ l de agua libre de RNasas, para un volumen final de 20 μ l. Utilizamos el termociclador *ViiATM 7 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 7. Sondas utilizadas en la RT-qPCR.

GEN	SONDA
<i>NPPC</i>	Hs00360930_g1
<i>NPPB</i>	Hs00713590_m1
<i>CORIN</i>	Hs00198141_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1
<i>PGK1</i>	Hs99999906_m1
<i>TFRC</i>	Hs00951083_m1

Las sondas *TaqMan*[®] poseen un fluorocromo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (*quencher*). Esta sonda hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR, la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se encuentra con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia que está relacionada con la cantidad de amplicón producido (236) y que se cuantifica

por un software que puede determinar valores Ct mediante un análisis matemático de la curva de crecimiento teniendo así una mejor reproducibilidad en la RT-qPCR (Figura 22).

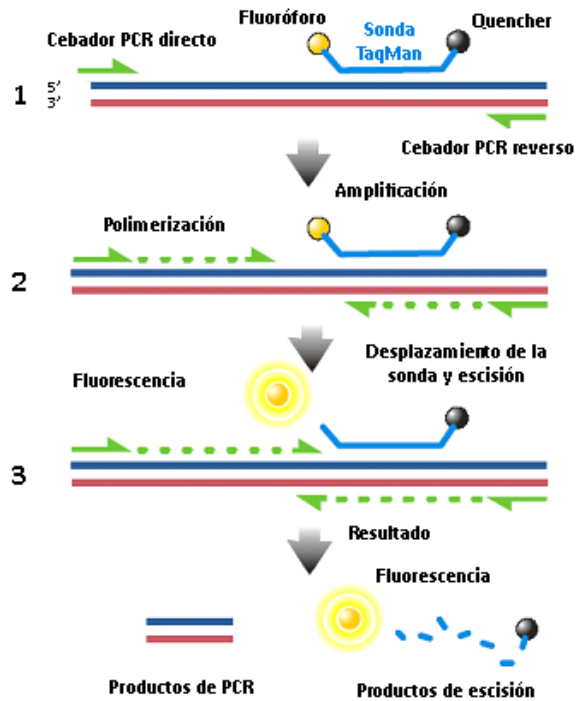


Figura 22. RT-qPCR utilizando sondas TaqMan®. (1) Sonda TaqMan® intacta, no hay fluorescencia debido a la cercanía del fluoróforo y el quencher. (2) La sonda y la cadena de ADNc se hibridan pero la fluorescencia todavía está *apagada*. (3) Durante la PCR, la Taq polimerasa hidroliza la sonda por su actividad exonucleasa 5'-3', lo que provoca la separación del fluorocromo y el quencher, y por tanto la emisión de fluorescencia. (Modificada de epidemiologiamolecular.com).

3.9. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN DE ARN

3.9.1. Técnica de RNA-seq

El transcriptoma, conjunto completo de las transcripciones de una célula, y su cantidad son dinámicos, siendo específico de cada etapa del desarrollo o condición fisiológica. El RNA-seq es una herramienta transcriptómica fundamentada en la secuenciación masiva de ADNc que utiliza las capacidades de la secuenciación de próxima generación (NGS) para mostrar una reproducción de la presencia y la cantidad de ARN de un genoma determinado en un momento concreto; incluyendo ARNm, ARNt, ARNr y otros ARN no codificantes. La evolución de la NGS permite una mayor cobertura de bases de la secuencia de ADN, así como mayor rendimiento, proporcionando de decenas a cientos de millones de lecturas de secuencia e información sobre miles de millones de bases individuales. De esta forma se estudian solo las regiones que se están transcribiendo y proporciona una forma eficiente de medir niveles de expresión génica, identificar eventos de *splicing* alternativo y de fusión génica e identificar variaciones de un solo nucleótido (SNV) de manera simultánea. Además, también permite la secuenciación de muestras de ARN de *novo*, sin requerimiento previo de un genoma de referencia (237).

Para secuenciar el ARN, en primer lugar se debe preparar una librería del transcriptoma completo, donde la obtención de muestras de ARNm de alta calidad es la parte más crítica. Algunos ARN abundantes, como el ARNr, pueden comprender hasta el 80% del ARN total. La secuenciación de estos ARN puede reducir la cobertura de secuencia, disminuyendo la detección de especies de ARN menos abundantes. Para eliminar la abundancia de

ARNr se usan kits comerciales para captura de poli(A) (como se describe en el Apartado 3.6.3 de Material y Métodos) u otros métodos de hibridación o degradación enzimática, enriqueciendo la muestra en ARNm. De esta forma, las muestras de ARN poli(A) almacenadas a -80°C fueron utilizadas para generar librerías del transcriptoma completo para la secuenciación en la plataforma *SOLiD 5500XL* (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 23).

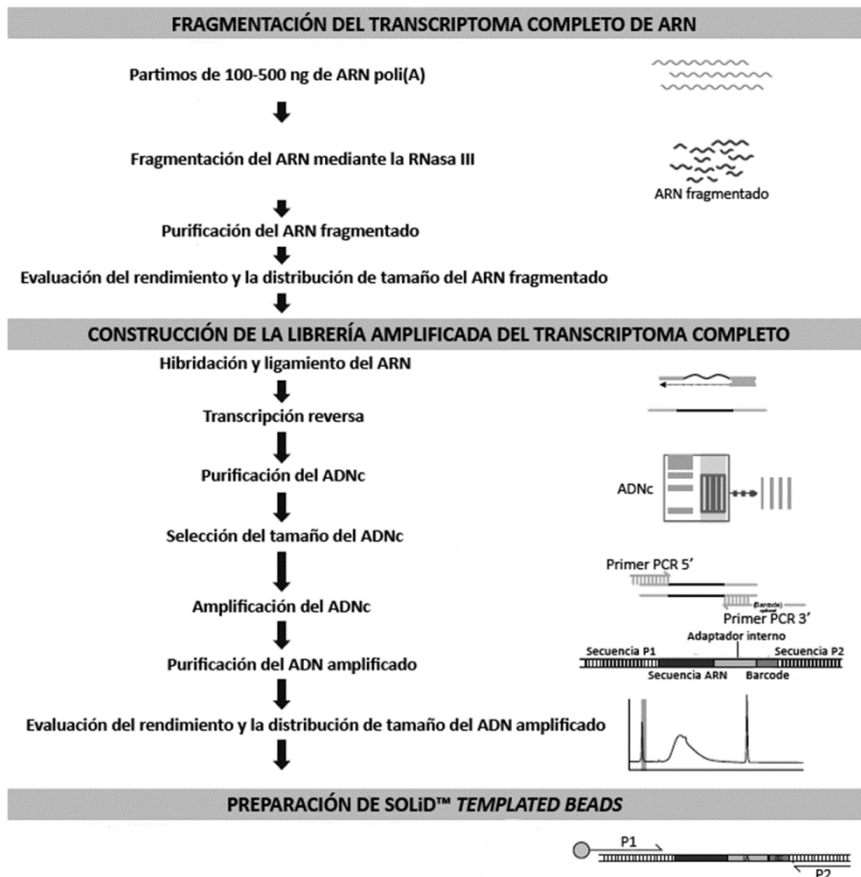


Figura 23. Esquema de la construcción de la librería del transcriptoma completo. (Modificada de Applied Biosystems).

3.9.2. Fragmentación del transcriptoma completo de ARN

❖ Fragmentación del ARN mediante la RNasa III

Para la construcción de la librería de ADNc con tamaños de inserción adecuados para la secuenciación de *SOLiD™*, es necesario la fragmentación del ARN poli(A) antes de proceder a la ligación. Para ello se preparó, a 4°C, una reacción para cada muestra de ARN (100-500 ng) con 1 µl de tampón *RNase III* 10X, 1 µl de *RNase III* y agua libre de nucleasas hasta completar los 10 µl. Esta reacción se incubó en un termociclador a 37°C durante 10 minutos. Inmediatamente después de la incubación, se añadieron 90 µl de agua libre de nucleasas. La digestión con *RNase III* deja grupos 5' fosfato y 3' hidroxilo en los fragmentos de ARN resultantes que pueden usarse directamente en las reacciones de hibridación y de ligación. Esta fragmentación proporciona comodidad y robustez para el análisis integral del transcriptoma utilizando el sistema *SOLiD™*.

❖ Purificación del ARN fragmentado

El ARN fragmentado se colocó a 4°C y, seguidamente, se purificó usando el *RiboMinus™ Concentration Module* (Invitrogen). Este kit enriquece todo el espectro de transcritos de ARN por eliminación de ARN ribosomal; puede eliminar el 95-98% de las moléculas de ARNr humano. Para purificar el ARN se añadieron 100 µl de tampón *Binding* y 250 µl de etanol 100°. A continuación la muestra se cargó en una columna de centrifugación y se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto. El ARN se une a la membrana de sílice presente en esta

columna y las impurezas son lavadas tres o cuatro veces mediante tampón de lavado. Se añadieron 500 μl de tampón de lavado con etanol 100° (1:4), previamente preparado y almacenado a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12.000 g durante un minuto. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad (25.000 g) para eliminar cualquier residuo de tampón de lavado. Por último, se eluyó el ARN con agua libre de RNasas. Para ello se colocó la columna en un tubo de recuperación y se añadieron 12 μl de agua libre de RNasas. La columna y el tubo se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto y se recuperó el ARN.

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

La evaluación del rendimiento del ARN fragmentado se llevó a cabo mediante el kit *Quant-iT™ RNA Assay* en el *Qubit® Fluorometer* (*Invitrogen*) según las instrucciones del fabricante. Para evaluar la distribución de tamaño del ARN fragmentado se diluyó 1 μl de la muestra (1:10) con agua libre de nucleasas y se analizó en el bioanalizador *Agilent 2100* con el kit *RNA 6000 Pico Chip*. Se utilizó el software *2100 expert* para examinar la distribución del tamaño. Se debe obtener, en 3 μl , una concentración ≥ 50 ng de ARN poli(A) y ≥ 100 ng de ARN total empobrecido en ARNr o ≥ 100 ng de ARN control para poder proceder a la construcción de la librería, en el caso contrario la muestra se debe concentrar en una centrifuga de vacío.

3.9.3. Construcción de la librería amplificada del transcriptoma completo

❖ Hibridación y ligamiento del ARN

El primer paso para la construcción de la librería es la hibridación y el ligamiento del ARN. Se transfirieron 5 μ l de tampón de hibridación (2 μ l de *SOLiD™ Adaptor Mix* y 3 μ l de solución de hibridación) a 3 μ l de cada muestra de ARN fragmentado y se incubaron en un termociclador a 65°C durante 10 minutos y a 16°C durante 5 minutos. A continuación se añadieron los reactivos de ligación de ARN (10 μ l de tampón de ligamiento 2X y 2 μ l de mix de enzima de ligamiento) y se incubó en un termociclador a 16°C durante 16 horas.

❖ Transcripción reversa

Para llevar a cabo la transcripción reversa se preparó el mix de todas las reacciones con 11 μ l de agua libre de nucleasas, 4 μ l de tampón RT 10X, 2 μ l de *dNTP Mix* y 2 μ l de *SOLiD™ RT Primer* para cada reacción. La reacción se incubó en un termociclador a 70°C durante 5 minutos y luego se enfrió en hielo. A continuación, se añadió 1 μ l de la transcriptasa reversa *ArrayScript™* a cada muestra y se incubó en un termociclador a 42°C durante 30 minutos.

❖ Purificación del ADNc

El ADNc obtenido se purificó mediante el kit *MinElute® PCR Purification* (*Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfirió todo el ADNc a un tubo *ependorf* de 1,5 ml y se añadieron 60 μ l de agua libre

de nucleasas y 500 μ l de tampón PB. Se cargó el ADNc en una columna *MinElute* y se centrifugó a 13.000 g durante 1 minuto. Después el ADNc se lavó con 750 μ l de tampón PE y se eluyó con 10 μ l de tampón EB.

❖ Selección del tamaño del ADNc

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

A continuación se tiñó el gel durante 5-10 minutos con *SYBR® Gold* y se cortó la región que contenía el ADNc de 150-250 nucleótidos, fragmentándolo verticalmente en 4 piezas de 1 mm X 6 mm aproximadamente. *SYBR® Gold* es una tinción muy sensible para la detección de ADN o ARN de doble o simple cadena en geles electroforéticos, utilizando un transiluminador ultravioleta estándar. Esta tinción es un colorante de cianina asimétrica que se acopla

energéticamente a los ácidos nucleicos, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión de fluorescencia (>1.000 veces). Representa una alternativa a la tinción con bromuro de etidio, más sensible y mucho menos perjudicial para la salud.

❖ Amplificación del ADNc

Antes de la amplificación del ADNc se preparó un mix para cada pieza de gel que contenía 10 µl de tampón de PCR 10X, 8 µl de *dNTP Mix*, 2 µl de *SOLiD™ 5' PCR Primer*, 1,2 µl de ADN polimerasa *AmpliTaQ®* y 76,8 µl de agua libre de nucleasas. Una vez transferido el mix a tubos de 0,2 ml con cada pieza de gel, se añadieron 2 µl de *SOLiD™ 3' PCR Primer*. Se llevó a cabo la reacción de PCR en un termociclador según el programa siguiente:

Tabla 8. Amplificación del ADNc.

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

❖ Purificación del ADN amplificado

Se añadieron 800 µl de tampón de unión a cada tubo y se procedió a la purificación del ADN amplificado con el *PureLink™ PCR Micro kit* (*Invitrogen*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer

lugar se cargó cada muestra en las columnas del kit y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto. A continuación se lavó el ADN con 600 μ l de tampón de lavado y, finalmente, se eluyó dos veces con 10 μ l de tampón de elución.

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

La concentración de ADN purificado se evaluó mediante el espectrofotómetro *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)*. En los casos necesarios se diluyó el ADN a <50 ng/ μ l mediante el kit *DNA 1000 (Agilent)* para una cuantificación precisa. Se usó una plataforma basada en microfluidos (*2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies*) con el kit *DNA 1000 (Agilent)*, y, mediante el software *2100 expert*, se evaluó el rendimiento y la distribución de tamaño: se calculó el porcentaje de ADN de 25-200 pares de bases y se determinó el tamaño medio y la concentración molar de la librería de ADNc.

3.9.4. Preparación de *Templated Beads*

❖ Preparación de la reacción de PCR de emulsión (ePCR)

La ePCR se utiliza para generar muchas copias de la librería de ADNc y, por tanto, aumentar la sensibilidad de la secuenciación, ya que los métodos de secuenciación de una sola molécula no son lo suficientemente sensibles. Se trata de una amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADN en *SOLiD™ P1 DNA Beads* usando un método de emulsión. Las emulsiones se componen de una fase oleosa que contiene emulsionantes y una fase acuosa que contiene

los componentes de la PCR (*template*, cebadores, ADN polimerasa y *SOLiD™ P1 DNA Beads*). La PCR recubre la microesfera con copias clonales (30.000 copias o más) de las moléculas aisladas de ADN y se inmovilizan para después secuenciarlas (Figura 24).

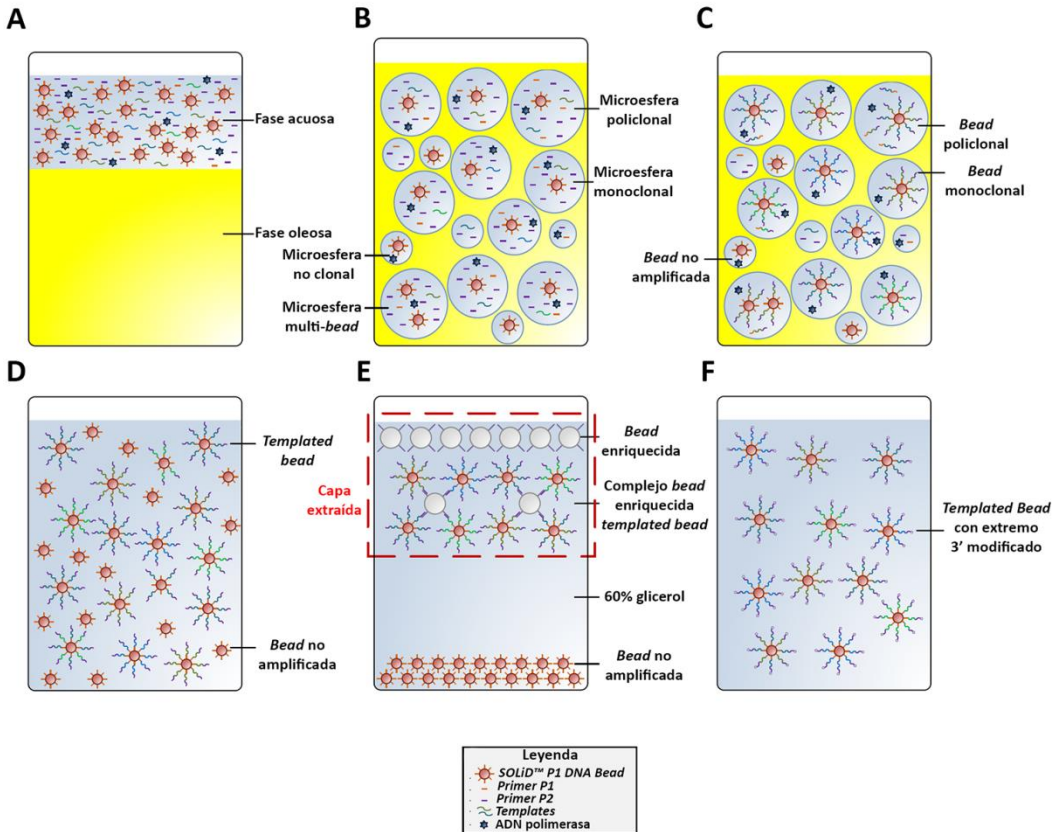


Figura 24. Amplificación clonal de una población de fragmentos cortos de ADN en *SOLiD™ P1 DNA Beads* usando un método de emulsión. **A**, fase acuosa y fase oleosa previa a la emulsión. **B**, emulsión previa a la amplificación. **C**, emulsión después de la amplificación. **D**, *templated beads* y *beads* no amplificadas después de la rotura de la emulsión y el lavado de las *beads*. **E**, *beads* enriquecidas y *SOLiD™ P1 DNA beads* después de la centrifugación con 60% de glicerol. **F**, *templated beads* después de la modificación del extremo 3'. (Modificada de Applied Biosystems).

Para la ePCR se utilizó el kit *SOLiD™ ePCR (Life Technologies)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En primer lugar se prepararon:

- Fase oleosa (Figura 24A): se mezclaron 1,8 ml de estabilizador 1, 400 μ l de estabilizador 2 y 37,8 ml de aceite de emulsión, se agitó y se dejó que se desgasificara durante al menos 20 minutos.
- Fase acuosa (Figura 24A) (para una concentración de la librería de 1.0 pM): se mezclaron 280 μ l de tampón de PCR 10X, 392 μ l de mix de dNTPs, 70 μ l de cloruro de magnesio 1 M, 11,2 μ l del cebador 1, 16,8 μ l del cebador 2, 5,6 μ l de *Template* 500 pM, 1.644,4 μ l de agua libre de nucleasas y 300 μ l de la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold®* 5 U/ μ l.
- *SOLiD™ P1 DNA Beads*: se agitó un tubo de *beads* enérgicamente, tras dejarlo reposar se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200 μ l de solución de bloqueo. Las *beads* se sonicaron, se agitaron y se dejaron reposar para eliminar el sobrenadante y volver a resuspender en tampón TEX 1X.

A continuación, se creó la emulsión con un *ULTRA-TURRAX® Tube Drive (IKA®)* (Figura 24B), se repartieron 150 μ l de esta emulsión en cada pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos y ésta se selló con una película adhesiva transparente. La reacción de ePCR se llevó a cabo en el sistema *GeneAmp® PCR 9700* con las siguientes condiciones:

Tabla 9. Amplificación ePCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
40 ciclos	Desnaturalización	93°C
	Hibridación	62°C
	Extensión	72°C
Extensión final	72°C	7 minutos

❖ Rotura de la emulsión y lavado de las *beads*

Cuando la ePCR está completa (Figura 24C), la emulsión se rompe con 2-butanol y las *templated beads* y las *beads* no amplificadas se lavan para eliminar el 2-butanol residual, la fase oleosa y la fase acuosa que contiene los reactivos de la PCR (Figura 24D). Para ello se recogió la emulsión en una bandeja de recogida (*SOLID™ Emulsion Collection Tray*) y se añadieron 12 ml de 2-butanol pipeteando hasta su completa homogenización. A continuación, se transfirió la emulsión a un nuevo tubo de 50 ml y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos. La fase 2-butanol-aceite se decantó y el tubo se dejó boca abajo 5 minutos sobre papel absorbente.

Para lavar las *beads* se añadieron 600 µl de tampón de lavado, después de 2 minutos se resuspendieron con una pipeta y se transfirieron a un tubo *LoBind* de 1,5 ml. A continuación, se agitó el tubo y se centrifugó a 21.000 g durante 1 minuto, se eliminaron la fase superior de aceite y el sobrenadante. Se realizó otro lavado con 300 µl de tampón de lavado y, por último, las *beads* se resuspendieron en 200 µl de tampón TEX 1X.

Finalmente, las *beads* se sonicaron y se cuantificó una dilución 1/10 con el SOLiD™ *Bead Concentration Chart* (Figura 25) y el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

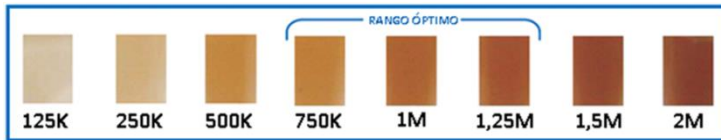


Figura 25. SOLiD™ *Bead Concentration Chart*. (Extraída de Applied Biosystems).

❖ Enriquecimiento de las *templated beads*

Es necesario un enriquecimiento para aislar las *templated beads* de las *beads* no amplificadas o mal amplificadas (Figura 24E). En una primera etapa se usan *beads* de poliestireno con un adaptador P2 de cadena simple para capturar las *templated beads*. Se enriquecen las *beads* tanto monoclonales como policlonales, el proceso está diseñado para enriquecer las *templated beads* derivadas de una reacción ePCR produciendo desde 150 hasta 300 millones de *templated beads*.

En primer lugar se eliminó el sobrenadante de las *beads* enriquecidas centrifugando a 21.000 g durante 2 minutos. Las *beads* se lavaron con 900 µl de tampón de unión y lavado dos veces. Seguidamente se resuspendieron con 350 µl de tampón de unión y lavado, se añadieron 3,5 µl de Oligo de enriquecimiento 1 mM y se mantuvo el tubo en rotación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las *beads* con 900 µl de tampón TEX 1X dos veces y se resuspendieron en 150 µl de tampón de unión 1X bajo en sal.

Las *templated beads* se lavaron con 300 μ l de tampón desnaturizante tres veces y con 300 μ l de tampón TEX 1X tres veces más. Finalmente, se resuspendieron en 150 μ l de tampón TEX 1X y se transfirieron a un tubo *LoBind* para sonicarlas. Se transfirieron las *beads* enriquecidas al tubo de las *templated beads* y se sonicaron de nuevo. A continuación, la mezcla de *beads* se incubó a 61°C durante 15 minutos e, inmediatamente, se dejaron en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 600 μ l de glicerol 60% recién preparado y se centrifugó a 21.000 g durante 3 minutos. El resultado es una capa superior formada por *beads* enriquecidas (con o sin *templated beads* unidas) y una capa inferior de *beads* no amplificadas (Figura 24E). La capa superior se recogió y se transfirió a un tubo *LoBind* que contenía 1 ml de tampón TEX 1X. Este tubo se agitó y se centrifugó a 21.000 g durante un minuto. Las *beads* se sedimentaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 400 μ l de tampón TEX 1X.

Para aislar las *beads* P2 enriquecidas se centrifugaron a 21.000 g durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Después se lavaron dos veces con 400 μ l de tampón desnaturizante y con 400 μ l de tampón TEX 1X dos veces más. Las *beads* se resuspendieron con 200 μ l de tampón TEX 1X y se sonicaron. Por último, las *beads* se lavaron con 400 μ l de tampón TEX 1X y se resuspendieron en 400 μ l de este mismo tampón.

❖ Modificación de los extremos 3'

Con el fin de facilitar la unión covalente de las *beads* P2 enriquecidas a los portas de vidrio, se añade dUTP al extremo 3' de las *templates* P2

usando una reacción de transferasa terminal (Figura 24F). En primer lugar se preparó el tampón de la reacción de transferasa terminal (500 µl por reacción de ePCR) con 55 µl de tampón de transferasa terminal 10X, 55 µl de cloruro de cobalto 10X y 390 µl de agua libre de nucleasas. Las *beads* enriquecidas se lavaron dos veces con este tampón y finalmente se resuspendieron en 178 µl al que se añadieron 20 µl de solución de enlazado 1 mM para sonicarlas. A continuación, se añadieron 2 µl de transferasa terminal (20 U/µl) y se mantuvo en rotación a 37°C durante 2 horas. Después, se lavaron las *beads* dos veces con 400 µl de tampón TEX 1X y se sonicaron. Por último, se cuantificaron las *beads* con el *SOLiD™ Bead Concentration Chart* (Figura 25) y el espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)*.

3.9.5. Secuenciación

Las muestras se secuenciaron en la plataforma *SOLiD 5500XL*, utilizando el protocolo 50625 *paired-end* y generando secuencias de 75 nucleótidos en dirección directa y 35 nucleótidos en dirección reversa, más 5 nucleótidos del *barcode*.

La tecnología *SOLiD™* de *Applied Biosystems* utiliza un método enzimático para la secuenciación que emplea una ADN ligasa en vez de una polimerasa para identificar la secuencia. Se trata de la secuenciación por ligación. La ADN ligasa une los extremos de las moléculas de ADN, es sensible a la estructura del ADN y tiene muy baja eficiencia cuando no hay complementariedad entre las bases de dos cadenas. Por tanto, la secuenciación por ligación depende de la sensibilidad de la ADN ligasa. La molécula a secuenciar es una sola hebra de ADN desconocida flanqueada

por, al menos, un extremo de secuencia conocida. En este sistema hay dieciséis combinaciones de dos nucleótidos con cuatro colorantes fluorescentes, cada colorante corresponde a un conjunto de sondas de cuatro dinucleótidos por grupo (Figura 26). El ligamiento preferente de la ADN ligasa por su secuencia específica produce una señal correspondiente a la secuencia complementaria en esa posición concreta.

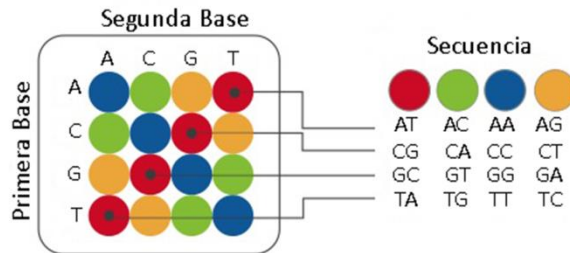


Figura 26. Codificación de dos bases. (Modificada de Applied Biosystems).

Después de la modificación de los extremos 3' de las *templated beads* se depositaron en portas de vidrio en disposición aleatoria (Figura 27). Los portas pueden estar segmentados en uno, cuatro u ocho secciones, de manera que se pueden cargar diferentes muestras en la misma carrera. En general los portas de uno, cuatro y ocho secciones pueden contener 165, 30 y 14 millones de *beads P2*, respectivamente.

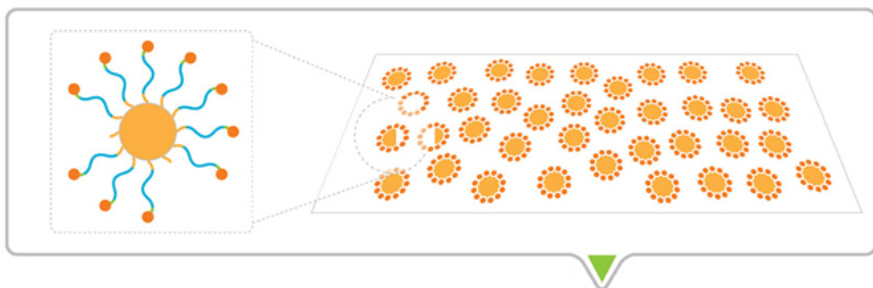


Figura 27. Depósito de *beads* en portas de vidrio. (Modificada de Applied Biosystems).

Una vez cargado el porta en la plataforma, los cebadores hibridaron con la secuencia P1 de las *templated beads* (Figura 28).

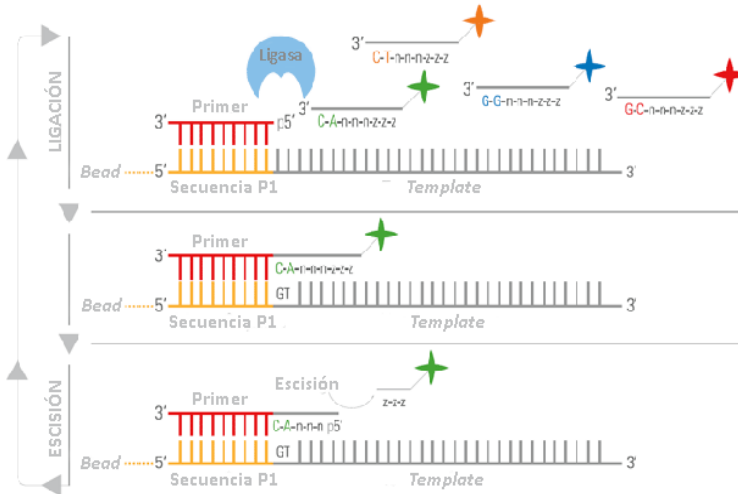


Figura 28. Secuenciación por ligación. (Modificada de Applied Biosystems).

El conjunto de sondas de dos bases marcadas con fluorescencia (Figura 26), compiten para la ligación al cebador de la secuencia. La especificidad de la sonda se logra interrogando a todas las primera y segunda bases de cada reacción de ligación. Se realizan múltiples ciclos de ligación, detección y escisión, el número de ciclos determina la longitud de la lectura. Tras una serie de ciclos de ligación, se retira el producto de extensión y el *template* se restablece con un cebador complementario a la posición n-1 para una segunda ronda de ciclos de ligación. Se completan cinco rondas de restablecimiento de cebadores para cada secuencia (Figura 29).

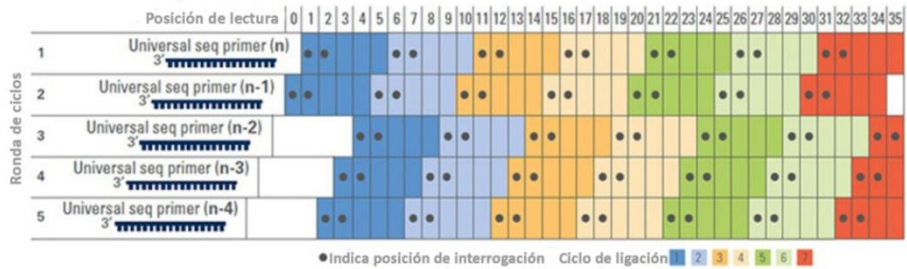


Figura 29. Rondas de ciclos de ligación. (Modificada de Applied Biosystems).

A través del proceso de restablecimiento de cebadores, prácticamente todas las bases son interrogadas en dos reacciones de ligación independientes por dos *templates* diferentes. Por ejemplo, la base en la posición de lectura 5 se ensaya mediante el cebador número 2 en el ciclo de ligación 2 y por el cebador número 3 en el ciclo de ligación 1. Este doble interrogatorio es fundamental para la precisión que caracteriza al sistema SOLiD™.

3.10. DETERMINACIÓN DE CATEGORÍAS Y REDES FUNCIONALES

Los estudios de alto rendimiento de todo el genoma proporcionan gran cantidad de información que debe ser clasificada para identificar procesos biológicos asociados con los resultados, determinar categorías funcionales comunes a los grupos de genes seleccionados y analizar las conexiones entre genes, moléculas y enfermedades para descubrir asociaciones relevantes. Por ello, se utilizan herramientas bioinformáticas que clasifican los genes en categorías funcionales y establecen redes funcionales entre ellos. Estos programas proporcionan información acerca de los mecanismos que influyen en una determinada enfermedad, identifican genes y proteínas

asociados con diferentes etiologías o enfermedades, y permiten predecir potenciales dianas terapéuticas.

Se realizó un enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados aplicando una prueba hipergeométrica mediante *ToppGene suite* (238), un portal para el análisis de enriquecimiento y priorización de genes candidatos de una lista de genes, basado en anotaciones funcionales y redes de interacciones proteicas. Mediante *ToppFun* seleccionamos el conjunto de genes a clasificar en base a una $p < 0,05$, aplicando la corrección FDR. Después, se representaron las categorías funcionales más significativas y se seleccionaron aquellos genes relacionados con el transporte vesicular del AG. Además, se realizó un *heatmap* y un *hierarchical clustering* mediante el programa *TIGR Multiexperiment Viewer* (MeV) versión 4.9, una herramienta de análisis de datos que incorpora algoritmos de clustering, visualización, clasificación, análisis estadístico y descubrimiento de rutas biológicas (<http://www.tm4.org/mev.html>).

3.11. ANÁLISIS DE DATOS

3.11.1. Quantificación relativa de la expresión génica (RT-qPCR)

Se realizó la cuantificación relativa de la expresión de ARNm de los genes de estudio. Se han desarrollado varios modelos matemáticos para este cálculo, el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (239) es el más utilizado. Este método calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre un gen de estudio y uno o más genes de referencia (*GAPDH*, *PGK1*, *TFRC* en nuestro caso). El método no requiere de la elaboración de una curva estándar lo que lo hace muy útil para el análisis de una gran cantidad de muestras. Para

que los cálculos sean válidos, las eficiencias de amplificación del gen estudio y de referencia deben ser aproximadamente iguales, esto requiere una rigurosa optimización, los fragmentos de amplificación deben ser menores de 150 pb para que la eficiencia sea aproximadamente 1.

La ecuación que describe la amplificación exponencial de la PCR es:

$$X_n = X_0 x (1 + E_x)^n \quad (1)$$

Donde X_n es el número de copias del gen X en el ciclo n; X_0 es el número inicial de copias del gen X; E_x es la eficiencia de la amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la PCR.

$$X_T = X_0 x (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_X \quad (2)$$

El C_T es el ciclo fraccional en el cual la fluorescencia del gen alcanza el umbral fijado. X_T es el número de copias del gen X en el ciclo C_T ; $C_{T,X}$ es el ciclo C_T del gen X y K_X es una constante. Ecuación similar para el gen de referencia:

$$R_T = R_0 x (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (3)$$

Donde R_T es el número de copias del gen de referencia; R_0 es el número inicial de copias del gen de referencia; E_R es la eficiencia de amplificación del gen de referencia; $C_{T,R}$ es el ciclo C_T del gen de referencia y K_R es una constante del gen de referencia.

Dividiendo la ecuación 2 y 3, y asumiendo que la eficiencia del gen de referencia es igual a la eficiencia del X, tenemos:

$$\frac{X_0}{R_0} x (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (4)$$

$$X_N x (1 + E)^{\Delta C_T} = K \quad (5)$$

Donde X_N es a cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el ΔC_T es la diferencia de los C_{T_s} del gen de estudio y del gen de referencia. Ordenando la ecuación y dividiendo el X_N de cualquier muestra q entre el X_N de la muestra calibrador (cb) tenemos:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K x (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K x (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad (6)$$

$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}) \quad (7)$$

Para fragmentos de un tamaño menor de 150 pb, en el cual las concentraciones de cebadores y Mg^{2+} han sido adecuadamente optimizadas, la eficiencia de amplificación es cercana a 1, entonces, la cantidad del gen de estudio, normalizada a una referencia, y relativa a una muestra calibrador es:

$$cantidad\ de\ gen\ diana = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad (8)$$

3.11.2. Análisis computacional de los resultados de RNA-seq

Las lecturas iniciales de todo el transcriptoma obtenidas por secuenciación fueron mapeadas contra la última versión del genoma humano (versión GRCh37/hg19) utilizando el algoritmo de mapeo de *Life Technologies* (<http://www.lifetechnologies.com/>; versión 1.3). Se utilizaron los parámetros estándar del software *BioScope™*, versión 1.3, en el análisis de extremos pareados y de todo el transcriptoma. Para ambas lecturas, directa y reversa, se establecieron los 25 primeros nucleótidos con un máximo de 2 errores permitidos. Los archivos alineados se presentaron en formato BAM/SAM (240). Las lecturas de mala calidad (puntuación Phred <10) se eliminaron usando el software *Picard Tools*, versión 1.83 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>).

Posteriormente, la predicción de genes se estimó usando el método de *cufflinks* (241) y los niveles de expresión se calcularon usando el software *htseq*, versión 0.5.4p3 (242), este método elimina las lecturas multimapeadas, sólo las lecturas únicas se consideraron para la estimación de la expresión génica. El método *edgeR*, versión 3.2.4, se aplicó para el análisis de expresión diferencial entre las condiciones patológicas y normal (243). Este método se basa en diferentes procesos de normalización; profundidad de muestras globales, composición CG y longitud de los genes. En el proceso de la expresión diferencial, se usa un modelo de *Poisson* para estimar la varianza de los datos de RNA-seq y tener en cuenta tanto la variabilidad biológica como técnica. Se usan métodos de *Bayes* empíricos para moderar el grado de dispersión de los transcritos, mejorando la fiabilidad de la inferencia.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test de *Kolmogorov-Smirnov* se utilizó para analizar la distribución de las variables. Para las variables continuas, los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE) en las variables con distribución normal y la mediana [rango intercuartílico] en las variables con distribución no normal; y las variables discretas se expresaron como porcentaje. La comparación de las características clínicas se llevó a cabo mediante el test *t-Student* para las variables continuas y el test exacto de *Fisher* para las variables discretas. Los niveles de proteína en tejido medidos por Western blot, los niveles de ARNm obtenidos de la cuantificación de la expresión génica y los parámetros del análisis estereológico de las vesículas de Golgi se compararon mediante el test *t-Student* para variables con una

distribución normal y mediante el test *U de Mann-Whitney* para variables con una distribución no normal. El parámetro área exhibió una distribución no normal y se transformó logarítmicamente (probando su normalización) antes del análisis de correlación paramétrica. Para analizar las relaciones entre los parámetros estudiados (proteicos, génicos y morfológicos), así como con los parámetros de función ventricular se realizó un análisis de regresión simple utilizando el coeficiente de correlación (*r*) de *Pearson*. Además, se analizó la influencia de varias variables independientes sobre una variable dependiente, mediante un análisis de regresión lineal multivariado, eligiéndose como mejor modelo el que presentó la r^2 más elevada. El nivel de significación se asumió con $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software SPSS para Windows (versión 20; *IBM SPSS Inc*).

4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación de este estudio es la inherente variabilidad de las muestras cardíacas de origen humano y el tratamiento farmacológico al que estaban sometidos los pacientes. Todos estaban recibiendo tratamiento convencional, y algunas terapias pueden afectar a los niveles proteicos y de ARNm. Para asegurarnos de que nuestra población era etiológicamente homogénea, elegimos pacientes con MCD que no tenían antecedentes familiares de la enfermedad y pacientes con etiología isquémica. Asimismo, queremos enfatizar la importancia de haber llevado a cabo este estudio en un número significativo de muestras patológicas y CNT haciendo que nuestros resultados sean extrapolables a poblaciones con MCD y MCI. Además, el hecho de trabajar con corazones explantados, y nuestra presencia en quirófano en el momento del trasplante, nos permite extraer la región de tejido que queremos analizar, lo cual no sería posible si el estudio se hiciera usando tejido biopsiado.

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

De las 73 muestras de tejido cardiaco utilizadas en este estudio, 32 se emplearon en el ensayo de RNA-seq (MCD, n=12; MCI, n=12; CNT, n=8).

La mayoría de los pacientes eran hombres (96%) y su media de edad fue de 53 ± 10 años. Los pacientes tenían una clasificación funcional NYHA de III-IV y habían sido previamente diagnosticados con comorbilidades significativas, incluyendo hipertensión (23%), hipercolesterolemia (14%) y DM (32%). El grupo CNT estaba compuesto principalmente por hombres (86%) con una media de edad de 50 ± 14 años.

La Tabla 10 muestra las características clínicas de los pacientes de acuerdo con la etiología. Los pacientes con MCD tenían mayores valores de diámetro tele-sistólico (DTSVI) ($p < 0,01$) Y DTDVI ($p < 0,001$) que los pacientes con MCI.

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes utilizados en el estudio de RNA-seq según la etiología de la insuficiencia cardiaca.

	MCD (n=12)	MCI (n=12)
Edad (años)	51 ± 11	55 ± 8
Sexo masculino (%)	92	100
Clase NYHA	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,4
IMC (kg/m²)	28 ± 5	26 ± 5
Hemoglobina (mg/ml)	13 ± 3	14 ± 3
Hematocrito (%)	39 ± 8	42 ± 6
Colesterol total (mg/dl)	150 ± 38	160 ± 43
Hipertensión previa (%)	18	27
Diabetes mellitus previa (%)	18	46
Fumadores (%)	55	91
FE (%)	19 ± 7	24 ± 4
FA (%)	11 ± 4	13 ± 2
DTSVI (mm)	71 ± 12	56 ± 8*
DTDVI (mm)	80 ± 11	64 ± 8**
Duración enfermedad (meses)	77 ± 71	48 ± 41

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

En el proceso de validación mediante RT-qPCR, se utilizaron 50 de las muestras de ventrículo izquierdo para mejorar la potencia estadística con un mayor número de pacientes y sujetos CNT (MCD, n=20; MCI, n=20; CNT, n=10).

La mayoría de los pacientes eran hombres (88%) y tenían una media de edad de 52 ± 11 años. Igualmente tenían una clasificación funcional NYHA de III-IV y habían sido previamente diagnosticados con comorbilidades significativas, incluyendo hipertensión (34%), hipercolesterolemia (19%) y DM (31%). El grupo CNT también estaba compuesto principalmente por hombres (70%) con una media de edad de 46 ± 15 años.

La Tabla 11 muestra las características clínicas de los pacientes de acuerdo con la etiología. Comparado con el grupo MCD, el grupo MCI tenía significativamente mayor edad ($p < 0,05$), mayores niveles de colesterol ($p < 0,05$) y mayor tasa de DM previa ($p < 0,01$), mientras que los pacientes con MCD tenían mayores valores de DTSVI ($p < 0,01$) y DTDVI ($p < 0,01$).

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes utilizados en el estudio de RT-qPCR según la etiología de la insuficiencia cardiaca.

	MCD (n=20)	MCI (n=20)
Edad (años)	48 ± 14	56 ± 7*
Sexo masculino (%)	75	100*
Clase NYHA	3,3 ± 0,4	3,5 ± 0,4
IMC (kg/m²)	27 ± 6	27 ± 4
Hemoglobina (mg/ml)	13 ± 3	14 ± 2
Hematocrito (%)	38 ± 7	41 ± 6
Colesterol total (mg/dl)	140 ± 44	177 ± 51*
Hipertensión previa (%)	21	47
Diabetes mellitus previa (%)	10	53**
Fumadores (%)	61	90*
FE (%)	21 ± 8	23 ± 5
FA (%)	12 ± 4	13 ± 2
DTSVI (mm)	66 ± 12	56 ± 7**
DTDVI (mm)	75 ± 11	65 ± 8**
Duración enfermedad (meses)	70 ± 63	47 ± 42

MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo. La duración de la enfermedad se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón. *p<0,05; **p<0,01.

1.2. NIVELES DE ARNm DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Realizamos un análisis de expresión a gran escala en 32 muestras de tejido cardiaco utilizando la tecnología RNA-seq para investigar los cambios transcriptómicos que tienen lugar en los corazones humanos con IC. Los datos expuestos en este trabajo han sido depositados en *Gene Expression Omnibus (GEO)* de *NCBI* (244) y son accesibles a través de la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55296>, número de acceso GSE55296.

Cuando comparamos corazones con MCD y CNT, encontramos 2.894 genes expresados diferencialmente ($p < 0,05$), de los cuales 1.132 estaban sobreexpresados y 1.762 infraexpresados. Además, en la comparación del grupo MCI con el CNT, bajo el mismo criterio, se encontró que 1.846 genes estaban expresados diferencialmente, con 854 sobreexpresados y 992 infraexpresados. Entre estos genes expresados diferencialmente en ambas comparaciones (MCD vs CNT y MCI vs CNT), encontramos que algunos estaban asociados con la biología de los PN.

Tanto el gen de BNP (*NPPB*) como el de ANP (*NPPA*) estaban incrementados en ambos grupos, MCD (24 *fold*, $p < 0,01$; 32 *fold*, $p < 0,0001$; respectivamente) y MCI (15 *fold*, $p < 0,01$; 10 *fold*, $p < 0,0001$; respectivamente) respecto a CNT. Sin embargo, el gen de CNP (*NPPC*) solo estaba incrementado en el grupo MCI (2,28 *fold*, $p < 0,05$). También observamos diferencias en los niveles de *NPPC* ($p < 0,01$) cuando se compararon las dos etiologías (Figura 30).

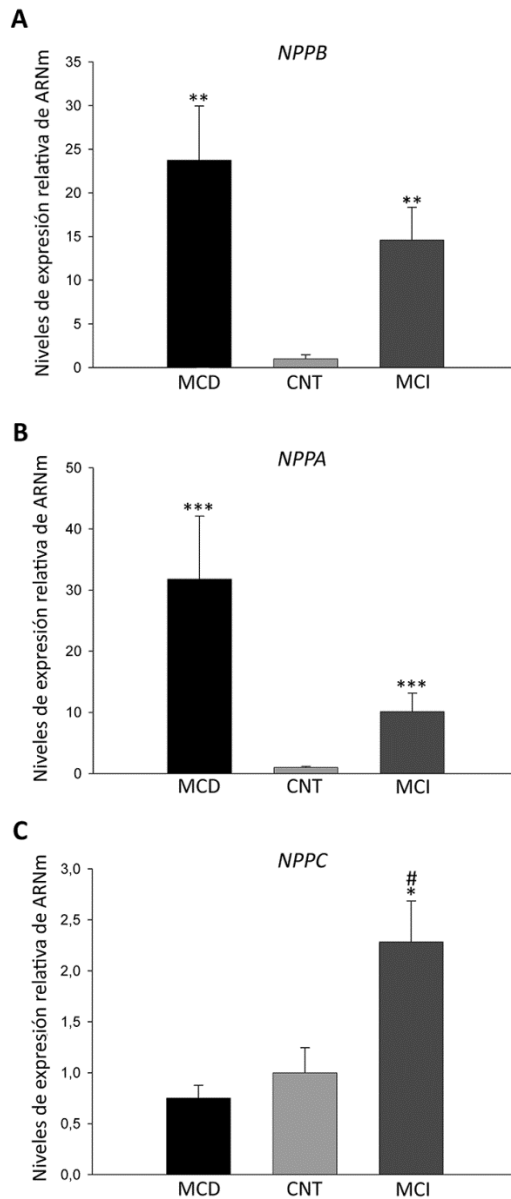


Figura 30. Niveles de expresión del ARNm de proBNP (*NPPB*) (A), proANP (*NPPA*) (B) y proCNP (*NPPC*) (C) determinados por RNA-seq. Los valores del grupo control (CNT) se han ajustado a 1. Los datos están expresados como la media \pm SEM en expresión relativa de ARNm. MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ vs el grupo CNT; # $p < 0,01$ MCD vs el grupo MCI.

En el caso de las enzimas de escisión, encontramos que *FURINA* tenía niveles más bajos solo en el grupo MCI (-1,37 *fold*, $p < 0,05$). Los niveles de *CORINA* fueron significativamente menores en los dos grupos en comparación a CNT (MCD -3,22 *fold*, $p < 0,001$; MCI -1,96 *fold*, $p < 0,01$) (Figura 31). En cambio, *MME* no fue significativamente diferente en ninguna de las dos etiologías.

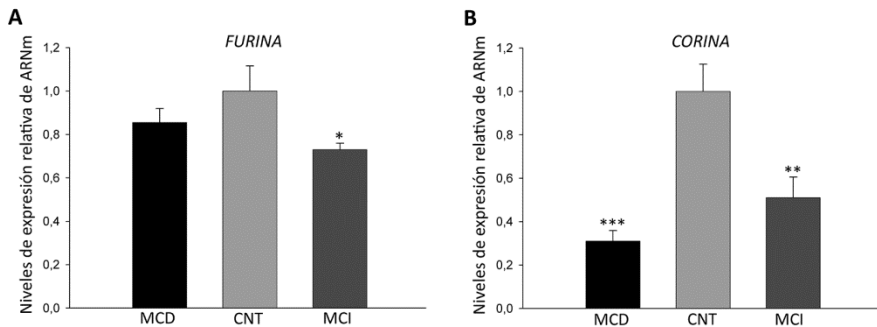


Figura 31. Niveles de expresión de ARNm de furina (A) y corina (B) determinados por RNA-seq. Los niveles del grupo control se han ajustado a 1. Los datos están expresados como la media \pm SEM en expresión relativa de ARNm. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, control; MCI, miocardiopatía isquémica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs el grupo CNT.

En cuanto a los receptores, *NPR1* presentaba menores niveles en el grupo MCD (-1,42 *fold*, $p < 0,05$) en comparación con el grupo CNT, mientras que los niveles de ARNm de *NPR3* fueron mayores en ambos grupos (MCD 1,55 *fold*, $p < 0,05$; MCI 1,58 *fold*, $p < 0,05$). En contraste, los niveles de *NPR2* no fueron significativamente diferentes en ninguna de las dos etiologías (Figura 32).

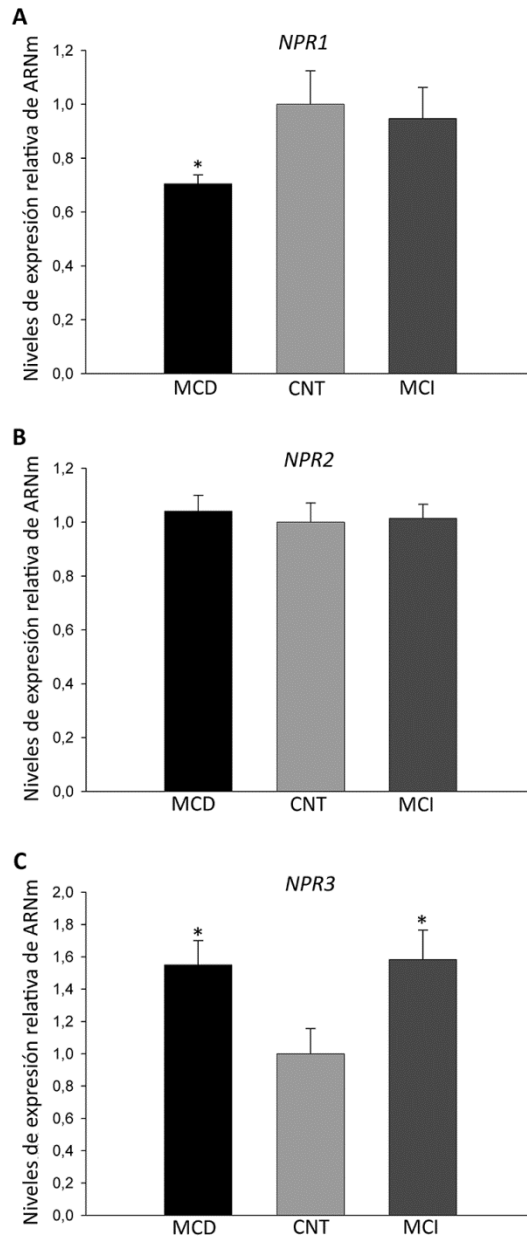


Figura 32. Niveles de expresión de ARNm de los receptores de péptidos natriuréticos determinados por RNA-seq. A, *NPR1*; B, *NPR2*; C, *NPR3*. Los niveles del grupo control (CNT) se han ajustado a 1. Los datos están expresados como la media \pm SEM en expresión relativa de ARNm. MCD, miocardiopatía dilatada; MCI, miocardiopatía isquémica. * $p < 0,05$ vs el grupo CNT.

Para validar estos resultados realizamos una RT-qPCR con un total de 50 corazones humanos (MCD, n=20; MCI, n=20; CNT, n=10) con los genes *NPPC*, *NPPB* y *CORINA*. Estos genes están fuertemente implicados en la homeostasis de fluidos corporales y el control de la presión sanguínea y están diferencialmente expresados en MCD y MCI comparados con CNT. Todos ellos mostraron idénticas direcciones de cambio en la expresión al análisis de RNA-seq.

1.3. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA

Comprobamos si existía alguna relación entre los niveles de expresión de ARNm de los genes estudiados y los cambios en la función del ventrículo izquierdo. Para 11 de las 12 muestras de MCI teníamos completamente disponibles los parámetros de función ventricular izquierda. Encontramos una relación significativa entre la fracción de acortamiento (FA) y la FE con *NPPC* ($r=-0,660$, $p<0,05$; $r=-0,641$, $p<0,05$; respectivamente) en el grupo MCI (Figura 33).

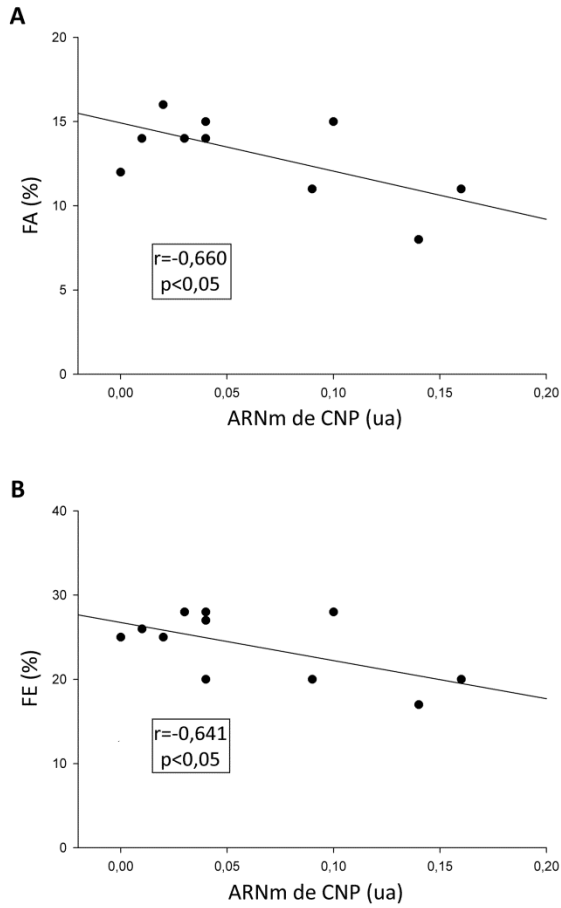


Figura 33. Correlación de la fracción de acortamiento (FA), A; y la fracción de eyección (FE), B; con el ARNm de CNP en el grupo con miocardiopatía isquémica. Los valores fueron normalizados al grupo control. ua, unidades arbitrarias.

2. EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SUS MOLÉCULAS RELACIONADAS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

En el estudio de cuantificación de proteínas se incrementó el número de muestras cardíacas, utilizando un total de 73 (MCD, n=33; MCI, n=30; CNT, n=10). De la misma forma, la mayoría de los pacientes eran hombres (87%) con una media de edad de 51 ± 11 años. Igualmente tenían una clasificación funcional NYHA de III-IV y habían sido previamente diagnosticados con comorbilidades significativas, incluyendo hipertensión (34%), hipercolesterolemia (13%) y DM (32%). El grupo CNT también estaba compuesto principalmente por hombres (73%) con una media de edad de 49 ± 19 años.

La Tabla 3 (Apartado 1 de Material y Métodos) muestra las características clínicas de los pacientes de acuerdo con la etiología. Comparado con el grupo MCD, el grupo MCI tenía significativamente mayor edad ($p < 0,05$), mayores niveles de colesterol ($p < 0,001$) y mayor tasa de DM previa ($p < 0,001$), mientras que los pacientes con MCD tenían mayores valores de DTSVI ($p < 0,001$) y DTDVI ($p < 0,001$).

Todos los pacientes se encontraban bajo tratamiento farmacológico siguiendo las guías de la *European Society of Cardiology* (1, 3) (Tabla 2, Apartado 1 de Material y Métodos). Encontramos cambios estadísticamente significativos en el tratamiento con β -bloqueantes ($p < 0,05$), antidiabéticos ($p < 0,05$) y estatinas ($p < 0,001$) de acuerdo con la etiología de la IC.

2.2. NIVELES PROTEICOS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y LAS ENZIMAS CORINA Y FURINA EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Con el fin de analizar la fisiopatología de los PN y sus enzimas en tejido cardiaco, usamos la técnica de Western blot para determinar los niveles proteicos de las formas inmunoreactivas de los PN y las endoproteasas (corina y furina) en corazones humanos dilatados e isquémicos.

2.2.1. Niveles proteicos de BNP

Analizamos los niveles de las formas de BNP en cada grupo patológico, observando un incremento de los niveles tisulares de proBNP (34%, $p < 0,05$) comparados con los niveles de BNP en el grupo de MCI. Sin embargo no existen diferencias en el grupo MCD (Figura 34).

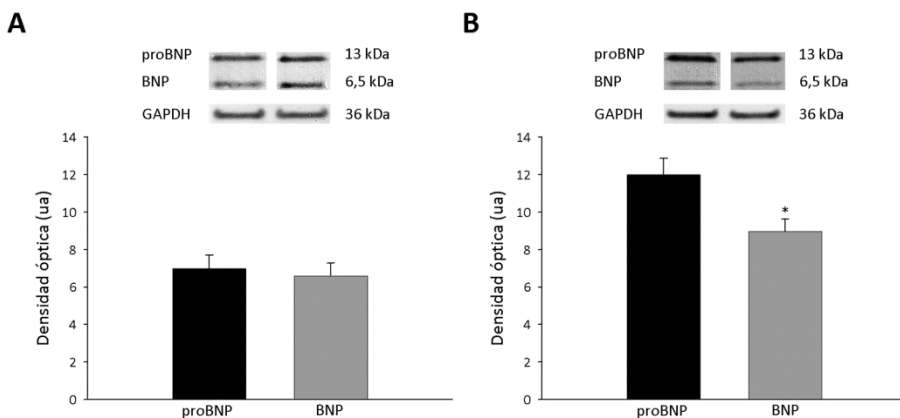


Figura 34. Niveles de proBNP y BNP en pacientes con insuficiencia cardiaca. Los datos se expresan en unidades arbitrarias (densidad óptica) como la media \pm SEM. proBNP vs BNP en miocardiopatía dilatada (A) e isquémica (B). * $p < 0,05$.

Los niveles de BNP en pacientes con IC (MCD y MCI) eran significativamente mayores que en el grupo CNT (125 ± 56 vs 100 ± 23 , $p < 0,05$). En cambio, los

niveles de proBNP en estos dos grupos eran muy similares (104 ± 18 vs 100 ± 11 , $p=0,568$). Además, cuando comparamos los niveles proteicos de acuerdo con la etiología de la IC, solo el grupo MCI mostró diferencias en ambos (BNP y proBNP) con los CNT (146 ± 68 vs 100 ± 23 , $p<0,01$; y 112 ± 15 vs 100 ± 11 , $p<0,05$; respectivamente). El grupo MCD era significativamente similar al grupo CNT (107 ± 36 vs 100 ± 23 , $p=0,579$, para BNP; y 96 ± 17 vs 100 ± 11 , $p=0,548$, para proBNP). Y la comparación de los dos grupos patológicos mostró diferencias en ambos, BNP ($p<0,05$) y proBNP ($p<0,0001$) (Figura 35).

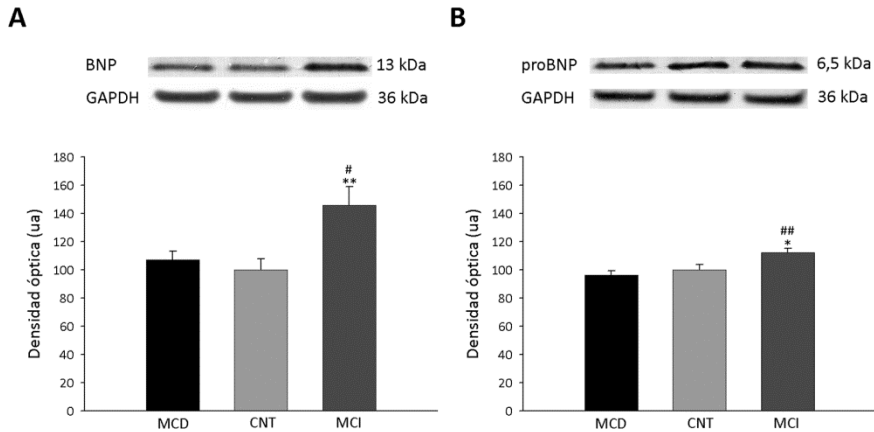


Figura 35. Niveles de BNP (A) y proBNP (B) en los grupos de miocardiopatía dilatada (MCD), isquémica (MCI) y control (CNT). Los valores del grupo CNT se ajustaron a 100. Los datos se expresan como la media \pm SEM en unidades arbitrarias (densidad óptica). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vs grupo CNT. # $p<0,05$, ## $p<0,0001$ grupo MCD vs MCI.

2.2.2. Niveles proteicos de ANP

Cuando comparamos los niveles de las formas de ANP en el grupo MCD, observamos que los niveles tisulares de proANP eran mayores que los niveles de ANP (29%, $p < 0,01$). En contraste, en el grupo MCI, los niveles tisulares de proANP eran menores que los niveles de ANP (26%, $p < 0,01$) (Figura 36).

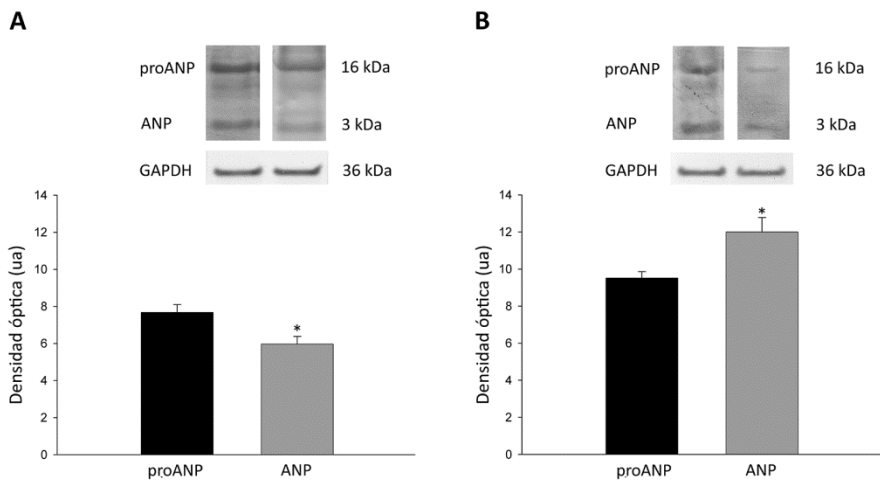


Figura 36. Niveles de proANP y ANP en pacientes con insuficiencia cardiaca. Los datos se expresan en unidades arbitrarias (densidad óptica) como la media \pm SEM. proANP vs ANP en miocardiopatía dilatada (A) e isquémica (B). * $p < 0,01$.

Al comparar los niveles proteicos en pacientes con IC (MCD y MCI) y CNT, proANP y ANP no muestran diferencias significativas (102 ± 21 vs 100 ± 15 , $p = 0,728$; 89 ± 25 vs 100 ± 17 , $p = 0,160$, respectivamente). Igualmente cuando comparamos los niveles proteicos de acuerdo con la etiología de la IC, los niveles de proANP y ANP no mostraron diferencias con los CNT (94 ± 15 vs 100 ± 15 , $p = 0,258$; y 92 ± 17 vs 100 ± 17 , $p = 0,194$, respectivamente,

para el grupo MCD; 112 ± 22 vs 100 ± 15 , $p=0,122$; y 85 ± 31 vs 100 ± 17 , $p=0,151$, respectivamente, para el grupo MCI).

2.2.3. Niveles proteicos de CNP

En el caso de CNP no observamos diferencias significativas en ninguna de las comparaciones. El grupo de pacientes con IC (MCD y MCI) tenía niveles similares al grupo CNT (82 ± 53 vs 100 ± 40 , $p=0,377$). Del mismo modo, ninguna de las dos etiologías mostraron diferencias significativas respecto al grupo CNT (73 ± 64 vs 100 ± 40 , $p=0,293$, para el grupo MCD; 90 ± 41 vs 100 ± 40 , $p=0,580$, para el grupo MCI).

2.2.4. Niveles proteicos de las endoproteasas corina y furina

En el caso de las endoproteasas, no habían diferencias significativas en corina y furina entre los pacientes con IC y el grupo CNT: 104 ± 30 vs 100 ± 7 , $p=0,334$ para corina; y 101 ± 46 vs 100 ± 33 , $p=0,971$ para furina. Lo mismo se aplica en los niveles de furina para MCD y MCI (84 ± 51 vs 100 ± 33 , $p=0,353$; 119 ± 32 vs 100 ± 33 , $p=0,113$, respectivamente), comparado con CNT; sin embargo, observamos que había un incremento en los niveles de furina en el grupo MCI respecto al grupo MCD (119 ± 32 vs 84 ± 51 , $p<0,01$) (Figura 37A). Corina mostró niveles mayores en corazones con MCI (112 ± 24 vs 100 ± 67 , $p<0,05$), pero no en corazones con MCD (97 ± 33 vs 100 ± 7 , $p=0,634$) comparado con CNT; además el grupo MCI también mostró niveles mayores comparado con el grupo MCD (112 ± 24 vs 97 ± 33 , $p<0,05$) (Figura 37B).

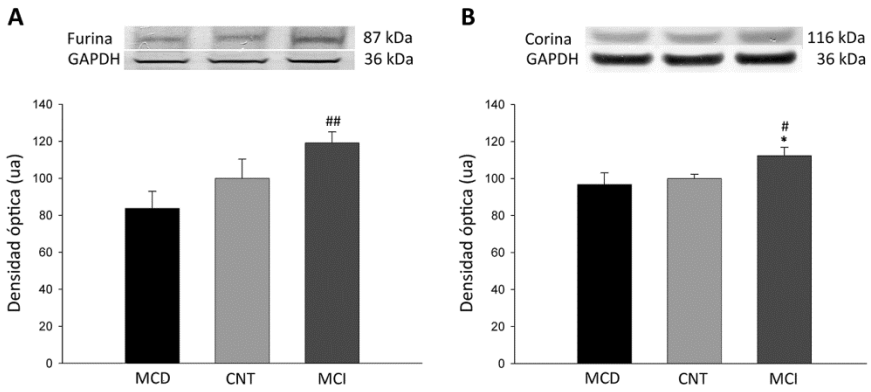


Figura 37. Niveles de expresión proteica de las endoproteasas en los grupos de miocardiopatía dilatada (MCD), isquémica (MCI) y control (CNT). A, furina; B, corina. Los valores del grupo CNT se ajustaron a 100. Los datos se expresan como la media \pm SEM en unidades arbitrarias (densidad óptica). * $p < 0,05$ vs grupo CNT; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ grupo MCD vs MCI.

2.3. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PROTEICOS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y LAS ENZIMAS CORINA Y FURINA

Determinamos además si existía alguna relación entre los niveles de péptidos y las enzimas de escisión. Y encontramos que corina y proANP estaban relacionadas en ambas etiologías, MCD ($r=0,499$, $p<0,01$) y MCI ($r=0,574$, $p<0,001$) (Figura 38).

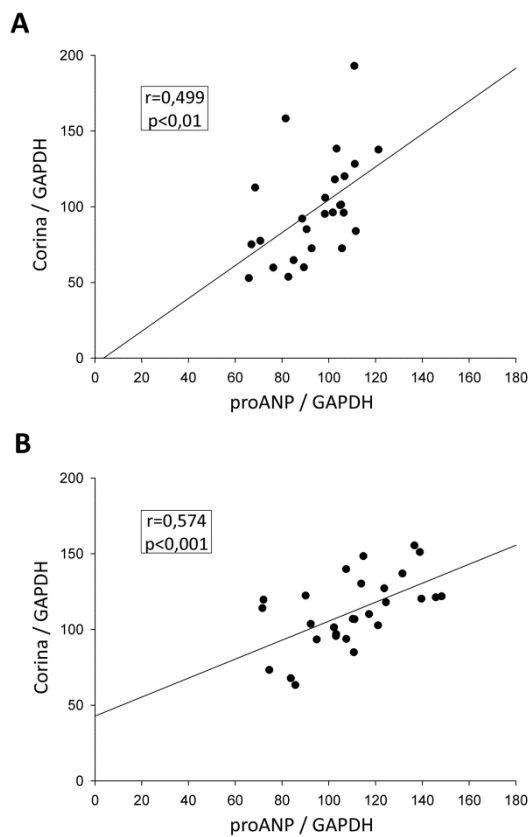


Figura 38. Correlación entre proANP y corina. El gráfico de dispersión muestra que proANP está correlacionado con corina en el grupo dilatado (A), y en el grupo isquémico (B). Los valores han sido normalizados a GAPDH y finalmente al grupo control.

Además encontramos una relación relevante entre las dos enzimas en ambos grupos, MCD ($r=0,616$, $p<0,0001$) y MCI ($r=0,502$, $p<0,01$) (Figura 39).

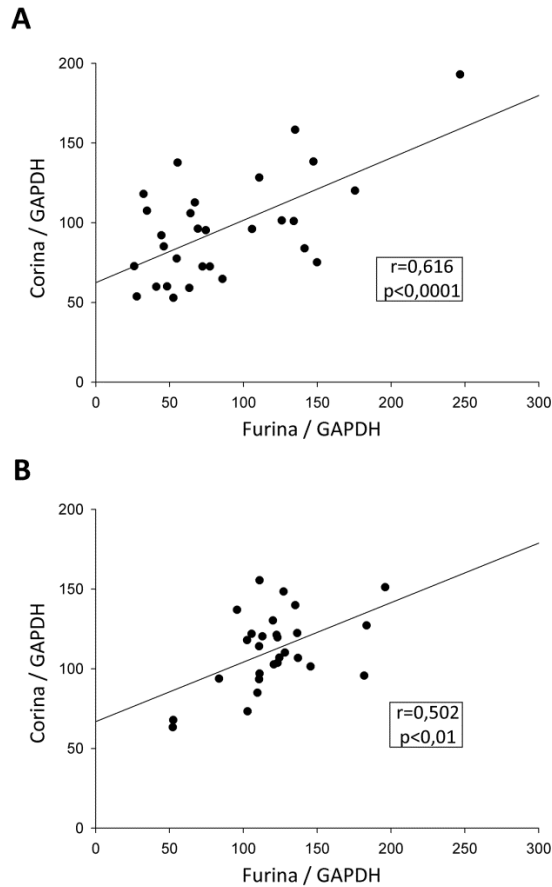


Figura 39. Correlación de las endoproteasas. El gráfico de dispersión muestra la correlación entre furina y corina en el grupo con miocardiopatía dilatada (A) y con miocardiopatía isquémica (B). Los valores fueron normalizados a GAPDH y finalmente al grupo control.

Los niveles de proBNP y BNP están relacionados, y encontramos una relación entre ellos tanto el grupo de MCD ($r=0,343$, $p<0,05$) como en el MCI ($r=0,736$, $p<0,0001$) (Figura 40).

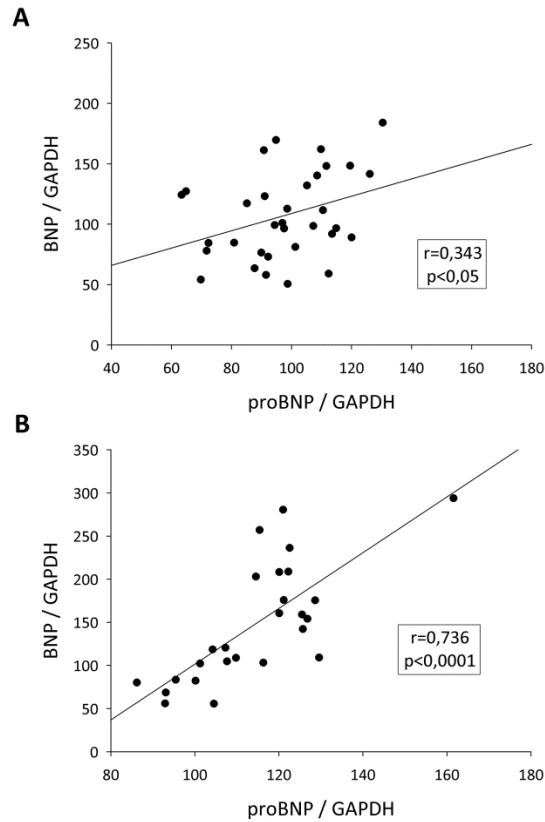


Figura 40. Correlación entre proBNP y BNP en el grupo de miocardiopatía dilatada (A) e isquémica (B). Los valores fueron normalizados a GAPDH y finalmente al grupo control.

Asimismo, encontramos una fuerte relación entre proANP y ANP ($r=0,547$, $p<0,001$) en el grupo MCD (Figura 41).

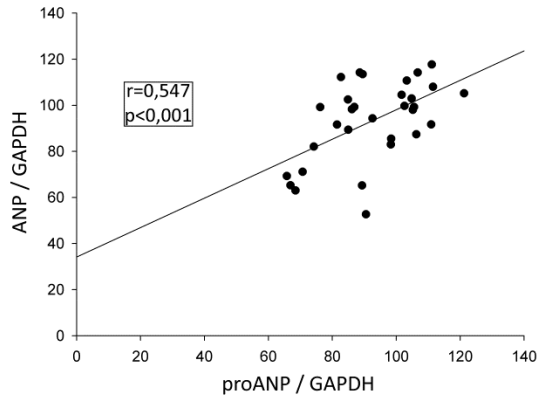


Figura 41. Correlación entre proANP y ANP en el grupo de miocardiopatía dilatada. Los valores fueron normalizados a GAPDH y finalmente al grupo control.

Finalmente, corina presenta una correlación significativa con ANP ($r=0,455$, $p<0,05$) en el grupo MCI (Figura 42).

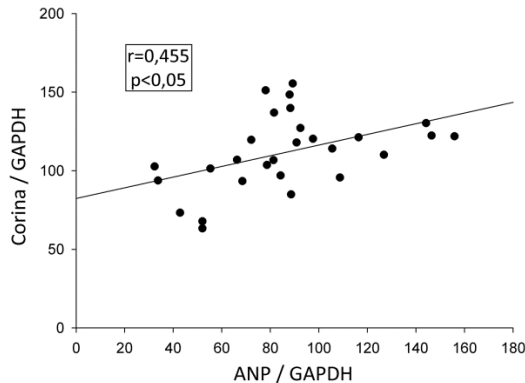


Figura 42. Correlación entre ANP y corina en el grupo con miocardiopatía isquémica. Los valores fueron normalizados a GAPDH y finalmente al grupo control.

2.4. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PROTEICOS DE LAS MOLÉCULAS ESTUDIADAS Y LA FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA

Determinamos si existía alguna relación entre los niveles proteicos y los cambios en la función ventricular izquierda. Para 27 de las 30 muestras de MCI teníamos completamente disponibles los parámetros de función ventricular izquierda. Encontramos una correlación inversa significativa entre los niveles de corina y la FE del ventrículo izquierdo en el grupo MCI ($r=-0,399$, $p<0,05$) (Figura 43).

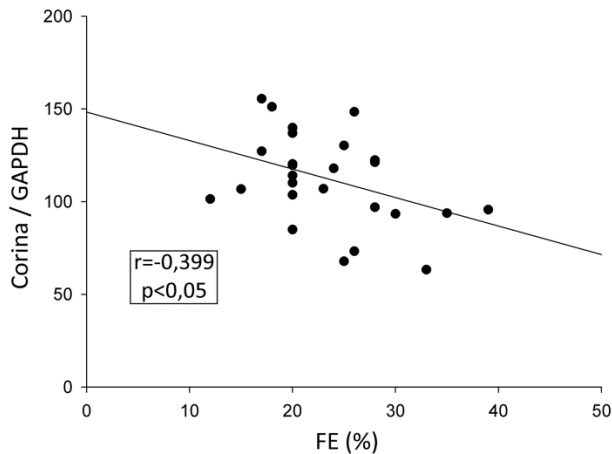


Figura 43. Correlación entre corina y la fracción de eyección (FE). Los valores fueron normalizados a GAPDH y finalmente al grupo control.

3. ALTERACIÓN DEL APARATO DE GOLGI Y EL TRANSPORTE VESICULAR DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS

3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Los pacientes utilizados en esta parte del estudio de RNA-seq son los mismos que los descritos en el Apartado 1.1 de Resultados (MCD, n=12; CNT, n=8) (Tabla 10). Los pacientes utilizados en el estudio proteico se corresponden con los descritos en el Apartado 2.1 de Resultados (MCD, n=33; CNT, n=10) (Tabla 3, Apartado 1 de Material y Métodos). Finalmente, para el aislamiento de las membranas del AG se utilizaron un total de 15 muestras cardíacas (MCD, n=7; CNT, n=8).

Todos los pacientes eran hombres y tenían una media de edad de 48 ± 12 años. Igualmente tenían una clasificación funcional NYHA de III-IV y habían sido previamente diagnosticados con comorbilidades significativas, incluyendo hipertensión (14%), hipercolesterolemia (14%) y DM (14%). El grupo CNT estaba compuesto principalmente por hombres (75%) con una media de edad de 56 ± 13 años. La Tabla 12 muestra las características clínicas de los pacientes.

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes utilizados en el estudio proteico de las vesículas del aparato de Golgi aisladas.

	MCD (n=7)
Edad (años)	48 ± 12
Sexo masculino (%)	100
Clase NYHA	3,4 ± 0,4
IMC (kg/m²)	27 ± 5
Hemoglobina (mg/ml)	14 ± 2
Hematocrito (%)	40 ± 5
Colesterol total (mg/dl)	144 ± 39
Hipertensión previa (%)	14
Diabetes mellitus previa (%)	14
Fumadores (%)	57
FE (%)	21 ± 7
FA (%)	11 ± 4
DTSVI (mm)	68 ± 13
DTDVI (mm)	77 ± 13
Duración enfermedad (meses)	46 ± 41

MCD, miocardiopatía dilatada; NYHA, *New York Heart Association*; IMC, índice de masa corporal; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo. La duración de la enfermedad, se considera desde el diagnóstico hasta el trasplante de corazón.

3.2. NIVELES DE ARNm DE LOS COMPONENTES DE GOLGI EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

En el análisis de expresión a gran escala de las 32 muestras de tejido cardiaco utilizando la tecnología de RNA-seq, encontramos 2.894 genes expresados diferencialmente ($p < 0,05$) en MCD, de los cuales 1.132 estaban sobreexpresados y 1.762 infraexpresados. Entre estos genes expresados diferencialmente, algunos de ellos estaban asociados con el transporte de vesículas del AG. Utilizando el programa *ToppFun* encontramos una categoría con 134 genes que correspondía al AG (Figura 44), dentro de la cual encontramos una categoría con los genes involucrados en la secreción de vesículas del AG (Figura 45, Tabla 13). Utilizando este conjunto de genes realizamos un *heatmap* y un *hierarchical clustering* del grupo MCD comparado con el grupo CNT, donde se observa una clara separación entre ellos (Figura 46).

GO: Componentes Celulares

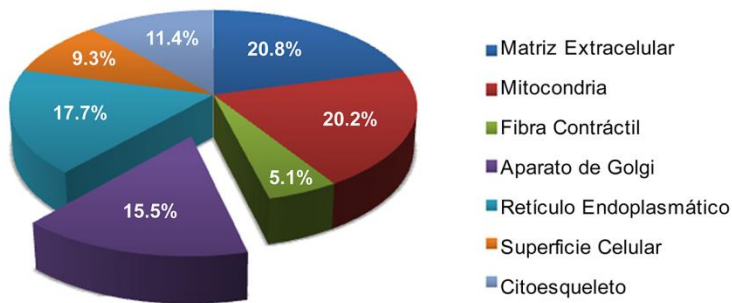


Figura 44. GO (*Gene Ontology*) de componentes celulares, que describe la localización a nivel de estructuras subcelulares y complejos macromoleculares, realizada con el programa *ToppFun* a partir de la lista de genes significativos ($p < 0,05$) obtenida mediante RNA-seq del grupo con miocardiopatía dilatada.

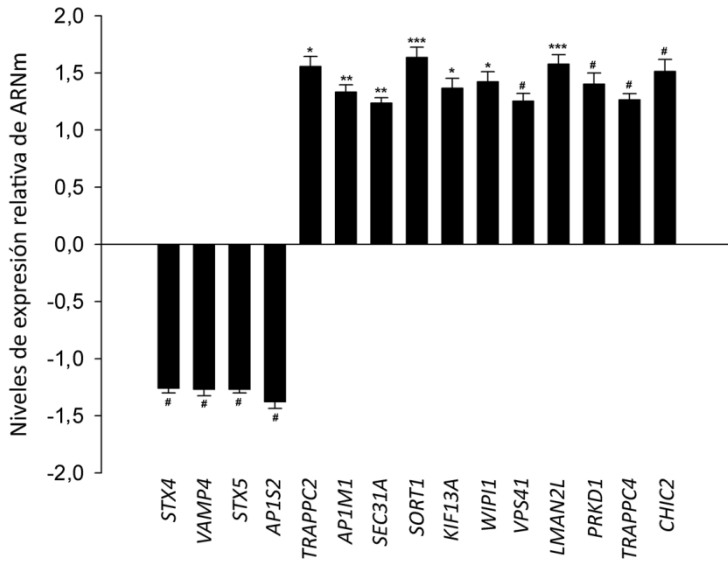


Figura 45. Niveles de expresión de ARNm de los genes implicados en la secreción de vesículas del aparato de Golgi determinados por RNA-seq en el grupo de miocardiopatía dilatada. Los niveles del grupo control se han ajustado a 1. Los datos están expresados como la media \pm SEM en expresión relativa de ARNm. # $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ vs grupo control.

RESULTADOS

Tabla 13. Lista de genes significativamente alterados en el transporte vesicular del aparato de Golgi en pacientes con miocardiopatía dilatada.

GEN	DESCRIPCIÓN	MCD	CNT	P-valor
AP1M1	<i>Adaptor-related protein complex 1</i>	1,33 ± 0,22	1,00 ± 0,18	p<0,001
AP1S2	<i>Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit</i>	-1,38 ± 0,20	1,00 ± 0,34	p<0,05
CHIC2	<i>Cysteine-rich hydrophobic domain 2</i>	1,51 ± 0,37	1,00 ± 0,70	p<0,05
KIF13A	<i>Kinesin family member 13A</i>	1,37 ± 0,31	1,00 ± 0,20	p<0,01
LMAN2L	<i>Lectin, mannose-binding 2-like</i>	1,58 ± 0,29	1,00 ± 0,25	p<0,0001
PRKD1	<i>Protein kinase D1</i>	1,40 ± 0,33	1,00 ± 0,47	p<0,05
SEC31A	<i>SEC31 homolog A</i>	1,24 ± 0,16	1,00 ± 0,09	p<0,001
SORT1	<i>Sortilin 1</i>	1,64 ± 0,32	1,00 ± 0,20	p<0,0001
STX4	<i>Syntaxin 4</i>	-1,26 ± 0,15	1,00 ± 0,21	p<0,05
STX5	<i>Syntaxin 5</i>	-1,27 ± 0,11	1,00 ± 0,25	p<0,05
TRAPPC2	<i>Trafficking protein particle complex 2</i>	1,56 ± 0,30	1,00 ± 0,43	p<0,01
TRAPPC4	<i>Trafficking protein particle complex 4</i>	1,27 ± 0,18	1,00 ± 0,34	p<0,05
VAMP4	<i>Vesicle-associated membrane protein 4</i>	-1,27 ± 0,19	1,00 ± 0,24	p<0,05
VPS41	<i>Vacuolar protein sorting 41 homolog</i>	1,26 ± 0,24	1,00 ± 0,31	p<0,05
WIPI1	<i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i>	1,42 ± 0,31	1,00 ± 0,23	p<0,01

Los datos están expresados como la media ± DE en expresión relativa de ARNm. MCD, miocardiopatía dilatada; CNT, controles.

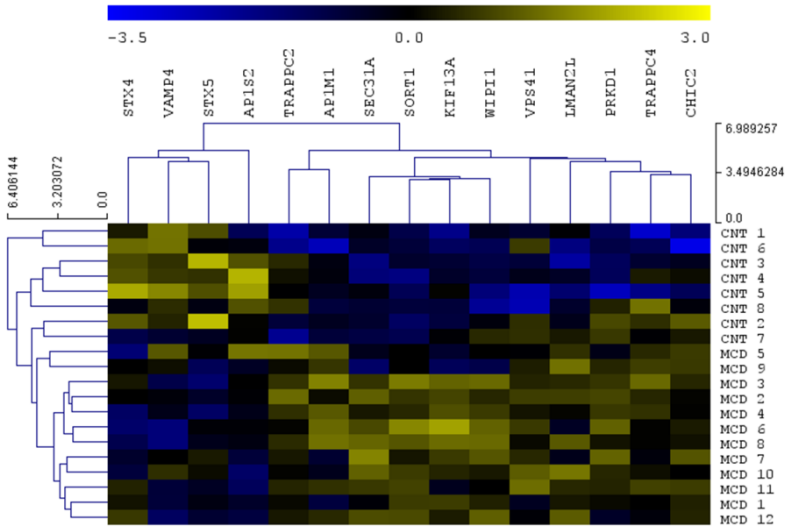


Figura 46. Heatmap y *hierarchical clustering* basado en los valores de *fold change* que revela la existencia de dos grupos de muestras, cardiomiopatía dilatada (MCD) y controles (CNT), claramente separadas. Columnas, genes; filas, muestras. El color representa los niveles de expresión relativa de cada gen; azul: menor expresión; amarillo: mayor expresión.

3.3. NIVELES DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN LAS VESÍCULAS DEL APARATO DE GOLGI EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Para profundizar en los resultados obtenidos sobre los niveles de péptidos en tejido cardiaco total, aislamos las vesículas del AG de tejido ventricular izquierdo y analizamos por Western blot los niveles de proteína de los PN (BNP, ANP y CNP). Los niveles de estos tres péptidos se incrementaron en las vesículas del AG aislado de pacientes con MCD respecto CNT (BNP, 132 ± 18 vs 100 ± 10 , $p < 0,05$; ANP, 207 ± 69 vs 100 ± 44 , $p < 0,05$; CNP, 154 ± 18 vs 100 ± 29 , $p < 0,01$) (Figura 47 y Figura 48).

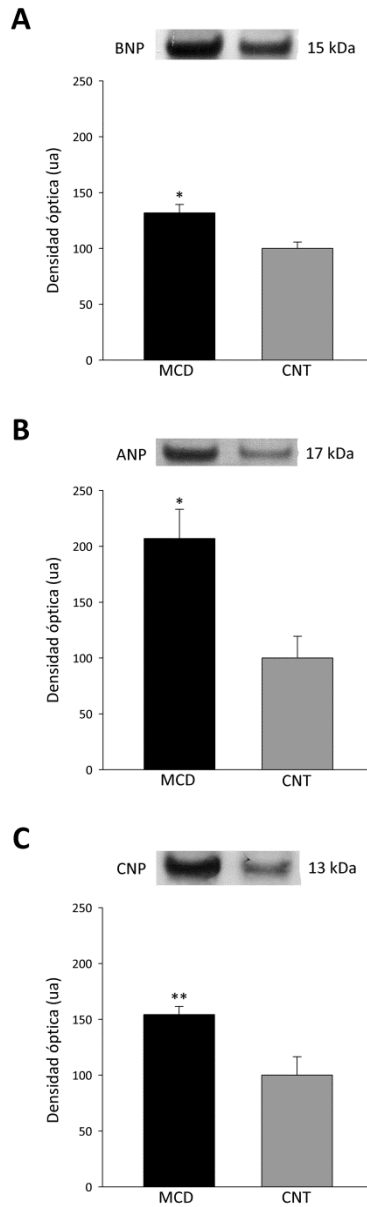


Figura 47. Niveles de expresión proteica de los péptidos natriuréticos en vesículas aisladas en los grupos de miocardiopatía dilatada (MCD) y control (CNT). A, BNP; B, ANP; C, CNP. Los valores del grupo CNT se ajustaron a 100. Los datos se expresan como la media \pm SEM en unidades arbitrarias (densidad óptica) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs grupo CNT.

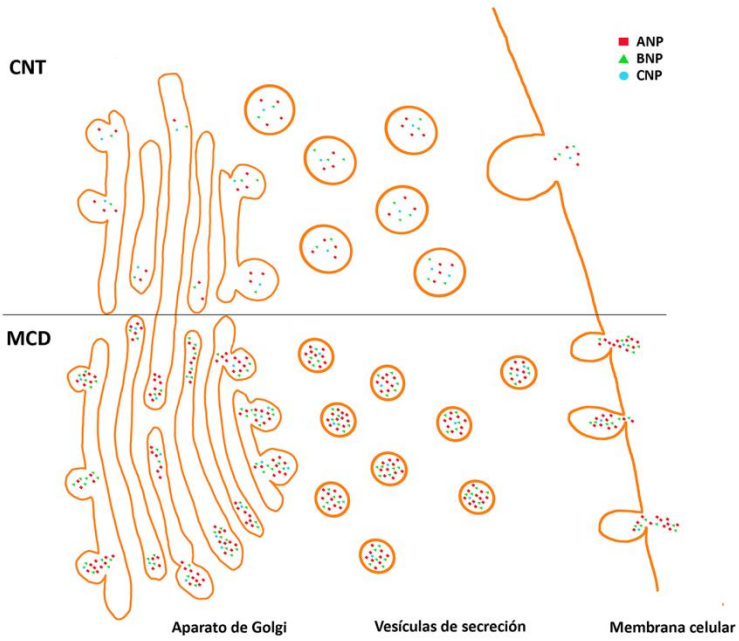


Figura 48. Esquema hipotético de la secreción de los péptidos natriuréticos en los pacientes con miocardiopatía dilatada (MCD). CNT, control.

Previamente, de las tres fracciones obtenidas tras la ultracentrifugación, encontramos que la fracción 2 era la óptima para el estudio. Además, de ser la correspondiente al gradiente especificado por Graham & Winterbourne (227), contenía mayor cantidad del marcador establecido de Golgi GM130 (245) y menos restos nucleares que se concentraban en el fondo, fracción 3 (Figura 49).

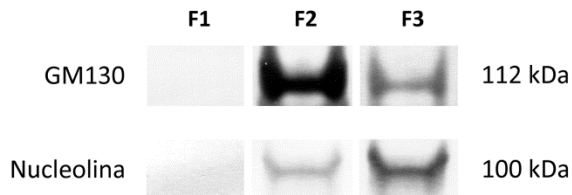


Figura 49. Western blots de GM130 y nucleolina en las 3 fracciones recogidas tras la centrifugación en gradiente. F1, fracción 1 (superior); F2, fracción 2; F3, fracción 3 (inferior).

Por otra parte, los restos derivados de este aislamiento (previos y posteriores a la ultracentrifugación) no mostraron diferencias en cualquiera de los tres péptidos entre pacientes con MCD y CNT (Tabla 14).

Tabla 14. Niveles de péptidos natriuréticos en los restos derivados del aislamiento de las vesículas del aparato de Golgi en pacientes con miocardiopatía dilatada (MCD) y controles (CNT).

	BNP	ANP	CNP
MCD	132 ± 68	109 ± 53	104 ± 35
CNT	100 ± 68	100 ± 21	100 ± 31

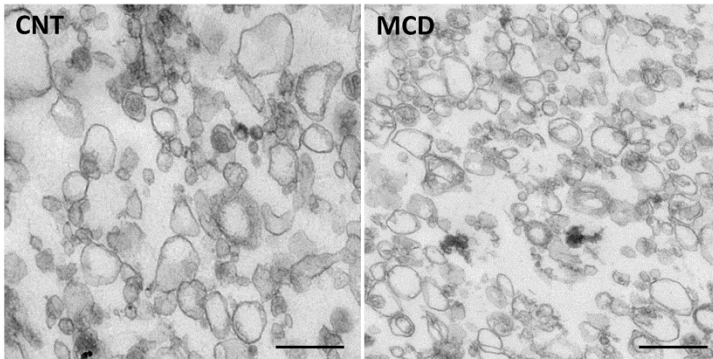
Los valores están normalizados a los del grupo CNT. Los valores del grupo CNT se establecieron 100. Los datos se expresan como la media ± DE en unidades arbitrarias (densidad óptica).

3.4. MORFOLOGÍA DE LAS VESÍCULAS DEL APARATO GOLGI EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

La visualización de las vesículas mediante el microscopio electrónico de transmisión confirmó también la buena calidad del aislamiento en ambos grupos MCD y CNT (Figura 50A).

Además, realizamos un estudio de la forma y el tamaño de las vesículas presentes en cada grupo (MCD, n=7.641; CNT, n=4.138). La densidad vesicular de los aislados (vesículas por μm^2) fue mayor en el grupo MCD comparado con el CNT ($10,52 \pm 4,24$ vs $7,98 \pm 3,24$, $p < 0,0001$). El área de las vesículas fue significativamente menor en el grupo MCD ($8.452 [4.226-16.466] \text{ nm}^2$ vs $8.981 [4.402-21.132] \text{ nm}^2$, $p < 0,0001$) y eran también más elipsoidales ($0,94 [0,88-0,98]$ vs $0,95 [0,91-0,99]$, $p < 0,0001$) que el grupo CNT (Figura 50B y Figura 48). Los coeficientes de variación (%) para la cuantificación, el área y el coeficiente de forma de las vesículas fueron $0,97 \pm 0,53$, $0,46 \pm 1,03$ y $0,25 \pm 0,80$ respectivamente, para la variación intra-observador; y $2,29 \pm 1,60$, $1,16 \pm 1,68$ y $0,65 \pm 1,35$, respectivamente, para la variación inter-observador.

A



B

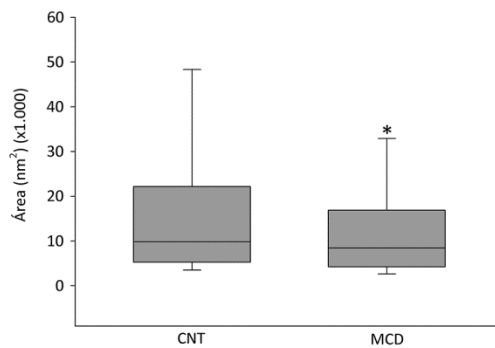


Figura 50. Visualización de vesículas aisladas de Golgi mediante microscopía electrónica de transmisión que muestra una disminución del tamaño del área de pacientes con miocardiopatía dilatada (MCD). A, vesículas de un individuo control (CNT) y de un paciente con MCD. La barra representa 500 nm; B, representación del área de las vesículas aisladas en cada grupo. Las cajas muestran la mediana (línea horizontal), rango intercuartílico (límites superior e inferior de las cajas) y el percentil 5 y 95 (barras de error), * $p < 0,0001$.

3.5. RELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS VESÍCULAS DEL APARATO DE GOLGI CON LA FUNCIÓN VENTRICULAR IZQUIERDA

Se determinó además si existía alguna relación entre la morfología de las vesículas del AG y los cambios en la función ventricular izquierda. Se observó una relación inversa significativa del área de las vesículas del AG con el DTDVI y el DTSVI ($r=-0,828$ y $r=-0,844$ $p<0,05$) y directa con la FE ($r=0,873$, $p<0,01$) (Figura 51). Además, el DTDVI y el DTSVI estaban también directamente relacionados con el número de vesículas ($r=0,831$ y $r=0,803$, $p<0,05$) y con el producto del área y el número ($r=0,820$ y $r=0,784$, $p<0,05$), estando el área de la vesícula y el número inversamente relacionados ($r=-0,846$, $p<0,05$).

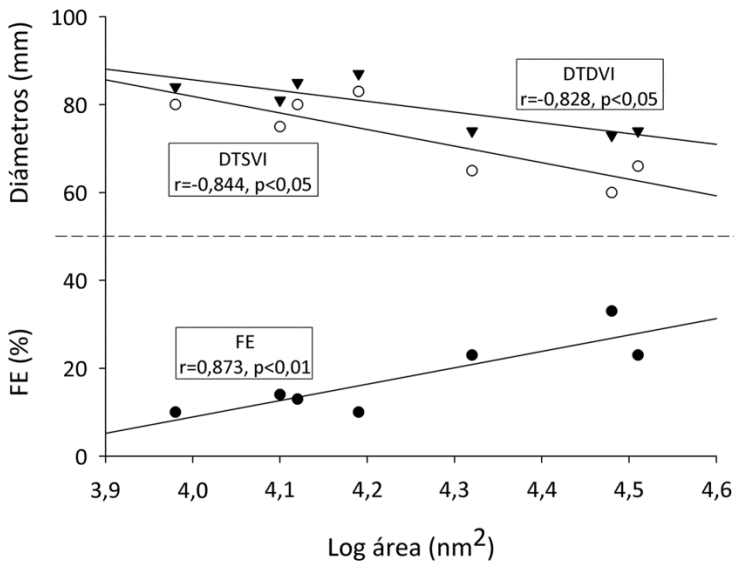


Figura 51. Relación del área de las vesículas aisladas de tejido cardiaco de pacientes con miocardiopatía dilatada y la función ventricular. DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo; FE, fracción de eyección.

También, se determinó la relación entre los genes de transporte vesicular alterados y la función y morfología ventricular izquierda. Encontramos una relación inversa significativa entre *AP1M1* y los DTDVI y DTSVI ($r=-0,724$ y $r=-0,723$, $p<0,01$); y directa con la FE ($r=0,665$, $p<0,05$) (Tabla 15). Del mismo modo, *STX5* mostró una relación directa con el DTDVI ($r=0,699$ y $p<0,05$) y DTSVI ($r=0,720$ y $p<0,01$) e inversa con la FE ($r=-0,627$, $p<0,05$) (Tabla 15).

Tabla 15. Relaciones de los genes de Golgi *AP1M1* y *STX5* con la función y la morfología ventricular izquierda en la miocardiopatía dilatada.

GEN	FE	DTDVI	DTSVI
<i>AP1M1</i>	$r=0,665$	$r=-0,724$	$r=-0,723$
	$p=0,018$	$p=0,008$	$p=0,008$
<i>STX5</i>	$r=-0,627$	$r=0,699$	$r=0,720$
	$p=0,029$	$p=0,011$	$p=0,008$

FE, fracción de eyección; DTDVI, diámetro tele-diastólico del ventrículo izquierdo; DTSVI, diámetro tele-sistólico del ventrículo izquierdo.

Asimismo, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, en el que se identificó al área vesicular, *STX5* y el índice de masa corporal como predictores independientes de la FE, con una $r^2=0,975$ ($p<0,01$). El número de vesículas y *STX5* también fueron identificados como un predictor independiente del DTSVI ($r^2=0,919$, $p=0,01$); y del DTDVI ($r^2=0,914$, $p<0,01$).

V. DISCUSIÓN

1. PRODUCCIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y MOLÉCULAS RELACIONADAS EN EL VENTRÍCULO IZQUIERDO DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

La IC es causada por cualquier condición que reduzca la eficiencia del miocardio a través de daño o sobrecarga. Los PN juegan un importante papel en la regulación de la presión y el volumen sanguíneos (246). BNP es el más ampliamente estudiado en la IC; sin embargo, existen pocos estudios de ANP en tejido ventricular izquierdo, la mayoría de ellos investigan los cambios a nivel de ARNm (247, 248); mientras que algunos reportan importantes limitaciones (77). CNP, por su parte, ejerce efectos significativos fuera del sistema cardiovascular (97, 249, 250), sin embargo, poco se conoce sobre su papel en la IC. En el presente estudio, investigamos la expresión génica diferencial de los PN y sus moléculas relacionadas en tejido ventricular apical de pacientes con MCD y MCI mediante la técnica de RNA-seq. Este es el primer estudio con RNA-seq que analiza simultáneamente el grupo de genes implicados en los efectos biológicos de los PN en corazones humanos. Además, dado que los niveles de ANP en plasma están elevados en la IC, se ha sugerido que ANP podría originarse no solo en aurícula sino también en tejido ventricular izquierdo de estos pacientes (77, 247, 248, 251, 252), por lo que determinamos si los niveles de ANP plasmático podrían aumentar debido a la producción de ANP por el ventrículo izquierdo de estos pacientes, a través de los niveles proteicos de ANP y proANP y sus enzimas relacionadas (corina y furina) en el mismo tejido.

Estudios previos han descrito un incremento de BNP tisular, tanto a nivel proteico como transcripcional, en pacientes con MCI (218). Nuestros

resultados concuerdan con estos hallazgos previos y muestran que el incremento génico también ocurre en la MCD, no encontrando diferencias entre las dos etiologías. En contraste, este incremento no estaba relacionado con un aumento en la expresión génica de las enzimas de escisión (*CORINA* y *FURINA*) o su receptor, *NPR1*. Los niveles plasmáticos de corina se han propuesto como nuevo biomarcador para el diagnóstico de la IC, ya que se han observado niveles inferiores en estos pacientes; esta reducción puede resultar en un deterioro de la escisión (253). También, se ha observado que la expresión de ARNm de *CORINA* está disminuida en la aurícula (254, 255) y su sobreexpresión mejora el remodelado auricular (256). Demostramos que la expresión de ARNm de *CORINA* estaba infra-regulada en el ventrículo izquierdo de pacientes con MCD y MCI. Estos datos sugieren que defectos en la expresión de *CORINA* podrían ser un importante factor que contribuye a la IC.

Además, encontramos que el ARNm de *NPR1* estaba disminuido en pacientes con MCD. Ensayos de la actividad enzimática de *NPR1* en ratas con IC mostraron una reducción similar (257), posiblemente debido a la infra-expresión que nosotros observamos. Esta pérdida o disminución de la expresión génica está asociada con hipertensión esencial e hipertrofia del ventrículo izquierdo (180, 258). Podría ser que el sistema de *NPR1* moderara la respuesta cardíaca al estímulo hipertrófico, produciendo acciones antihipertróficas directas en el corazón. En conjunto, estos resultados sugieren que la reducción de *NPR1* y las enzimas asociadas podría atenuar el efecto de la extensa producción de BNP en la IC. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que también encontramos una

sobre-regulación del ARNm de *NPR3*, el cual promovería la degradación de los PN.

CNP fue descubierto más tarde que BNP, y aislado por primera vez en 1990 (97). En los últimos años, se ha estudiado su posible papel en la IC y se ha propuesto como una nueva diana terapéutica. Estudios previos han mostrado alteraciones en los niveles peptídicos de CNP en tejido cardíaco, plasma y orina de pacientes con IC (259-261). Además, se han observado cambios en CNP a nivel de ARNm en plasma humano y ventrículo izquierdo de un modelo animal de IC (261, 262).

Nuestros resultados están en concordancia con los estudios previos, ya que encontramos cambios en los niveles de ARNm de CNP en tejido ventricular apical de corazones de pacientes trasplantados con IC. Específicamente, observamos un incremento de los niveles de CNP en corazones con MCI comparado con CNT. Sin embargo, no observamos la misma tendencia en el grupo MCD. Esto es interesante, ya que CNP, junto con su receptor *NPR3*, se han propuesto como nueva diana en el tratamiento de trastornos cardiovasculares isquémicos (263). Se ha demostrado que esta vía representa un mecanismo de protección contra la lesión por isquemia/reperfusión, reduciendo el tamaño del infarto y manteniendo la presión de perfusión coronaria y la presión ventricular izquierda desarrollada en niveles preisquémicos (263).

Los efectos positivos de CNP podrían ser debidos a la activación de *NPR2*, aunque la infra-expresión del ARNm de *NPR2* se ha descrito en los ventrículos de cerdos enanos con IC inducida por estimulación (261). Estudios enzimológicos realizados en ratas han mostrado que la actividad

de *NPR2* se mantiene e incluso se incrementa en la IC (257). Nuestros resultados no muestran variación en los niveles de ARNm de *NPR2* en las cardiopatías estudiadas. Esta falta de cambio podría reducir la disminución de *NPR1*, ya que a altas concentraciones de péptido se produce reactividad cruzada (114, 264).

Determinamos además la expresión de proANP y ANP mediante técnicas de Western blot y hemos encontrado ambas formas moleculares en tejido ventricular izquierdo de todos los grupos. Por tanto, concluimos que las formas de ANP están presentes en tejido ventricular adulto, aunque los niveles más altos se encuentren en etapas fetales y disminuyan durante el progreso de la gestación en corazones en desarrollo (77, 79, 265). También encontramos que la forma proANP predomina sobre la forma ANP en el grupo MCD, mientras que ocurría lo contrario en el grupo MCI. Esto es consistente con nuestro hallazgo de que corina estaba elevada en el grupo MCI pero no el grupo MCD. Previamente, se ha reportado que los cambios en los niveles de corina afectan a los niveles de proANP y ANP en plasma (253). Por tanto, mayores cantidades de enzima escindirán más proANP, incrementando los niveles de ANP.

La bibliografía incluye estudios de aumentos de ARNm de proANP en ventrículo izquierdo, algo que podemos observar también con los experimentos de RNA-seq. Esta técnica proporciona una medida mucho más precisa de los niveles de transcritos que la tecnología de microarrays (266). Sin embargo, nuestras observaciones indican que no hay diferencias en los niveles proteicos de proANP y ANP en tejido ventricular izquierdo de estas dos etiologías comparados con CNT como es también el caso de CNP;

y BNP en la MCD. Además, un estudio reciente en un modelo animal experimental de IC, muestra niveles proteicos de ANP similares en ventrículo izquierdo comparado con CNT (254). Por lo que podría existir regulación a nivel del ARNm que prevenga que estos cambios sean observados a nivel proteico. En este sentido, Arora *et al* han descubierto recientemente que el microRNA-425 se une de forma específica de alelo a *NPPA*, actuando como un regulador negativo en la producción de ANP (267). Este mecanismo u otro similar podría estar sobre-expresado, produciendo la discrepancia entre los niveles de ARNm y proteína: indicando que al menos, en el área del ápex del ventrículo izquierdo donde recogemos nuestras muestras, la producción de PN no está incrementada. En consecuencia, el incremento de este péptido observado en plasma podría ser debido a su síntesis en otras áreas del miocardio. Sin embargo, Bloch *et al* observaron que la secreción de ANP difiere entre los cardiomiocitos de la aurícula y el ventrículo. Las células auriculares almacenan los péptidos en glándulas secretoras, mientras las células ventriculares rápidamente secretan el péptido después de su síntesis (79). En base a esto, especulamos que podría haber un incremento de la síntesis ventricular de PN no observable a nivel proteico debido a la rápida secreción a plasma, contribuyendo así a los elevados niveles del péptido en la IC. La producción de ANP en el ventrículo izquierdo revelaría que el incremento de los niveles plasmáticos no solo se debe a la distensión de las fibras auriculares si no que tal vez también a un potencial estrés de pared ventricular o una lesión isquémica focal.

Estudios previos han establecido una correlación entre las formas de los PN en plasma (266, 268). En este sentido, encontramos una fuerte asociación

entre proBNP y BNP en ambas etiologías. Además proANP y ANP están asociados en el grupo MCD, pero sin embargo, esta correlación no se observó en el grupo MCI. Por ello, creemos que los altos niveles de corina podrían modificar la relación entre estos dos péptidos, lo que sería coherente con la correlación que encontramos entre ANP y corina en el grupo MCI. Además, encontramos una fuerte relación entre proANP y corina en ambas etiologías pero no con furina. Esto va en el mismo sentido que estudios previos que indican que corina puede procesar proANP y proBNP, aunque para el último de forma menos eficientemente, mientras que furina procesa solamente proBNP (91, 147). Sin embargo, existen pocos estudios de los niveles cardiacos del ARNm de *FURINA*, y estos muestran un incremento en las concentraciones en la aurícula (254, 269). Observamos un aumento en los niveles de furina en tejido ventricular izquierdo apical de pacientes con MCI, a pesar de que los niveles génicos están disminuidos en estos pacientes. Posiblemente debido a modificaciones post-transcripcionales que tienen lugar en el ARNm de esta enzima.

Por otra parte, la función ventricular izquierda está estrechamente relacionada con el remodelado ventricular que ocurre en la progresión de la IC, determinando su curso clínico. Un proceso de remodelado a largo plazo se convierte en perjudicial llevando a una descompensación cardiaca progresiva (270). En este sentido, encontramos que *NPPC* estaba inversamente relacionado con la FE y la FA en el grupo MCI, en otras palabras, mayor expresión del ARNm de *NPPC* está relacionada con la disfunción ventricular izquierda. Estos hallazgos apoyan el uso de *NPPC* como una nueva diana en el tratamiento de trastornos cardiovasculares isquémicos como se sugiere por sus efectos protectores sobre la lesión por

isquemia/reperfusión (263). Por tanto, nuestra observación puede proporcionar un nuevo enfoque para explorar el restablecimiento de la función ventricular de pacientes con IC. Además, los diferentes cambios de expresión dependiendo de la etiología podrían ser utilizados como herramienta diagnóstica. Por otro lado, también encontramos que corina estaba inversamente relacionada con la FE solo en el grupo MCI, por lo que mayores niveles de corina están asociados con el deterioro de la función ventricular izquierda. Esto coincide con nuestros datos ya que corina esta alterada significativamente en este grupo pero no en el grupo MCD.

En resumen, este es el primer estudio que presenta datos de los niveles de ARNm de los genes de los PN y las moléculas implicadas en su biología mediante RNA-seq. Este estudio muestra una expresión diferencial del gen de CNP en tejido cardiaco de pacientes con MCD y MCI. *NPPC* y su endoproteasa *FURINA* cambian su expresión solo en tejido ventricular izquierdo de pacientes isquémicos. Ambos grupos presentan expresión elevada del ARNm de *NPPA* y *NPPB*; y de *NPPC* en el grupo MCI. Pero no observamos el incremento de sus niveles proteicos, lo que podría ser debido a una regulación posttranscripcional o a diferentes vías de secreción de los péptidos entre la aurícula y el ventrículo. Por otra parte, observamos diferencias entre las dos etiologías en los niveles de corina, indicando que podría existir un mecanismo molecular diferente que converja en este síndrome. Además, la función ventricular izquierda está inversamente relacionada con los niveles ventriculares de corina y *NPPC* en pacientes con MCI. Estos resultados podrían proporcionar nuevas opciones diagnósticas y terapéuticas específicas de la etiología de la IC.

2. SECRECIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN EL VENTRÍCULO IZQUIERDO DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA

En este estudio presentamos por primera vez el aislamiento de las vesículas del AG a partir de tejido cardíaco humano, lo cual ha sido esencial para el desarrollo de esta parte de la tesis doctoral y nos ha permitido ofrecer varias aportaciones al conocimiento de la biología de los PN. Principalmente, hemos proporcionado un papel al AG en la fisiología de los PN que afecta a su tráfico.

El complejo de Golgi representa la estación central de procesamiento y clasificación proteica de la vía secretora. Y como se ha visto en modelos animales, la secreción de los PN parece depender de la ubicación cardíaca. En las aurículas, BNP se almacena en gránulos junto con ANP, mientras que en el ventrículo, la producción de BNP es regulada transcripcionalmente en respuesta a estados de estrés cardíaco, como la sobrecarga de volumen (76) y ANP se secreta rápidamente una vez sintetizado (79). CNP es menos conocido, pero al menos el CNP sintetizado en los condrocitos de rata es inmediatamente secretado al medio circundante sin almacenamiento intracelular (76, 99). En este sentido, y dado que hemos visto que los niveles proteicos de PN no se alteran en el tejido ventricular de pacientes con MCD, creemos que podría haber un aumento en la síntesis ventricular de PN no observable a nivel de proteína, debido a una mayor tasa de secreción a plasma, como resultado de una alteración en el AG de estos corazones patológicos.

En este contexto, tras confirmar por Western blot que los niveles de los péptidos en homogenado total de pacientes con MCD no estaban elevados, fuimos capaces de aislar vesículas secretoras del AG, que contenían mayores niveles de PN en el grupo de pacientes con MCD. Esto sugiere que existe una alteración general de la secreción de PN ya que los tres péptidos están elevados en plasma de pacientes con IC (1, 2, 271). A menudo, es importante aislar componentes de la célula para estudiar su estructura, composición o función en detalle. En este sentido, se muestra por primera vez el aislamiento de las vesículas del AG a partir de tejido cardíaco humano. Simplificar el complejo entorno subcelular nos permitió investigar los niveles de PN y la morfología de las vesículas fuera del complejo entorno del cardiomiocito.

Además, nuestra hipótesis de alteración de la dinámica de la secreción de los PN también es apoyada por las variaciones encontradas en la morfología de las vesículas. Se observó una diferencia entre los grupos de MCD y CNT, similar a lo que otros autores han observado anteriormente en otros tipos de vesículas (272). Encontramos vesículas de menor tamaño y más elipsoidales en el grupo de MCD que podría indicar una mayor tasa en la producción de vesículas para una rápida secreción, incrementando los niveles plasmáticos de PN, característico de estos pacientes. La tasa de producción y secreción afectaría, en parte, a la forma y el tamaño de las vesículas responsables de la secreción de todas las proteínas, siendo el área de las vesículas predictor independiente de la FE y el DTSVI en estos pacientes, por tanto, vesículas más pequeñas están asociadas con empeoramiento de la función. Estos resultados concuerdan con la morfología de las vesículas del grupo CNT; que son más grandes y esféricas.

Además, comprobamos a través de un cribado de expresión a gran escala mediante RNA-seq que tal alteración en los componentes del AG existía. Encontramos 134 genes alterados relacionados con el AG, 15 de los cuales estuvieron involucrados en la secreción vesicular y no habían sido descritos previamente en MCD. Estos resultados podrían ser responsables de la alteración que observamos en la secreción de los PN, ya que la intensa investigación morfológica del AG (273) en la IC ha demostrado previamente en modelos animales que su tamaño y complejidad se incrementan en cardiomiocitos (204-206) y también, que los gránulos de secreción que contienen los PN sufren alteraciones en este síndrome (205-207). Por otro lado, se destaca la relación de los genes de Golgi *AP1M1* y *STX5* con la función ventricular izquierda. Así, ambos genes podrían haber alterado su expresión con el fin de disminuir los diámetros ventriculares y, por tanto, mejorar la función ventricular, destacando la participación de estos nuevos genes alterados en la enfermedad cardíaca dilatada. *STX5* es también un predictor independiente de la FE y los DTSVI y DTDVI en estos pacientes.

En la IC, aumenta la demanda de PN para regular la homeostasis del volumen y la presión sanguíneas. Esta demanda se traduce en un aumento de los factores de transcripción que regulan su expresión, como nuestro grupo observó previamente con *GATA4* en la MCD (274); y una síntesis más rápida de PN que se ha atribuido al estrés del RE (275). Además, existen cambios en la respuesta al estrés del RE y la conformación de las proteínas, donde la mayoría de los componentes se incrementan en MCD (276). También se ha sugerido que ante una gran cantidad de proteína, el AG activa una vía de respuesta al estrés que induce la transcripción de genes implicados en su función (277), donde este estrés puede causar las

alteraciones que hemos observado en los componentes del AG en la MCD, y también los cambios en el número y la morfología de las vesículas para responder a la demanda creciente de PN.

En resumen, encontramos un aumento en las concentraciones de PN en vesículas del AG, no observables en tejido total, mediante un procedimiento no llevado a cabo en humanos hasta ahora. Por otra parte, encontramos cambios en la expresión génica de los componentes del AG, así como en el número y la morfología de sus vesículas que se relacionan con la función ventricular izquierda y la tasa de secreción de los PN. Estos hallazgos proporcionan a este órgano un papel importante en la biología de los PN, regulando el régimen de secreción al que están sometidos estos pacientes; y en el proceso de adaptación cardiovascular morfológica y funcional que experimentan.

VI. CONCLUSIONES

1. En nuestro grupo de pacientes con insuficiencia cardiaca los niveles génicos de ANP, BNP y el receptor *NPR3* se encuentran elevados y los niveles de *CORINA* disminuidos sin que se detecte variación en la expresión proteica de ANP y CNP tisular.
2. Solo en los pacientes con miocardiopatía isquémica la expresión génica de CNP y la expresión proteica de corina reflejan el deterioro de la función ventricular izquierda. Además muestran elevación de la expresión de BNP, corina y el ARNm de CNP y disminución del ARNm de *FURINA*, indetectable en el resto de pacientes afectos del síndrome.
3. Hemos aislado por primera vez las vesículas del aparato de Golgi de tejido cardiaco en las cuales detectamos un importante incremento de la concentración de péptidos natriuréticos ANP, BNP y CNP, a diferencia de lo que ocurre cuando estudiamos todo el tejido miocárdico.
4. Encontramos cambios en la expresión génica de los componentes del aparato de Golgi implicados en la secreción, así como, de sus vesículas que reflejan en su número y morfología el deterioro funcional y el aumento de tráfico de péptidos natriuréticos hacia el plasma.

VII. REFERENCIAS

1. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012;33(14):1787-847.
2. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(16):e147-239.
3. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 2008;29(19):2388-442.
4. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26(11):1115-40.
5. Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, *et al.* Executive summary of the guidelines on the diagnosis and

treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005;26(4):384-416.

6. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007;93(9):1137-46.

7. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* 2003;289(2):194-202.

8. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, *et al.* Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 1999;20(6):447-55.

9. Sayago-Silva I, Garcia-Lopez F, Segovia-Cubero J. Epidemiology of heart failure in Spain over the last 20 years. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2013;66(8):649-56.

10. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, *et al.* Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J* 1999;20(6):421-8.

11. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Deckers JW, *et al.* Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2004;25(18):1614-9.

12. Cost B. Heart Failure in the Elderly (Ph.D. thesis). Erasmus University Rotterdam; 2000. Available from: <http://hdl.handle.net/1765/21280>.

13. Stewart S, Ekman I, Ekman T, Oden A, Rosengren A. Population impact of heart failure and the most common forms of cancer: a study of 1 162 309 hospital cases in Sweden (1988 to 2004). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2010;3(6):573-80.
14. Schaufelberger M, Swedberg K, Koster M, Rosen M, Rosengren A. Decreasing one-year mortality and hospitalization rates for heart failure in Sweden; Data from the Swedish Hospital Discharge Registry 1988 to 2000. *Eur Heart J* 2004;25(4):300-7.
15. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3(3):315-22.
16. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, *et al.* Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113(14):1807-16.
17. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, *et al.* Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93(5):841-2.
18. Burke A, Tavora F. Practical cardiovascular pathology. Wolter Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

19. Grogan M, Redfield MM, Bailey KR, Reeder GS, Gersh BJ, Edwards WD, *et al.* Long-term outcome of patients with biopsy-proved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995;26(1):80-4.
20. Kadenbach B, Ramzan R, Moosdorf R, Vogt S. The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. *Mitochondrion* 2011;11(5):700-6.
21. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
22. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385(9963):117-71.
23. Kemp CD, Conte JV. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* 2012;21(5):365-71.
24. Porth C. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
25. Klabunde R. Cardiovascular Physiology Concepts. Wolters Kluwer Health; 2011.
26. Westerhof N, O'Rourke MF. Haemodynamic basis for the development of left ventricular failure in systolic hypertension and for its logical therapy. *J Hypertens* 1995;13(9):943-52.

27. Lee CS, Tkacs NC. Current concepts of neurohormonal activation in heart failure: mediators and mechanisms. *AACN Adv Crit Care* 2008;19(4):364-85; quiz 86-7.
28. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald. Tratado de cardiología + ExpertConsult: Texto de medicina cardiovascular. Elsevier Health Sciences Spain; 2012.
29. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A, International Society of H. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 2008;371(9623):1513-8.
30. MacDonald MR, Petrie MC, Hawkins NM, Petrie JR, Fisher M, McKelvie R, *et al.* Diabetes, left ventricular systolic dysfunction, and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2008;29(10):1224-40.
31. MacDonald MR, Petrie MC, Varyani F, Ostergren J, Michelson EL, Young JB, *et al.* Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. *Eur Heart J* 2008;29(11):1377-85.
32. De Groot P, Lamblin N, Mouquet F, Plichon D, McFadden E, Van Belle E, *et al.* Impact of diabetes mellitus on long-term survival in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J* 2004;25(8):656-62.
33. Howard BV, Cowan LD, Go O, Welty TK, Robbins DC, Lee ET. Adverse effects of diabetes on multiple cardiovascular disease risk factors in women. The Strong Heart Study. *Diabetes Care* 1998;21(8):1258-65.

34. Gopal DM, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Smith AL, Bauer DC, Newman AB, *et al.* Cigarette smoking exposure and heart failure risk in older adults: the Health, Aging, and Body Composition Study. *Am Heart J* 2012;164(2):236-42.
35. Wellons M, Ouyang P, Schreiner PJ, Herrington DM, Vaidya D. Early menopause predicts future coronary heart disease and stroke: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause* 2012;19(10):1081-7.
36. Ebong IA, Watson KE, Goff DC, Jr., Bluemke DA, Srikanthan P, Horwich T, *et al.* Age at menopause and incident heart failure: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause* 2014;21(6):585-91.
37. Burnett JC, Jr., Kao PC, Hu DC, Hesser DW, Heublein D, Granger JP, *et al.* Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 1986;231(4742):1145-7.
38. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, *et al.* Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993;87(2):464-9.
39. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, *et al.* Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994;90(1):195-203.
40. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, *et al.* Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004;350(7):655-63.

41. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, *et al.* Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347(3):161-7.
42. Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, *et al.* A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(2):386-91.
43. Harrison A, Morrison LK, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Dao Q, *et al.* B-type natriuretic peptide predicts future cardiac events in patients presenting to the emergency department with dyspnea. *Ann Emerg Med* 2002;39(2):131-8.
44. Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP, *et al.* Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003;107(9):1278-83.
45. Fonarow GC, Peacock WF, Phillips CO, Givertz MM, Lopatin M, Committee ASA, *et al.* Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(19):1943-50.
46. Fisher C, Berry C, Blue L, Morton JJ, McMurray J. N-terminal pro B type natriuretic peptide, but not the new putative cardiac hormone relaxin, predicts prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart* 2003;89(8):879-81.
47. Groenning BA, Raymond I, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Pedersen F. Diagnostic and prognostic evaluation of left ventricular systolic

heart failure by plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations in a large sample of the general population. *Heart* 2004;90(3):297-303.

48. Gardner RS, Ozalp F, Murday AJ, Robb SD, McDonagh TA. N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2003;24(19):1735-43.

49. Hartmann F, Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Krum H, Mohacsi P, *et al.* Prognostic impact of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe chronic congestive heart failure: a substudy of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial. *Circulation* 2004;110(13):1780-6.

50. Stanton E, Hansen M, Wijeyesundera HC, Kupchak P, Hall C, Rouleau JL, *et al.* A direct comparison of the natriuretic peptides and their relationship to survival in chronic heart failure of a presumed non-ischaemic origin. *Eur J Heart Fail* 2005;7(4):557-65.

51. Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayes-Genis A, Ordonez-Llanos J, Santalo-Bel M, *et al.* NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* 2006;27(3):330-7.

52. Morrow DA, de Lemos JA, Blazing MA, Sabatine MS, Murphy SA, Jarolim P, *et al.* Prognostic value of serial B-type natriuretic peptide testing during follow-up of patients with unstable coronary artery disease. *JAMA* 2005;294(22):2866-71.

53. Gardner RS, Chong KS, Morton JJ, McDonagh TA. A change in N-terminal pro-brain natriuretic peptide is predictive of outcome in patients with advanced heart failure. *Eur J Heart Fail* 2007;9(3):266-71.
54. Pascual-Figal DA, Domingo M, Casas T, Gich I, Ordonez-Llanos J, Martinez P, *et al.* Usefulness of clinical and NT-proBNP monitoring for prognostic guidance in destabilized heart failure outpatients. *Eur Heart J* 2008;29(8):1011-8.
55. Murdoch DR, McDonagh TA, Byrne J, Blue L, Farmer R, Morton JJ, *et al.* Titration of vasodilator therapy in chronic heart failure according to plasma brain natriuretic peptide concentration: randomized comparison of the hemodynamic and neuroendocrine effects of tailored versus empirical therapy. *Am Heart J* 1999;138(6 Pt 1):1126-32.
56. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000;355(9210):1126-30.
57. Al-Meslmani BM, Fahoum SK, Shamia MG. NT-proBNP in monitoring treatment of patients with congestive heart failure. *Clin Lab* 2007;53(1-2):35-9.
58. Troughton RW, Richards AM. Outpatient monitoring and treatment of chronic heart failure guided by amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement. *Am J Cardiol* 2008;101(3A):72-5.
59. Baran D, Horn EM, Hryniewicz K, Katz SD. Effects of beta-blockers on neurohormonal activation in patients with congestive heart failure. *Drugs* 2000;60(5):997-1016.

60. Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Troughton RW, Yandle TG. BNP in hormone-guided treatment of heart failure. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13(4):151-5.
61. Yoshizawa A, Yoshikawa T, Nakamura I, Satoh T, Moritani K, Suzuki M, *et al.* Brain natriuretic peptide response is heterogeneous during beta-blocker therapy for congestive heart failure. *J Card Fail* 2004;10(4):310-5.
62. Latini R, Masson S, Anand I, Judd D, Maggioni AP, Chiang YT, *et al.* Effects of valsartan on circulating brain natriuretic peptide and norepinephrine in symptomatic chronic heart failure: the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2002;106(19):2454-8.
63. Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, *et al.* Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* 1986;78(5):1362-74.
64. Fifer MA, Molina CR, Quiroz AC, Giles TD, Herrmann HC, De Scheerder IR, *et al.* Hemodynamic and renal effects of atrial natriuretic peptide in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1990;65(3):211-6.
65. Kitashiro S, Sugiura T, Takayama Y, Tsuka Y, Izuoka T, Tokunaga S, *et al.* Long-term administration of atrial natriuretic peptide in patients with acute heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33(6):948-52.
66. Fonarow GC. B-type natriuretic peptide: spectrum of application. Nesiritide (recombinant BNP) for heart failure. *Heart Fail Rev* 2003;8(4):321-5.

67. Sackner-Bernstein JD, Kowalski M, Fox M, Aaronson K. Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005;293(15):1900-5.
68. Sackner-Bernstein JD, Skopicki HA, Aaronson KD. Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure. *Circulation* 2005;111(12):1487-91.
69. Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, *et al.* C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(4):608-16.
70. Takei Y, Hirose S. The natriuretic peptide system in eels: a key endocrine system for euryhalinity? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282(4):R940-51.
71. Tota B, Cerra MC, Gattuso A. Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a 'whip-brake' system of the endocrine heart. *J Exp Biol* 2010;213(Pt 18):3081-103.
72. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006;27(1):47-72.
73. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28(1):89-94.

74. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 2011;57(2):131-40.
75. Bloch KD, Scott JA, Zisfein JB, Fallon JT, Margolies MN, Seidman CE, *et al.* Biosynthesis and secretion of proatrial natriuretic factor by cultured rat cardiocytes. *Science* 1985;230(4730):1168-71.
76. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol* 2009(191):341-66.
77. Tsuchimochi H, Kurimoto F, Ieki K, Koyama H, Takaku F, Kawana M, *et al.* Atrial natriuretic peptide distribution in fetal and failed adult human hearts. *Circulation* 1988;78(4):920-7.
78. Gardner DG, Vlasuk GP, Baxter JD, Fiddes JC, Lewicki JA. Identification of atrial natriuretic factor gene transcripts in the central nervous system of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(8):2175-9.
79. Bloch KD, Seidman JG, Naftilan JD, Fallon JT, Seidman CE. Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secretory pathways. *Cell* 1986;47(5):695-702.
80. Bilder GE, Schofield TL, Blaine EH. Release of atrial natriuretic factor. Effects of repetitive stretch and temperature. *Am J Physiol* 1986;251(5 Pt 2):F817-21.
81. Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T. Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 1985;314(6008):264-6.

82. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC, Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ Res* 1988;62(2):191-5.
83. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* 1988;66(17):752-9.
84. Sugawara A, Nakao K, Morii N, Yamada T, Itoh H, Shiono S, *et al.* Synthesis of atrial natriuretic polypeptide in human failing hearts. Evidence for altered processing of atrial natriuretic polypeptide precursor and augmented synthesis of beta-human ANP. *J Clin Invest* 1988;81(6):1962-70.
85. Akimoto K, Miyata A, Kangawa K, Koga Y, Hayakawa K, Matsuo H. Molecular forms of atrial natriuretic peptide in the atrium of patients with cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(1):93-7.
86. Moertl D, Berger R, Struck J, Gleiss A, Hammer A, Morgenthaler NG, *et al.* Comparison of midregional pro-atrial and B-type natriuretic peptides in chronic heart failure: influencing factors, detection of left ventricular systolic dysfunction, and prediction of death. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(19):1783-90.
87. Dieplinger B, Gegenhuber A, Haltmayer M, Mueller T. Evaluation of novel biomarkers for the diagnosis of acute destabilised heart failure in patients with shortness of breath. *Heart* 2009;95(18):1508-13.
88. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332(6159):78-81.

89. Saito Y, Nakao K, Itoh H, Yamada T, Mukoyama M, Arai H, *et al.* Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158(2):360-8.
90. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, *et al.* Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* 1994;93(5):1911-21.
91. Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, Postnikov AB, Karpova NS, Serebryanaya DV, *et al.* Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. *Clin Chem* 2010;56(7):1166-76.
92. Nakayama K. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 1997;327 (Pt 3):625-35.
93. Nishikimi T, Minamino N, Ikeda M, Takeda Y, Tadokoro K, Shibasaki I, *et al.* Diversity of molecular forms of plasma brain natriuretic peptide in heart failure--different proBNP-108 to BNP-32 ratios in atrial and ventricular overload. *Heart* 2010;96(6):432-9.
94. Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14(5):3115-29.
95. Thuerlauf DJ, Hanford DS, Glembotski CC. Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 1994;269(27):17772-5.

96. Gerbes AL, Dagnino L, Nguyen T, Nemer M. Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(6):1307-11.
97. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168(2):863-70.
98. Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem* 2003;278(28):25847-52.
99. Hagiwara H, Sakaguchi H, Itakura M, Yoshimoto T, Furuya M, Tanaka S, *et al.* Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B. *J Biol Chem* 1994;269(14):10729-33.
100. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, *et al.* Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest* 1992;90(3):1145-9.
101. Suga S, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Yoshimasa T, *et al.* Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* 1993;133(6):3038-41.
102. Chun TH, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, *et al.* Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension* 1997;29(6):1296-302.

103. Igaki T, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Ogawa Y, Doi K, *et al.* Insulin suppresses endothelial secretion of C-type natriuretic peptide, a novel endothelium-derived relaxing peptide. *Diabetes* 1996;45 Suppl 3:S62-4.
104. Kawakoshi A, Hyodo S, Nozaki M, Takei Y. Identification of a natriuretic peptide (NP) in cyclostomes (lamprey and hagfish): CNP-4 is the ancestral gene of the NP family. *Gen Comp Endocrinol* 2006;148(1):41-7.
105. Inoue K, Naruse K, Yamagami S, Mitani H, Suzuki N, Takei Y. Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(17):10079-84.
106. Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992;267:13928-32.
107. Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW, *et al.* Presence of *Dendroaspis* natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc* 1999;74(2):126-30.
108. Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Cameron AV, Yandle TG. *Dendroaspis* natriuretic peptide: endogenous or dubious? *Lancet* 2002;359(9300):5-6.
109. Lisy O, Jougasaki M, Heublein DM, Schirger JA, Chen HH, Wennberg PW, *et al.* Renal actions of synthetic *dendroaspis* natriuretic peptide. *Kidney Int* 1999;56(2):502-8.

110. Chen HH, Lainchbury JG, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(6):1186-91.
111. Takei Y, Takahashi A, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S. A novel natriuretic peptide isolated from eel cardiac ventricles. *FEBS Lett* 1991;282(2):317-20.
112. Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K. Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246(3):736-9.
113. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339(5):321-8.
114. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, *et al.* Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992;130(1):229-39.
115. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* 1998;18(4):2164-72.
116. Potter LR, Garbers DL. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem* 1992;267(21):14531-4.
117. Potter LR, Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* 1994;269(20):14636-42.

118. Pandey KN. Intracellular trafficking and metabolic turnover of ligand-bound guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A into subcellular compartments. *Mol Cell Biochem* 2002;230(1-2):61-72.
119. Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, Potter LR. Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. *Mol Pharmacol* 2005;67(1):174-83.
120. Koh GY, Nussenzveig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T. Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *J Biol Chem* 1992;267(17):11987-94.
121. Vieira MA, Gao M, Nikonova LN, Maack T. Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors. *J Biol Chem* 2001;276(39):36438-45.
122. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, *et al.* The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 1989;58(6):1155-62.
123. Lowe DG, Klisak I, Sparkes RS, Mohandas T, Goeddel DV. Chromosomal distribution of three members of the human natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase gene family. *Genomics* 1990;8(2):304-12.
124. Rehemudula D, Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Uwabo J, Sato M, *et al.* Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension. *Circ Res* 1999;84(5):605-10.

125. Potter LR, Hunter T. Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 1998;273(25):15533-9.
126. Potter LR. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization. *Biochemistry* 1998;37(8):2422-9.
127. Potter LR, Hunter T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *J Biol Chem* 2000;275(40):31099-106.
128. Potthast R, Abbey-Hosch SE, Antos LK, Marchant JS, Kuhn M, Potter LR. Calcium-dependent dephosphorylation mediates the hyperosmotic and lysophosphatidic acid-dependent inhibition of natriuretic peptide receptor-B/guanylyl cyclase-B. *J Biol Chem* 2004;279(47):48513-9.
129. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, *et al.* Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem* 1988;263:9395-401.
130. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Kosuge K, Aoi N, Izumi Y, *et al.* Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene. *Endocrine* 2002;17(2):85-90.
131. Leitman DC, Andresen JW, Kuno T, Kamisaki Y, Chang JK, Murad F. Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1986;261:11650-5.

132. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1997;15(11):1235-43.
133. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:796-803.
134. Suga S, Nakao K, Kishimoto I, Hosoda K, Mukoyama M, Arai H, *et al.* Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1992;71(1):34-9.
135. Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 1990;265(34):20952-8.
136. He X, Chow D, Martick MM, Garcia KC. Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* 2001;293(5535):1657-62.
137. Richards AM, Crozier IG, Holmes SJ, Espiner EA, Yandle TG, Frampton C. Brain natriuretic peptide: natriuretic and endocrine effects in essential hypertension. *J Hypertens* 1993;11(2):163-70.
138. Nakao K, Sugawara A, Morii N, Sakamoto M, Yamada T, Itoh H, *et al.* The pharmacokinetics of alpha-human atrial natriuretic polypeptide in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1986;31(1):101-3.
139. Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, Cuneo R, Espiner EA, Livesey JH. Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. *Life Sci* 1986;38(20):1827-33.

140. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(6):1428-35.
141. Yan W, Sheng N, Seto M, Morser J, Wu Q. Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart. *J Biol Chem* 1999;274(21):14926-35.
142. Hooper JD, Scarman AL, Clarke BE, Normyle JF, Antalis TM. Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. *Eur J Biochem* 2000;267(23):6931-7.
143. Pan J, Hinzmann B, Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Genomic structures of the human and murine corin genes and functional GATA elements in their promoters. *J Biol Chem* 2002;277(41):38390-8.
144. Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH, *et al.* Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(2-3):237-58.
145. Park Y. TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2010;14:1163-5.
146. Knappe S, Wu F, Masikat MR, Morser J, Wu Q. Functional analysis of the transmembrane domain and activation cleavage of human corin: design and characterization of a soluble corin. *J Biol Chem* 2003;278(52):52363-70.
147. Wu Q, Xu-Cai YO, Chen S, Wang W. Corin: new insights into the natriuretic peptide system. *Kidney Int* 2009;75(2):142-6.

148. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(15):8525-9.
149. Roebroek AJ, Schalken JA, Leunissen JA, Onnekink C, Bloemers HP, Van de Ven WJ. Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J* 1986;5(9):2197-202.
150. Fuller RS, Brake AJ, Thorner J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 1989;246(4929):482-6.
151. Denault JB, Leduc R. Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett* 1996;379(2):113-6.
152. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(10):753-66.
153. Anderson ED, Molloy SS, Jean F, Fei H, Shimamura S, Thomas G. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* 2002;277(15):12879-90.
154. Seidah NG, Chretien M, Day R. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* 1994;76(3-4):197-209.
155. Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase:

localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* 1994;13(1):18-33.

156. Vey M, Schafer W, Berghofer S, Klenk HD, Garten W. Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 2):1829-42.

157. Jones BG, Thomas L, Molloy SS, Thulin CD, Fry MD, Walsh KA, *et al.* Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J* 1995;14(23):5869-83.

158. Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, *et al.* Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 1991;266(19):12127-30.

159. Tawaragi Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175(2):645-51.

160. Kerr MA, Kenny AJ. The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 1974;137(3):489-95.

161. Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 1974;137(3):477-88.

162. D'Adamio L, Shipp MA, Masteller EL, Reinherz EL. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral

endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(18):7103-7.

163. Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993;45(1):87-146.

164. Saido TC. Metabolism of amyloid β peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences* 2013;89(7):321-39.

165. Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 1997;11(5):355-64.

166. Mangiafico S, Costello-Boerrigter LC, Andersen IA, Cataliotti A, Burnett JC, Jr. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur Heart J* 2013;34(12):886-93c.

167. Stephenson SL, Kenny AJ. The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 1987;243(1):183-7.

168. Stephenson SL, Kenny AJ. Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem J* 1987;241(1):237-47.

169. Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990;265(24):14150-5.

170. Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 1993;291 (Pt 1):83-8.
171. Hunt PJ, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM, Yandle TG. Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(11):3871-6.
172. Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, *et al.* Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1991;84(4):1581-8.
173. Wada A, Tsutamoto T, Matsuda Y, Kinoshita M. Cardiorenal and neurohumoral effects of endogenous atrial natriuretic peptide in dogs with severe congestive heart failure using a specific antagonist for guanylate cyclase-coupled receptors. *Circulation* 1994;89(5):2232-40.
174. Moro C, Lafontan M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(3):H358-68.
175. Zeidel ML, Kikeri D, Silva P, Burrowes M, Brenner BM. Atrial natriuretic peptides inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. *J Clin Invest* 1988;82(3):1067-74.
176. Light DB, Schwiebert EM, Karlson KH, Stanton BA. Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells. *Science* 1989;243(4889):383-5.

177. Zeidel ML. Regulation of collecting duct Na⁺ reabsorption by ANP 31-67. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22(2):121-4.
178. Dillingham MA, Anderson RJ. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science* 1986;231(4745):1572-3.
179. Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987;326(6114):697-8.
180. Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, *et al.* Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 2001;107:975-84.
181. Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2703-6.
182. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, *et al.* Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4239-44.
183. Wang Y, de Waard MC, Sterner-Kock A, Stepan H, Schultheiss HP, Duncker DJ, *et al.* Cardiomyocyte-restricted over-expression of C-type natriuretic peptide prevents cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction in mice. *Eur J Heart Fail* 2007;9(6-7):548-57.
184. Antunes-Rodrigues J, McCann SM, Rogers LC, Samson WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water

intake in the conscious, unrestrained rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(24):8720-3.

185. Itoh H, Nakao K, Katsuura G, Morii N, Shiono S, Sakamoto M, *et al.* Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1986;59(3):342-7.

186. Samson WK, Aguila MC, Martinovic J, Antunes-Rodrigues J, Norris M. Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. *Peptides* 1987;8(3):449-54.

187. Schultz HD, Gardner DG, Deschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC. Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* 1988;255(1 Pt 2):R6-13.

188. Steele MK, Gardner DG, Xie PL, Schultz HD. Interactions between ANP and ANG II in regulating blood pressure and sympathetic outflow. *Am J Physiol* 1991;260(6 Pt 2):R1145-51.

189. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, *et al.* Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(7):4016-21.

190. Tsuji T, Kunieda T. A loss-of-function mutation in natriuretic peptide receptor 2 (*Npr2*) gene is responsible for disproportionate dwarfism in *cn/cn* mouse. *J Biol Chem* 2005;280(14):14288-92.

191. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, *et al.* Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med* 2004;10(1):80-6.

192. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, Prickett TC, Espiner EA, Potter LR, *et al.* Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(4):1229-32.
193. Itoh T, Nagaya N, Murakami S, Fujii T, Iwase T, Ishibashi-Ueda H, *et al.* C-type natriuretic peptide ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(11):1204-11.
194. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Fujii T, Iwase T, Hamada K, *et al.* C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(6):L1172-7.
195. Moro C. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16(6):645-9.
196. Wang TJ. The natriuretic peptides and fat metabolism. *N Engl J Med* 2012;367(4):377-8.
197. Golgi C. On the structure of nerve cells. 1898. *J Microsc* 1989;155(Pt 1):3-7.
198. Farquhar MG, Palade GE. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 1998;8(1):2-10.
199. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247-69.
200. Sutterlin C, Hsu P, Mallabiabarrena A, Malhotra V. Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell* 2002;109(3):359-69.

201. Alberts B, Wilson JH, Hunt T, Durfort i Coll M, Llobera i Sande M. *Biología molecular de la célula*. 5a ed ed. Omega; 2010.
202. de Bold AJ, Flynn TG. Cardionatrin I - a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Life Sci* 1983;33(3):297-302.
203. de Bold AJ. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60(3):324-30.
204. Prasad K, Singal PK. Ultrastructure of failing myocardium due to induced chronic mitral insufficiency in dogs. *Br J Exp Pathol* 1977;58(3):289-300.
205. Cantin M, Thibault G, Ding JF, Gutkowska J, Garcia R, Jasmin G, *et al*. ANF in experimental congestive heart failure. *Am J Pathol* 1988;130:552-68.
206. Caliari MV, Lana M, Leite VH, Tafuri WL. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol* 1995;76(4):299-307.
207. Lee YS, Lee CP. Secretory granules containing atrial natriuretic polypeptide in human ventricular cardiomyocytes. An electron microscopic immunocytochemical study. *Jpn Heart J* 1990;31(5):661-70.
208. Bexiga MG, Simpson JC. Human diseases associated with form and function of the Golgi complex. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):18670-81.
209. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr. Emerging biomarkers in heart failure. *Clin Chem* 2012;58(1):127-38.

210. Tousoulis D, Oikonomou E, Siasos G, Chrysohoou C, Charakida M, Trikas A, *et al.* Predictive value of biomarkers in patients with heart failure. *Curr Med Chem* 2012;19(16):2534-47.
211. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008;358(20):2148-59.
212. Seronde MF, Gayat E, Logeart D, Lassus J, Laribi S, Boukef R, *et al.* Comparison of the diagnostic and prognostic values of B-type and atrial-type natriuretic peptides in acute heart failure. *Int J Cardiol* 2013;168(4):3404-11.
213. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005;112(12):e154-235.
214. Liu P, Arnold JM, Belenkie I, Demers C, Dorian P, Gianetti N, *et al.* The 2002/3 Canadian Cardiovascular Society consensus guideline update for the diagnosis and management of heart failure. *Can J Cardiol* 2003;19(4):347-56.
215. Rivera M, Cortes R, Salvador A, Bertomeu V, de Burgos FG, Paya R, *et al.* Obese subjects with heart failure have lower N-terminal pro-brain

natriuretic peptide plasma levels irrespective of aetiology. *Eur J Heart Fail* 2005;7(7):1168-70.

216. Cortes R, Portoles M, Salvador A, Bertomeu V, Garcia de Burgos F, Martinez-Dolz L, *et al.* Diagnostic and prognostic value of urine NT-proBNP levels in heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2006;8(6):621-7.

217. Cortes R, Rivera M, Salvador A, Bertomeu V, de Burgos FG, Rosello-Lleti E, *et al.* Variability of NT-proBNP plasma and urine levels in patients with stable heart failure: a 2-year follow-up study. *Heart* 2007;93(8):957-62.

218. Cortes R, Rosello-Lleti E, Rivera M, Martinez-Dolz L, Salvador A, Sirera R, *et al.* Expression of B-type natriuretic peptide forms in ischemic human hearts. *Int J Cardiol* 2012;158(2):199-204.

219. Rosello-Lleti E, Calabuig JR, Morillas P, Cortes R, Martinez-Dolz L, Almenar L, *et al.* Variability of NT-proBNP and its relationship with inflammatory status in patients with stable essential hypertension: a 2-year follow-up study. *PLoS One* 2012;7(2):e31189.

220. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, *et al.* Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014;371(11):993-1004.

221. New York Heart Association. Criteria Committee., Dolgin M, Fox AC, Gorlin R, Levin RI, Devereaux RB. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9th ed / ed. Little, Brown; 1994.

222. Macrae DJ. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) guidelines on ethics of clinical trials. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(2):176-8, discussion 8-9.

223. Winters AL, Minchin FR. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem* 2005;346(1):43-8.
224. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
225. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4.
226. Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT, Freisler J. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem* 1966;9(3):447.
227. Graham JM, Winterbourne DJ. Subcellular localization of the sulphation reaction of heparan sulphate synthesis and transport of the proteoglycan to the cell surface in rat liver. *Biochem J* 1988;252(2):437-45.
228. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-12.
229. Portoles M, Faura M, Renau-Piqueras J, Iborra FJ, Saez R, Guerri C, *et al.* Nuclear calmodulin/62 kDa calmodulin-binding protein complexes in interphasic and mitotic cells. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 12):3601-14.
230. Lucocq J. Quantification of structures and gold labeling in transmission electron microscopy. *Methods Cell Biol* 2008;88:59-82.
231. Esteban-Pretel G, Marin MP, Romero AM, Timoneda J, Ponsoda X, Ballestin R, *et al.* Polyphosphoinositide metabolism and Golgi complex

morphology in hippocampal neurons in primary culture is altered by chronic ethanol exposure. *Alcohol Alcohol* 2013;48(1):15-27.

232. Morre DJ, Hamilton RL, Mollenhauer HH, Mahley RW, Cunningham WP, Cheetham RD, *et al.* Isolation of a Golgi apparatus-rich fraction from rat liver. I. Method and morphology. *J Cell Biol* 1970;44(3):484-91.

233. Ehrenreich JH, Bergeron JJ, Siekevitz P, Palade GE. Golgi fractions prepared from rat liver homogenates. I. Isolation procedure and morphological characterization. *J Cell Biol* 1973;59(1):45-72.

234. Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002;296(5567):557-9.

235. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34(3):597-601.

236. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.

237. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10(1):57-63.

238. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Web Server issue):W305-11.

239. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.

240. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25(16):2078-9.
241. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010;28(5):511-5.
242. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015;31(2):166-9.
243. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;26(1):139-40.
244. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30(1):207-10.
245. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, *et al.* Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 1995;131(6 Pt 2):1715-26.
246. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006;69(2):318-28.
247. Saito Y, Nakao K, Arai H, Sugawara A, Morii N, Yamada T, *et al.* Atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human ventricle. Increased gene expression of ANP in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148(1):211-7.

248. Takahashi T, Allen PD, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res* 1992;71(1):9-17.
249. Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, *et al.* Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J Biol Chem* 1998;273(19):11695-700.
250. Komatsu Y, Nakao K, Itoh H, Suga S, Ogawa Y, Imura H. Vascular natriuretic peptide. *Lancet* 1992;340(8819):622.
251. Zolty R, Bauer C, Allen P, Garrity M, Vittorio TJ. Atrial natriuretic peptide stability. *Clin Biochem* 2008;41(14-15):1255-8.
252. Nelesen RA, Dimsdale JE, Ziegler MG. Plasma atrial natriuretic peptide is unstable under most storage conditions. *Circulation* 1992;86(2):463-6.
253. Ibebuogu UN, Gladysheva IP, Houg AK, Reed GL. Decompensated heart failure is associated with reduced corin levels and decreased cleavage of pro-atrial natriuretic peptide. *Circ Heart Fail* 2011;4(2):114-20.
254. Ichiki T, Boerrigter G, Huntley BK, Sangaralingham SJ, McKie PM, Harty GJ, *et al.* Differential expression of the pro-natriuretic peptide convertases corin and furin in experimental heart failure and atrial fibrosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;304(2):R102-9.
255. Langenickel TH, Pagel I, Buttgereit J, Tenner K, Lindner M, Dietz R, *et al.* Rat corin gene: molecular cloning and reduced expression in

experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(4):H1516-21.

256. Gladysheva IP, Wang D, McNamee RA, Houg AK, Mohamad AA, Fan TM, *et al.* Corin overexpression improves cardiac function, heart failure, and survival in mice with dilated cardiomyopathy. *Hypertension* 2013;61(2):327-32.

257. Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology* 2007;148(7):3518-22.

258. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Kanmatsuse K, Furuya K. Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res* 2000;86(8):841-5.

259. Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, *et al.* Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation* 1993;88(3):1004-9.

260. Mattingly MT, Brandt RR, Heublein DM, Wei CM, Nir A, Burnett JC, Jr. Presence of C-type natriuretic peptide in human kidney and urine. *Kidney Int* 1994;46(3):744-7.

261. Del Ry S, Cabiati M, Lionetti V, Emdin M, Recchia FA, Giannessi D. Expression of C-type natriuretic peptide and of its receptor NPR-B in normal and failing heart. *Peptides* 2008;29(12):2208-15.

262. Cabiati M, Sabatino L, Caruso R, Caselli C, Prescimone T, Giannessi D, *et al.* Gene expression of C-type natriuretic peptide and of its specific receptor NPR-B in human leukocytes of healthy and heart failure subjects. *Peptides* 2012;37(2):240-6.
263. Hobbs A, Foster P, Prescott C, Scotland R, Ahluwalia A. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation* 2004;110(10):1231-5.
264. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, *et al.* Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991;252(5002):120-3.
265. Miao L, Wang M, Yin WX, Yuan Q, Chen YX, Fleischmann B, *et al.* Atrial natriuretic peptide regulates Ca channel in early developmental cardiomyocytes. *PLoS One* 2010;5(1):e8847.
266. Mooney M, Bond J, Monks N, Eugster E, Cherba D, Berlinski P, *et al.* Comparative RNA-Seq and microarray analysis of gene expression changes in B-cell lymphomas of *Canis familiaris*. *PLoS One* 2013;8(4):e61088.
267. Arora P, Wu C, Khan AM, Bloch DB, Davis-Dusenbery BN, Ghorbani A, *et al.* Atrial natriuretic peptide is negatively regulated by microRNA-425. *J Clin Invest* 2013;123(8):3378-82.
268. Waldo SW, Beede J, Isakson S, Villard-Saussine S, Fareh J, Clopton P, *et al.* Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(19):1874-82.

269. Sawada Y, Inoue M, Kanda T, Sakamaki T, Tanaka S, Minamino N, *et al.* Co-elevation of brain natriuretic peptide and proprotein-processing endoprotease furin after myocardial infarction in rats. *FEBS Lett* 1997;400(2):177-82.
270. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(3):569-82.
271. Lumsden NG, Khambata RS, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr Pharm Des* 2010;16(37):4080-8.
272. Langmeier M, Giogasova E, Zikova O, Mares J. Changes in the size and shape of the synaptic vesicles in the sensorimotor cortex of the rat brain in the initial phases of kindling. *Physiol Bohemoslov* 1986;35:437-46.
273. Klumperman J. Architecture of the mammalian Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(7).
274. Cortes R, Rivera M, Rosello-Lleti E, Martinez-Dolz L, Almenar L, Azorin I, *et al.* Differences in MEF2 and NFAT transcriptional pathways according to human heart failure aetiology. *PLoS One* 2012;7(2):e30915.
275. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, *et al.* Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004;110(6):705-12.

276. Ortega A, Rosello-Lleti E, Tarazon E, Molina-Navarro MM, Martinez-Dolz L, Gonzalez-Juanatey JR, *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces different molecular structural alterations in human dilated and ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014;9(9):e107635.
277. Hicks SW, Machamer CE. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1744(3):406-14.

VIII. PUBLICACIONES

PUBLICACIONES ORIGINADAS CON ESTA TESIS DOCTORAL

1. **Tarazón E**, Roselló-Lletí E, Rivera M, Ortega A, Molina-Navarro MM, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Orosa P, Montero JA, Salvador A, Portolés M. RNA sequencing analysis and atrial natriuretic peptide production in patients with dilated and ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9:e90157.
2. **Tarazón E**, Roselló-Lletí E, Ortega A, Molina-Navarro MM, Martínez-Dolz L, Sanchez-Lázaro I, Lago F, González-Juanatey JR, Rivera M, Portolés M. Differential gene expression of c-type natriuretic peptide and its related molecules in dilated and ischemic cardiomyopathy. A new option for the management of heart failure. *Int J Cardiol* 2014; 174: e84-e86.
3. **Tarazón E**, Roselló-Lletí E, Ortega A, Gil-Cayuela C, González-Juanatey JR, Lago F, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. The Golgi apparatus predicts remodeling degree in dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2016. En revisión.
4. Roselló Lletí E, **Tarazón E**, Ortega A, Molina-Navarro MM, Almenar L, Salvador A, Rivera M, Portolés M. Study of natriuretic peptides levels in the left ventricular tissue of patients with dilated cardiomyopathy using RNA-Seq. *Circulation* 2013; Vol 128 Abstract 9444.
5. **Tarazón E**, Rivera Otero M, Roselló E, Ortega A, Molina M, Martínez-Dolz L, Almenar L, Sanchez-Lázaro I, Salvador A, Portolés M. RNA sequencing analysis reveals new data of the atrial natriuretic peptide origin in patients with dilated and ischemic cardiomyopathy.

- European Heart Journal* 2014; Vol 35 (Abstract supplement):1180, P6547.
6. Rivera M, **Tarazón E**, Ortega A, Gil-Cayuela C, Triviño JC, Roselló E, García M, Molina M, Martínez A, Sánchez-Lázaro I, Almenar L, Lago F, Martínez-Dolz L, Moreno I, Perelló A, Bertomeu V, González-Juanatey JR, Montero JA, Salvador A, Portolés M. Differential gene expression of C-type natriuretic peptide and its related molecules in ischemic and dilated cardiomyopathy: A new option in the management of heart failure. *Circulation* 2014; Vol 130 Abstract 9446.

RNA Sequencing Analysis and Atrial Natriuretic Peptide Production in Patients with Dilated and Ischemic Cardiomyopathy

Estefanía Tarazón¹, Esther Roselló-Lletí¹, Miguel Rivera¹, Ana Ortega¹, María Micaela Molina-Navarro¹, Juan Carlos Triviño², Francisca Lago³, José Ramón González-Juanatey³, Plácido Orosa⁴, José Anastasio Montero⁵, Antonio Salvador⁶, Manuel Portolés^{1*}

1 Cardiocirculatory Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain, **2** Sistemas Genómicos, Valencia, Spain, **3** Cellular and Molecular Cardiology Research Unit, Department of Cardiology and Institute of Biomedical Research, University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, Spain, **4** Cardiology Unit, Hospital San Francisco de Borja, Gandía, Spain, **5** Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain, **6** Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

Abstract

Background: The atrium is the major site of ANP synthesis, which has been said to increase in heart failure as a result of increased production in the left ventricular (LV) myocardium. This is a key issue related to its diagnostic and prognostic capabilities. We aimed to evaluate protein levels of proANP and ANP and the enzymes that cleave the natriuretic peptides, corin and furin, in the LV tissue of heart transplant patients with dilated (DCM) and ischemic (ICM) cardiomyopathy compared with control donors (CNT). We also evaluate mRNA levels of ANP gene (*NPPA*) by RNA sequencing in the same tissue.

Methods and Results: Seventy-three human LV tissue samples from ICM (n = 30) and DCM (n = 33) patients and CNT (n = 10) were analyzed by Western blot and RNA sequencing. Comparing protein levels according to etiology, neither DCM nor ICM showed levels of proANP or ANP different from those of CNT. However, *NPPA* was increased in both groups compared to CNT (DCM 32 fold, $p < 0.0001$; ICM 10 fold, $p < 0.0001$). Corin (but not furin) was elevated in the ICM group compared to CNT (112 ± 24 vs. 100 ± 7 , $p < 0.05$), and its level was inversely related with LV ejection fraction (LVEF) ($r = -0.399$, $p < 0.05$).

Conclusions: Patients present with elevated levels of *NPPA* but not of proANP or ANP proteins in LV tissue, which may be due to posttranscriptional regulation of *NPPA* or different pathways for ANP secretion between the atrium and ventricle. Moreover, there are differences between DCM and ICM in corin levels, indicating that a different molecular mechanism may exist that converge in this syndrome. Further, LV concentration of corin is inversely related to LVEF in ICM.

Citation: Tarazón E, Roselló-Lletí E, Rivera M, Ortega A, Molina-Navarro MM, et al. (2014) RNA Sequencing Analysis and Atrial Natriuretic Peptide Production in Patients with Dilated and Ischemic Cardiomyopathy. PLoS ONE 9(3): e90157. doi:10.1371/journal.pone.0090157

Editor: Rajesh Gopalrao Katare, University of Otago, New Zealand

Received: October 18, 2013; **Accepted:** January 26, 2014; **Published:** March 5, 2014

Copyright: © 2014 Tarazón et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the National Institute of Health "Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III" (RETICS 12/0042/0003, Project PI10/00275). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: portoles_man@gva.es

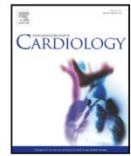
Introduction

Heart failure (HF) is caused by any condition that reduces the efficiency of the myocardium through damage or overloading. Natriuretic peptides (NP) are a family of peptides that cause effects such as diuresis, natriuresis, vasodilation, and inhibition of aldosterone synthesis and renin secretion; playing an important role in regulating blood pressure and blood volume [1]. Our group has extensively studied the NP in plasma, urine and tissue, and their value in monitoring patients with hypertension and HF [2–6]. NP concentrations in plasma are routinely used in clinical medicine to aid in the diagnosis, prognosis, and determination of the severity of HF: specifically atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) [7–10].

ANP and BNP are produced as a prohormones, proANP and proBNP, which are cleaved by 2 endoproteases (corin and furin) to

form active ANP and BNP and inactive N-terminal molecules [11]. Corin was identified as the proANP convertase [12], although it also cleaves proBNP [13]; however, in this case it is less specific to sequence and less efficient. Other enzymes, such as furin, are responsible for processing proBNP more efficiently [13]. Recently, it has been shown that plasma levels of corin are lower in patients with HF compared to controls, relating with the severity of HF. However, no differences were found in patients with acute myocardial infarction [14]. Moreover, another study in a canine model of HF found higher corin and furin levels in HF left atrium but not in HF left ventricle compared with controls [15].

ANP is synthesized and secreted in the atria under normal conditions and by the ventricular myocardium during fetal development, hypertrophy, or HF [16]. Since ANP plasma levels are elevated in HF, it has been speculated that the extra ANP may originate in the left ventricular (LV) tissue of these patients [16].



Letter to the Editor

Differential gene expression of C-type natriuretic peptide and its related molecules in dilated and ischemic cardiomyopathy. A new option for the management of heart failure



Estefanía Tarazón ^{a,1}, Esther Roselló-Lletí ^{a,1}, Ana Ortega ^{a,1}, María Micaela Molina-Navarro ^{a,1}, Ignacio Sánchez-Lázaro ^{b,1}, Francisca Lago ^{c,1}, José Ramón González-Juanatey ^{c,1}, Miguel Rivera ^{a,1}, Manuel Portolés ^{a,*}

^a Cardiocirculatory Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^b Heart Failure and Transplantation Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^c Cellular and Molecular Cardiology Research Unit, Department of Cardiology and Institute of Biomedical Research, University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2014

Accepted 2 April 2014

Available online 15 April 2014

Keywords:

CNP

Heart failure

Tissue

Enzymes

Receptors

The role of natriuretic peptides (NP) in heart failure (HF) is well established [1], but much less is known about C-type natriuretic peptide (CNP) function.

The NP bring about their biological effects through activation of specific NP receptors (NPR) after being cleaved by two endoproteases (corin and furin). Furin cleaves both CNP and BNP, but corin only cleaves BNP, although less efficiently than furin [2]. After CNP and BNP are cleaved, they bind to NPR2 and NPR1, respectively. Finally, NPR3 clears both CNP and BNP, thus regulating their local concentrations and effects. However, there have been no studies of mRNA levels of these molecules in the cardiac tissue of humans with HF. Therefore, our objective was to evaluate the mRNA levels of the CNP gene and of related molecules involved in the biology of the NP using RNA sequencing (RNA-seq) in left ventricular (LV) tissue samples from patients undergoing heart

transplantation with dilated (DCM) and ischemic (ICM) cardiomyopathy compared to healthy control hearts (CNT).

All patients gave written informed consent to participate in the study. The project was approved by the Biomedical Investigation Ethics Committee of La Fe University Hospital of Valencia, Spain. The investigation was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki [3]. The clinical characteristics of all patients are shown in Table 1.

We performed a large-scale expression screening on 32 heart samples (DCM, $n = 12$; ICM, $n = 12$; CNT, $n = 8$) using RNA-seq technology. Among the differentially expressed genes in both etiologies, some

Table 1

Clinical characteristics of patients according to etiology in RNA-seq and RT-qPCR analysis.

	RNA-seq		RT-qPCR	
	DCM ($n = 12$)	ICM ($n = 12$)	DCM ($n = 20$)	ICM ($n = 20$)
Age (years)	51 ± 11	55 ± 8	48 ± 14	56 ± 7*
Gender male (%)	92	100	75	100*
NYHA class	3.4 ± 0.4	3.6 ± 0.4	3.3 ± 0.4	3.5 ± 0.4
BMI (kg/m ²)	28 ± 5	26 ± 5	27 ± 6	27 ± 4
Hemoglobin (mg/mL)	13 ± 3	14 ± 3	13 ± 3	14 ± 2
Hematocrit (%)	39 ± 8	42 ± 6	38 ± 7	41 ± 6
Total cholesterol (mg/dL)	150 ± 38	160 ± 43	140 ± 44	177 ± 51*
Prior hypertension (%)	18	27	21	47
Prior diabetes mellitus (%)	18	46	10	53**
Prior smoking (%)	55	91	61	90*
EF (%)	19 ± 7	24 ± 4	21 ± 8	23 ± 5
FS (%)	11 ± 4	13 ± 2	12 ± 4	13 ± 2
LVEDD (mm)	71 ± 12	56 ± 8**	66 ± 12	56 ± 7**
LVEDD (mm)	80 ± 11	64 ± 8***	75 ± 11	65 ± 8**
LVMI (g/cm ²)	241 ± 77	139 ± 36**	209 ± 71	139 ± 31***
Duration of disease (months)	77 ± 71	48 ± 41	70 ± 63	47 ± 42

BMI, body mass index; DCM, dilated cardiomyopathy; Duration of disease from diagnosis of heart failure until heart transplant; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; NYHA, New York Heart Association; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEDS, left ventricular end-systolic diameter; LVMI, left ventricular mass index.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

* Corresponding author at: Cardiocirculatory Unit, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario La Fe, Bulevar Sur, s/n, 46026 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 124 66 44; fax: +34 96 124 66 00.

E-mail address: portoles_man@gva.es (M. Portolés).

¹ These authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

OTRAS PUBLICACIONES ORIGINADAS DURANTE EL PERIODO DE ELABORACIÓN DE LA TESIS

1. Carpena N, Roselló-Lletí E, Calabuig JR, **Tarazón E**, González-Juanatey JR, Martínez-Dolz L, Salvador A, Grigorian L, Orosa P, Portolés M, Rivera M. MMP-2 and sTNF-R1 Variability in Patients with Essential Hypertension: 1-Year Follow-Up Study. *ISRN Cardiol* 2012; 2012:501894.
2. Morillas P, Andrade H, Castillo J, Quiles J, Bertomeu-González V, Cordero A, **Tarazón E**, Roselló-Lletí E, Portolés M, Rivera M, Bertomeu-Martínez. Inflammation and apoptosis in hypertension. Relevance of the extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol* 2012; 65:819-825.
3. **Tarazón E**, Rivera M, Roselló-Lletí E, Molina-Navarro MM, Sánchez-Lázaro IJ, España F, Montero A, Lago F, González-Juanatey JS, Portolés M. Heart failure induces significant changes in nuclear pore complex of human cardiomyocytes. *PLoSOne* 2012; 7:e48957.
4. Molina-Navarro M, Roselló-Lletí E, **Tarazón E**, Ortega A, Sánchez-Izquierdo D, Lago F, González-Juanatey JR, García-Pavía P, Salvador A, Montero JA, Portolés M, Rivera M. Heart failure entails significant changes in human nucleocytoplasmic transport gene expression. *Int J Cardiol* 2013; 168:2837-2843.
5. Morillas P, Quiles J, Andrade H, Castillo J, **Tarazón E**, Roselló E, Portolés M, Rivera M, Bertomeu-Martínez V. Circulating biomarkers of collagen metabolism in arterial hypertension. Relevance of target organ damage. *J Hyperten* 2013; 31:1611-1617.

6. Molina-Navarro MM, Roselló-Lletí E, Ortega A, **Tarazón E**, Otero M, Martínez-Dolz L, Lago F, Juanatey JR, España F, García-Pavía P, Montero A, Portolés M, Rivera M. Differential gene expression of cardiac ion channels in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2013; 8:e79792.
7. Puig T, Ferrero-Gregori A, Roig E, Vazquez R, Gonzalez-Juanatey JR, Pascual-Figal D, Delgado J, Alonso-Pulpon L, Borrás X, Mendez A, Cinca J; en representación de los investigadores de REDINSCOR. Prognostic value of body mass index and waist circumference in patients with chronic heart failure (Spanish REDINSCOR Registry). *Rev Esp Cardiol* 2014; 67:101-106.
8. Herrer I, Roselló-Lletí E, Rivera M, Molina-Navarro MM, **Tarazón E**, Ortega A, Martínez-Dolz L, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Bertomeu V, Montero JA, Portolés M. RNA-sequencing analysis reveals new alterations in the cardiomyocyte cytoskeletal genes in patients with heart failure. *Lab Invest* 2014; 94:645-653.
9. Roselló-Lletí E, **Tarazón E**, Barderas MG, Ortega A, Otero M, Molina-Navarro MM, Lago F, González-Juanatey JR, Salvador A, Portolés M, Rivera M. Heart mitochondrial proteome study elucidates changes in cardiac energy metabolism and antioxidant PRDX3 in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9: e112971.
10. Ortega A, Roselló-Lletí E, **Tarazón E**, Molina-Navarro MM, Martínez-Dolz L, González-Juanatey JR, Lago F, Salvador A, Rivera M, Portolés M. Endoplasmic reticulum stress induces different molecular

- structural alterations in human dilated and ischemic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9:e107635.
11. Roselló-Lletí E, **Tarazón E**, Barderas MG, Ortega A, Molina-Navarro MM, Martínez A, Lago F, Martínez -Dolz L, González-Juanatey JR, Salvador A, Portolés M, Rivera M. ATP synthase subunit alpha and LV mass in ischemic human hearts. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 442-451.
 12. Gil-Cayuela C, Rivera M, Ortega A, **Tarazón E**, Triviño JC, Lago F, González-Juanatey JR, Almenar L, Martínez-Dolz L, Portolés M. RNA sequencing analysis identifies new human collagen genes involved in cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65: 1263-1271.
 13. Herrer I, Roselló-Lletí E, Ortega A, **Tarazón E**, Molina-Navarro MM, Triviño JC, Martínez-Dolz L, Almenar L, Lago F, Sánchez-Lázaro I, González-Juanatey JR, Salvador A, Portolés M, Rivera M. Gene expression network analysis reveals new transcriptional regulators as novel factors in human ischemic cardiomyopathy. *BMC Medical Genomics* 2015; 8:14.
 14. Álvarez-García J, Ferrero-Gregori A, Puig T, Vázquez R, Delgado J, Pascual-Figal D, Alonso-Pulpón L, González-Juanatey JR, Rivera M, Worner F, Bardají A, Cinca J; **investigators of the Spanish Heart Failure Network (REDINSCOR)**. A simple validated method for predicting the risk of hospitalization for worsening of heart failure in ambulatory patients: the Redin-SCORE. *Eur J Heart Fail* 2015; 17:818-27.
 15. Ortega A*, **Tarazón E***, Roselló-Lletí E, Gil-Cayuela C, Lago F, González-Juanatey JR, Cinca J, Jorge E, Martínez-Dolz L, Portolés M,

- Rivera M. Patients with Dilated Cardiomyopathy and Sustained Monomorphic Ventricular Tachycardia Show Up-Regulation of KCNN3 and KCNJ2 Genes and CACNG8-Linked Left Ventricular Dysfunction. *PLoS One* 2015; 10:e0145518. *Co-autoras
16. Ortega A, **Tarazón E**, Roselló-Lletí E, Gil-Cayuela C, Lago F, González-Juanatey JR, Martínez-Dolz L, Portolés M, Rivera M. TRPM7 is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischaemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function. *ESC Heart Failure* 2016 (In press).

