



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Remodelado Cardíaco Adverso tras Infarto
Agudo de Miocardio: Nuevos Mecanismos y
Terapias**

D^a María Carmen Asensio López

2019



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Remodelado Cardíaco Adverso tras Infarto Agudo de Miocardio: nuevos mecanismos y terapias.

Director

Dr. Antonio Manuel Lax Pérez

Doctoranda

Dña. María del Carmen Asensio López

Murcia a 19 de diciembre de 2019



D. Antonio Manuel Lax Pérez, Investigador Doctor de Universidad del Área de Cardiología en el Departamento de Medicina Interna, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Remodelado cardiaco adverso tras infarto agudo de miocardio: nuevos mecanismos y terapias.", realizada por D^a. María del Carmen Asensio López, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de diciembre de 2019

La memoria de Tesis Doctoral que a continuación de detalla ha sido sometida, por el órgano competente de la Universidad de Murcia, a un análisis de coincidencias usando el *software* Turnitin. El resultado favorable ha permitido su presentación ante la Comisión General de Doctorado, así como su posterior defensa.

Dedicatorias



A mi marido y a mis hijas, pilares
fundamentales de mi gran FAMILIA.



Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido un trabajo muy duro, pero a la vez muy gratificante y enriquecedor. El trabajo durante estos años me ha permitido crecer como investigadora y como persona.

Ser madre, en mi caso, cuando estás en proceso de elaboración de una Tesis Doctoral es complicado porque sabes que alguien más se está sacrificando para que tú logres tus objetivos. Por ello mi primer agradecimiento es para mis hijas Alba y Nerea, Nerea y Alba, por entender y comprender a la perfección que el tiempo que era para vosotras, en gran parte, lo utilizaba en la realización de mi Tesis Doctoral. Sabéis que el esfuerzo es motivo de recompensa, y que el tiempo es el mejor testigo entre el sacrificio y el éxito. Muchas gracias por vuestro apoyo y motivación, mamá os quiere con todo su corazón.

De igual forma me gustaría resaltar el apoyo y comprensión de mí marido, mi especial agradecimiento por su amor, tiempo y paciencia a lo largo de esta Tesis Doctoral.

Mi siguiente agradecimiento es para toda mi familia y amigos, en especial a mis padres Antonio y Fuensanta por su apoyo y ayuda incondicional. Gracias papá y mamá, me siento muy orgullosa de ser vuestra hija.

Agradezco de manera especial al Dr. Roger J. Hajjar, director del *Cardiovascular Research Center* del *Mount Sinai Hospital* de Nueva York por haberme dado la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación. Quiero

extender mi agradecimiento también al Dr. Yassine Sassi por su disponibilidad durante mi estancia, en la cual tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos perseguidos. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación investigadora.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Antonio Manuel Lax Pérez por elegirme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Gracias de todo corazón por su constancia, interés y rigor en el trabajo diario. Su labor de dirección y buen criterio han sido fundamentales en la realización y elaboración de esta tesis doctoral.

Y como no podía ser de otra forma, mi agradecimiento tan sincero y profundo como sentido para el Dr. Domingo Pascual Figal, Tutor de esta Tesis Doctoral. Tengo que destacar su extraordinaria capacidad formativa, así como su incondicional apoyo, confianza plena siempre en mí y en mi trabajo de investigación. Las ideas propias y rigurosas han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado, el cual no se puede concebir sin su tutorización. Le agradezco también el haberme facilitado siempre, los medios necesarios para la realización de esta tesis doctoral.

Muchas gracias a todos!!!!.

Este trabajo ha sido financiado por
el Instituto de Salud Carlos III a través del proyecto PI14/01637 y
por la Fundación Séneca Agencia de Ciencia y Tecnología
de la Región de Murcia a través del proyecto 20652/JLI/18

El trabajo desarrollado por la Doctoranda Dña. María del Carmen Asensio López y que presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha dado lugar a:

1.- Los resultados que se muestran en el Capítulo 4 han sido patentados recientemente por la Doctoranda Dña. María del Carmen Asensio López, junto con los Dres. D. Domingo Pascual Figal y D. Antonio Manuel Lax Pérez.

Título: Composición para promover la recuperación cardiaca tras un infarto de miocardio

Referencia: ES, 2637032 A1, OEPM. P 201700154 (BOPI, 10/10/2017).

2.- Los Capítulos 3 y 4 de esta memoria de Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

🔗 **Asensio-Lopez MC, Lax A, Fernandez Del Palacio MJ, Sassi Y, Hajjar RJ, Pascual-Figal DA.** Pharmacological inhibition of the mitochondrial NADPH oxidase 4/PKC α /Gal-3 pathway reduces left ventricular fibrosis following myocardial infarction. *Transl Res.* 199 (2018), 4-23. doi: 10.1016/j.trsl.2018.04.004. Posición en su categoría: 3/30. Factor de impacto: 4.88

🔗 **Asensio-Lopez MC, Lax A, Fernandez Del Palacio MJ, Sassi Y, Hajjar RJ, Januzzi JL, Bayes-Genis A, Pascual-Figal DA.** Yin-Yang 1 transcription factor modulates ST2 expression during adverse cardiac remodeling post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 130 (2019), 216-233. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.04.009. Posición en su categoría: 29/136. Factor de impacto: 5.055.

Abreviaturas

ABREVIATURAS MENOS FRECUENTES

$\times g$	Aceleración de la gravedad
\emptyset	Diámetro
<i>ACTA1</i>	Alfa actina 1
<i>AD</i>	Aurícula derecha
<i>AI</i>	Aurícula izquierda
<i>AMPK</i>	Proteína quinasa activada por AMP
<i>ANF</i>	Factor natriurético atrial
<i>BNP</i>	Péptido natriurético tipo B
<i>BSA</i>	Albumina de suero bovino
<i>CADI</i>	coronaria anterior descendente izquierda
<i>CaMKII</i>	Ca ²⁺ /calmodulina proteína quinasa II
<i>CITP</i>	Telopéptido del colágeno de tipo I
<i>CMs</i>	Cardiomiocitos
<i>COXIV</i>	Subunidad IV de citocromo c oxidasa
<i>c-TnT</i>	Troponina cardíaca T
<i>DC</i>	Deformación celular
<i>DDR-2</i>	Receptor con dominio discoidina 2
<i>DM2</i>	Diabetes tipo II
<i>DMEM</i>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<i>ECVs</i>	Enfermedades cardiovasculares
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>EOR</i>	Especies con oxígeno reactivo
<i>FCS</i>	Suero fetal bovino
<i>FCs</i>	Fibroblastos cardíacos
<i>FSP-1</i>	Proteína 1 fibroblasto-específica
<i>GADPH</i>	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
<i>Gal-3</i>	Galectina 3
<i>IAM</i>	Infarto agudo de miocardio
<i>IC</i>	Insuficiencia cardíaca
<i>IL-33</i>	Interleucina-33
<i>IL-6</i>	Interleucina-6

<i>IM</i>	Infarto de miocardio
<i>IP</i>	Inmunoprecipitación
<i>kDa</i>	Kilodaltons
<i>Leu</i>	Leucina
<i>MCP-1</i>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
<i>Me₂SO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>MEC</i>	Matriz extracelular
<i>Met</i>	Metformina
<i>MHC</i>	Cadena pesada de la miosina
<i>mitoNox</i>	NADPH oxidasa mitocondrial 4
<i>MMPs</i>	Metaloproteinasas
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4-5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolio
<i>DPBS</i>	Tampón fosfato salino de Dulbecco
<i>p/v</i>	Relación peso/volumen
<i>PBST</i>	Tampón fosfato salino con Tween 20
<i>PCR</i>	Proteína C reactiva
<i>PICP</i>	Propéptido C-terminal del protocógeno tipo I
<i>PIICP</i>	Propéptido C-terminal del protocógeno tipo III
<i>PIIINP</i>	Propéptido N-terminal del protocógeno tipo III
<i>PINP</i>	Propéptido N-terminal del protocógeno tipo I
<i>PKCα</i>	Proteína quinasa C alfa
<i>PMA</i>	Forbol-12-Miristato-13-Acetato
<i>SDS</i>	Dodecil sulfato sódico
<i>SERCA</i>	Ca ²⁺ -ATPasa
<i>siRNAs</i>	Secuencias de RNA de interferencia de pequeño tamaño
<i>ST2</i>	Supresor de la Tumorigenicidad 2
<i>TBP</i>	Proteína de unión a TATA
<i>TCA</i>	Ácido tricloroacético
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>TX-100</i>	Tritón X-100
<i>u.a.</i>	Unidades arbitrarias
<i>v/v</i>	Relación volumen/volumen
<i>VD</i>	Ventrículo derecho

<i>VDFVI</i>	Volumen diastólico final del ventrículo izquierdo
<i>VI</i>	Ventrículo izquierdo
<i>VSFVI</i>	Volumen sistólico final del ventrículo izquierdo
<i>Yy1</i>	Factor de transcripción Yin-yang 1
<i>A23187</i>	Calcimicina; ionóforo de Ca ²⁺
<i>MEM</i>	Medio esencial mínimo
<i>β-MHC</i>	Cadena pesada de la β-miosina

Índice



1

Introducción, hipótesis y objetivos

3	INTRODUCCIÓN
3	Anatomía y función del corazón
6	Las enfermedades cardiovasculares
7	Cardiomiopatía isquémica
8	Infarto de miocardio
9	Remodelado Cardíaco tras el IAM
12	Inflamación
14	Fibrosis
18	Galectinas
21	Hipertrofia
26	Cardioprotección por Metformina: Efectos beneficiosos más allá de la reducción de los niveles de Glucosa
26	Infarto de miocardio: Modelo experimental por ligación de la arteria coronaria anterior descendente en ratas
28	HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



2

Procedimientos, materiales y reactivos

37	MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO DE MIOCARDIO
-----------	--

37	Acondicionamiento de los animales al estudio
38	Ligación de la arteria coronaria anterior descendente izquierda
41	Recogida y procesamiento de muestras
43	Preparación de las secciones cardíacas y medida del tamaño del infarto tras tinción con tricrómico de Masson
45	Inmunohistoquímica
47	MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO POR DEFORMACIÓN CELULAR
47	Subcultivo de la línea celular H9c2
49	Aislamiento de células adultas primarias de ratón
53	Separación y cultivo de células cardíacas adultas de ratón
54	Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos primarios
55	Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos primarios
56	Modelos de deformación celular
56	Deformación celular biomecánica y procesamiento del medio condicionado
58	Deformación celular química
59	GENERACIÓN DE UN MODELO KNOCKDOWN IN VITRO
60	MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO
60	Localización del factor de transcripción Yin yang 1
62	Fijación y permeabilización de células
62	Intensificación de señal e incubación con anticuerpos
63	Carga de las células con DAPI
64	EXTRACCIÓN DE PROTEINAS
64	Fracción proteica total

-
- 64 Aislamiento de proteínas totales a partir de tejido
- 65 Aislamiento de proteínas totales a partir de cultivo celular····
- 66 Aislamiento de proteínas desde compartimentos subcelulares
- 69 Cuantificación de proteínas por la técnica del ácido bicinónico
BCA
- 71 INMUNOBLOT**
- 71 Electroforesis en geles de poliacrilamida
- 75 Electrotransferencia de proteínas
- 76 Inmunodetección con anticuerpos específicos
- 79 Revelado de la membrana
- 79 *Stripping* de la membrana
- 80 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR**
- 82 DAÑO OXIDATIVO**
- 82 Determinación de los niveles de Especies con oxígeno reactivo
(EOR)
- 83 Cuantificación de los niveles de MDA
- 84 EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA**
- 85 Extracción de ARNm
- 86 Extracción de ARNm a partir de muestras de tejido del VI
- 87 Extracción de ARNm a partir de cultivo celular
- 89 Retrotranscripción
- 90 PCR cuantitativa
- 93 REACTIVOS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS**
- 95 DISOLUCIONES DE TIPO GENERAL Y MEDIOS
TAMPONADOS**
- 95 Medios de aislamiento de proteínas

95	Medio de extracción de proteínas totales
96	Medio de extracción STM
96	Medio de extracción de proteínas NET
96	Medio de extracción de proteínas SOL
96	Medio de desnaturalización (2×)
97	Tampón TBS (10×)
97	Tampón TBST
97	Medio de bloqueo
97	Medio de Tyrode
97	MATERIAL FUNGIBLE ...
99	DETALLE DE ALGUNAS ESTRUCTURAS MOLECULARES



3

La inhibición farmacológica de la ruta NADPH oxidasa 4 mitocondrial/PKC/Gal-3, reduce la fibrosis

105	RESUMEN
107	INTRODUCCIÓN
109	MATERIALES Y MÉTODOS
109	Animales y aspectos éticos
109	Inducción experimental de IM en ratas
112	Grupos generados y diseño experimental del estudio
113	Aislamiento de células cardíacas adultas de ratón

-
- 115 Efecto del medio condicionado de cardiomiocitos sobre los fibroblastos cardíacos bajo deformación celular.
- 116 Extracción de ARN y PCR cuantitativa
- 117 Aislamiento de la fracción proteica y western blotting
- 118 Preparación de las secciones cardíacas y medida del tamaño de infarto
- 119 Inmunohistoquímica
- 120 Medida de la actividad enzimática mitoNox
- 120 Medida de la actividad enzimática PKC α
- 121 Actividad enzimática AMPK
- 121 Generación de un modelo Knockdown mediante el uso de RNA de interferencia de pequeño tamaño (siRNA)
- 122 Viabilidad celular
- 123 Actividad de las Caspasas -3 y -9
- 123 Peroxidación lipídica
- 124 Medida de la proliferación celular
- 124 Niveles de especies con oxígeno reactivo
- 125 Determinación de la concentración extracelular de Galectina-3
- 125 Análisis estadístico
- 126 RESULTADOS**
- 126 Estudio del efecto protector de metformina sobre el miocardio infartado
- 138 El aumento en el nivel y actividad de AMPK por metformina previene la activación de las enzimas mitoNox y PKC α tras un IM
- 145 Metformina modula la vía de señalización intracelular mitoNOX/PKC α /Gal-3

- 154 El incremento de AMPK inducido por metformina previene del daño cardíaco
- 156 La disminución en la fosforilación de la enzima AMPK inactiva a tuberina y activa la vía intracelular mTORC1/S6K, lo que conduce a la activación de mitoNox.
- 160 La Gal-3 que es secretada por cardiomiocitos sometidos a deformación celular induce la activación de fibroblastos cardíacos
- 166 DISCUSIÓN**
- 175 Perspectivas clínicas y conclusiones



4

El factor de transcripción Yin-yang 1 modula la expresión de sST2...

- 179 RESUMEN**
- 181 INTRODUCCIÓN**
- 183 MATERIALES Y MÉTODOS**
- 183 Consideraciones éticas del estudio y modelo animal
- 184 Modelo experimental animal
- 184 Grupos y diseño experimental
- 185 Preparación de las secciones del corazón y medida del tamaño del infarto
- 185 Inmunohistoquímica
- 186 Cultivo y modelo de deformación celular
- 187 Silenciamiento con siRNA

- 188 Medida del tamaño del cardiomiocito mediante el uso de ³H-Leucina
- 188 Protocolo de inmunofluorescencia para evaluar la forma activa de Yy1
- 189 Extracción de ARN y PCR cuantitativa
- 190 Aislamiento de la fracción proteica total
- 190 Fraccionamiento subcelular
- 191 Co-inmunoprecipitación de los complejos Yy1-HDAC4 a partir de extractos nucleares y western blot
- 192 Detección de proteínas por Western blot
- 193 Protocolo de stripping de Western Blot
- 193 Determinación de la concentración extracelular de sST2 y NT-proBNP
- 194 Análisis estadístico
- 194 **RESULTADOS**
- 194 Estudio del efecto protector de metformina sobre el miocardio infartado
- 198 La disminución de la expresión de sST2 inducida por metformina previene la activación de NF-κB, tras el IM
- 203 La terapia con metformina modula la expresión del factor de transcripción Yin-yang 1 (Yy1) y de su co-represor HDAC4 tras el IM
- 208 El factor de transcripción Yy1 modula la expresión de la isoforma soluble sST2

- 217 La disminución de sST2 previene la fosforilación y activación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$, aumenta la señal cardioprotectora asociada con la vía IL-33/ST2L, lo que lleva a mejoras en la hipertrofia cardíaca.
- 220 HDAC4 actúa como un co-represor e inhibe la expresión de sST2.
- 226 DISCUSIÓN**
- 237 Perspectiva clínica y conclusión



5

Resumen y conclusiones

- 241 Resumen y conclusiones



6

Bibliografía

- 247 Bibliografía



- 287 **Resumen/Abstract**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Estructura del corazón	4
1.2	Representación esquemática de las arterias coronarias	5
1.3	Causas de la isquemia miocárdica.	8
1.4	Daño cardíaco inducido por inflamación.	13
1.5	Etiofisiopatología de la fibrosis miocárdica	16
1.6	Estructura molecular de Galectina-3	19
1.7	Condiciones que conducen al remodelado cardíaco y que contribuyen al desarrollo de hipertrofia	22
1.8	Sistema IL-33/ST2L en la respuesta cardíaca al estrés biomecánico	24
1.9	Modelo animal de ligación de la arteria coronaria izquierda	27
2.1	Identificación visual del miocardio infartado, zona del borde (B), infarto (I) y zona remota (R)	41
2.2	Estiramiento celular mediante el sistema Flexcell® FX-5000™	57
2.3	Descripción del procedimiento experimental para el fraccionamiento subcelular	69
3.1	Efecto de metformina sobre el tamaño del IM	127
3.2	Metformina previene la fibrosis cardíaca adversa en la zona del borde del VI infartado	130
3.3	Metformina previene la fibrosis adversa en la zona infartada del VI	132
3.4	Metformina modula la expresión de Gal-3 en la zona del borde del VI infartado	135

Figura		Página
3.5	Metformina modula la expresión de Gal-3 en la zona ...	137
3.6	La terapia con metformina durante 4 semanas tras el IM incrementa la actividad de AMPK y aumenta el nivel de fosforilación de tuberina	139
3.7	Metformina reduce la expresión de la enzima mitoNox y previene la expresión y actividad de PKC α en la zona del borde del VI infartado	141
3.8	La terapia con metformina incrementa el nivel de ARNm de AMPK y reduce el nivel y actividad de las enzimas mitoNox y PKC α en la zona infartada del VI	143
3.9	Metformina mejora al daño oxidativo y previene la muerte celular por apoptosis en la zona del	145
3.10	Pureza de las fracciones de cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos	147
3.11	Los cardiomiocitos se preincubaron.....	149
3.12	El incremento de la expresión de AMPK por metformina previene la activación de las enzimas mitoNox y PKC.....	152
3.13	La enzima mitoNox a través de la activación de PKC...	153
3.14	El aumento de la expresión del AMPK inducida por metformina previene el daño celular asociado con la deformación	155
3.15	La disminución en la fosforilación de AMPK inactiva a tuberina y activa la vía mTORC1/S6K lo que conduce a la secreción de Gal-3	157

Figura		Página
3.16	p70/S6K, situado aguas abajo de mTORC1, induce la activación de mitoNox	159
3.17	Los cardiomiocitos sometidos a deformación celular...	161
3.18	El medio condicionado aislado de cardiomiocitos sometidos a deformación celular induce su activación	162
3.19	Eficiencia del silenciamiento de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular	164
3.20	La Gal-3 secretada por los cardiomiocitos sometidos a deformación celular está implicada en la activación de los fibroblastos cardíacos	165
4.1	Efecto de metformina sobre el tamaño de IM	195
4.2	Metformina previene la inflamación en la zona del borde del VI infartado	197
4.3	El tratamiento con metformina modula el sistema IL-33/ST2L en la zona del borde del VI infartado	199
4.4	Metformina regula la expresión cardíaca de sST2	200
4.5	El tratamiento con metformina modula la activación de la proteína IκB y del factor NF-κB tras el IM	202
4.6	Metformina regula los niveles de sST2 mediante la modulación del factor de transcripción Yy1 en la zona del borde del VI infartado	205
4.7	Metformina regula la actividad del factor de transcripción Yy1 a través de la modulación de la deacetilasa HDAC4 en la zona del borde del VI infartado	207

Figura		Página
4.8	Bajo condiciones de deformación celular, metformina previene la respuesta hipertrófica asociada	208
4.9	Análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de IL-33 (a), sST2 (b), Yy1 (c) y HDAC4 (d)	209
4.10	Metformina modula la expresión/secreción de sST2 e incrementa el nivel de la forma fosforilada del HDAC4 en el citosol	210
4.11	Eficiencia del silenciamiento con siYy1	213
4.12	La combinación comercial ON-TARGET plus™ SMARTpool® siRNA muestra alta efectividad y ausencia de efecto off-target	215
4.13	El silenciamiento de Yy1 afecta a la expresión de sST2 pero no a ST2L. (a) Nivel de ARNm de sST2	216
4.14	La isoforma soluble sST2 actúa sobre la ruta de señalización activada a través de la interacción IL-33/ST2L	218
4.15	La inhibición de la enzima CaMKII previene la expresión de la isoforma sST2	221
4.16	Niveles de ARNm de HDAC4 y sST2...	223
4.17	HDAC4 se une al factor Yy1 y reprime la transcripción de sST2	225

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Composición de la mezcla de reacción para el cálculo de la concentración de proteína	71
2.2	Composición de geles separadores en gradiente continuo	73
2.3	Detalle composición gel hacinador	74
2.4	Detalle de los anticuerpos usados en el estudio	78
2.5	Lista de anticuerpos secundarios usados para western blot	79
2.6	Detalle de la composición del medio de reacción para pasar de ARNm a ADNc; kit Applied Biosystems® GeneAmp® RNA RCR Core	90
2.7	Detalle de la composición del medio de reacción para la realización de la PCR cuantitativa; SYBR® Premix Ex Taq™	91
2.8	Detalle de los primers usados para PCR cuantitativa en rata	92
2.9	Detalle de secuencias específicas de primers de ratón para PCR cuantitativa	93
2.10	Reactivos y referencias de compra	93
2.11	Descripción del material fungible	97
2.12	Detalle de estructuras moleculares de reactivos	99
3.1	Estudio eco-cardiográfico a ratas infartadas de 4 semanas de evolución	128



New York City. David Balyeat



Introducción, hipótesis y objetivos



INTRODUCCIÓN

Anatomía y función del corazón

El corazón es el órgano fundamental del apartado circulatorio, y su función es bombear sangre al organismo. Se localiza sobre el diafragma, cerca de la línea media de la cavidad torácica y por detrás del esternón. Está situado y protegido en el interior de una estructura membranosa denominada pericardio, que lo mantiene posicionado en el mediastino y, a la vez, le otorga suficiente libertad de movimientos para una contracción rápida y vigorosa¹. Su capa más externa, que está en contacto directo con el pericardio visceral, es el epicardio. A nivel interno el miocardio, que es la capa de músculo cardíaco, consta de haces entrecruzados de fibras musculares cardíacas y es, por tanto, la que le confiere la capacidad de contracción. Por último, la capa interna o endocardio cubre las cavidades internas del corazón, reviste las válvulas y se continúa con la membrana de revestimiento de los grandes vasos sanguíneos².

El corazón está constituido por cuatro cámaras. Las dos cámaras superiores son las aurículas y las dos inferiores se las denomina ventrículos. Las aurículas, formadas por paredes delgadas de músculo cardíaco, rellenan de sangre ambos ventrículos que tienen paredes de músculo más gruesas y por lo tanto una mayor fuerza de contracción. La organización estructural y funcional de estas cámaras en el corazón es bilateral, es decir, una aurícula y un ventrículo se localizan en el lado derecho, y el otro par de cámaras se sitúan en el lado izquierdo. Como se puede observar en la figura 1.1, mientras que las aurículas y los ventrículos de cada lado se comunican entre sí por unas estructuras denominadas válvulas, cuya función permite el flujo de la sangre entre ambas cavidades, la mitad derecha e izquierda cardíacas permanecen incomunicadas estando separadas por una pared muscular denominada septo³ (tabique interventricular) (Fig. 1.1).

El funcionamiento del corazón es similar a dos bombas separadas la una de la otra. Una de ellas, la derecha impulsa la sangre hacia los pulmones, y la otra situada a la izquierda la impulsa hacia los órganos periféricos. La sangre accede al lado derecho del corazón a través de la aurícula derecha desde las venas cavas superior e inferior, tras haber pasado por todo el cuerpo oxigenando los tejidos y los órganos. Es a través de la válvula tricúspide, donde la sangre accede al ventrículo derecho, desde donde es impulsada a la arteria pulmonar hacia los pulmones. Es aquí, en los pulmones, donde la sangre descarga el CO₂ que se ha estado generando como consecuencia del metabolismo celular y se carga de O₂, volviendo al corazón a través de las cuatro venas pulmonares, para desembocar en la aurícula izquierda. La sangre ahora pasa al ventrículo izquierdo (VI) a través de la válvula mitral (Fig. 1.1; lado izquierdo).

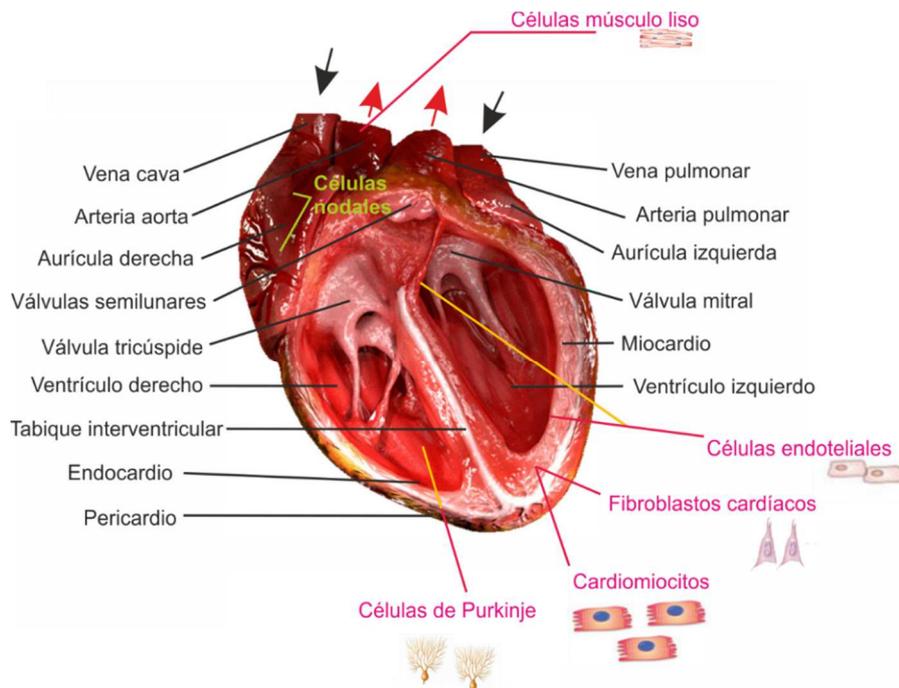


Figura 1.1. *Estructura del corazón*. Imagen representativa de una corte transversal de un corazón donde se muestran las diferentes partes, así como un detalle de los tipos celulares que lo forman.

El VI es considerado la cámara principal cardíaca y su función es la de impulsar la sangre que saldrá por la válvula aórtica hacia la aorta ascendente, con suficiente fuerza para que circule por todo el organismo⁴. Parte de la sangre que llega a la aorta ascendente se dirige hacia las arterias coronarias que nacen de ella e irrigan el miocardio —lo que facilita la difusión de nutrientes desde la sangre de las cámaras cardíacas a todas las células que forman la pared del miocardio, lo que se denomina circulación coronaria—. Se distinguen dos arterias coronarias principales. Mientras que la arteria coronaria derecha emerge entre la orejuela derecha y el origen de la pulmonar, la arteria coronaria izquierda se divide en arteria anterior descendente izquierda y arteria circumfleja (Fig. 1.2). La arteria anterior descendente irriga tanto la cara anterior como lateral del VI además del tabique interventricular a través de sus ramas septales. La arteria circumfleja, por otro lado, irriga la cara posterior del VI. El resto de la sangre sigue su camino a través del cayado aórtico y la aorta descendente. Las ramas del cayado aórtico y de la aorta descendente transporta la sangre a todo el organismo⁴.

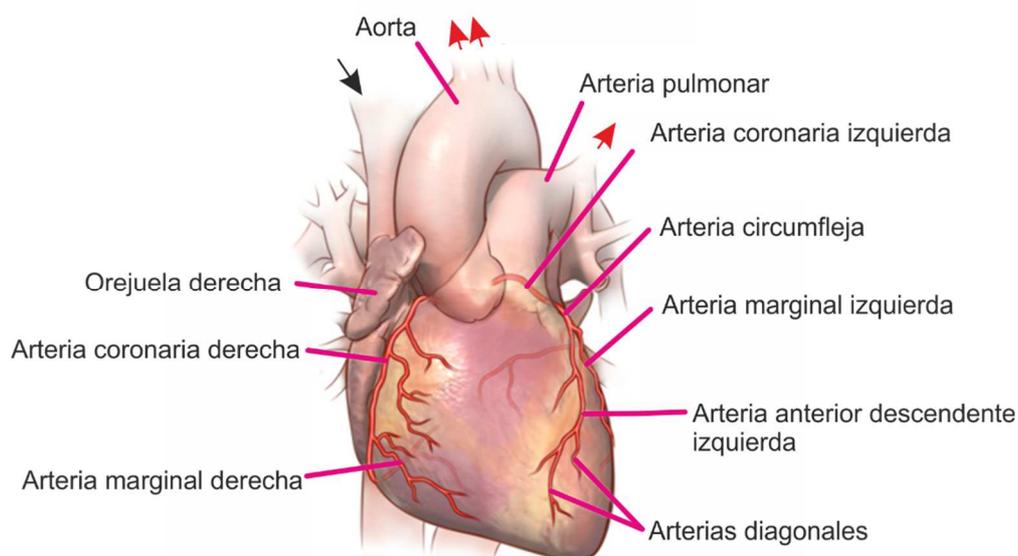


Figura 1.2. Representación esquemática de las arterias coronarias

Analizando su contenido celular, el corazón está formado por diferentes tipos celulares que en conjunto contribuyen al mantenimiento de las propiedades estructurales, mecánicas, bioquímicas, y eléctricas del corazón. Son los cardiomiocitos los que ocupan la mayor parte del volumen tisular, y se pueden clasificar en dos grupos: (1) los cardiomiocitos auriculares y ventriculares, responsables de la contracción muscular; y (2) los de conducción y excitación. Las células restantes corresponde a: (1) fibroblastos cardíacos, (2) células endoteliales que forman el endocardio, las válvulas cardíacas y los conductos sanguíneos, y (3) células del músculo liso que conforman el sistema vascular de entrada y salida del corazón, así como las arterias coronarias³ (Fig. 1.1).

Las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) se pueden definir como el conjunto de trastornos que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos. Datos recientes publicados por la Organización Mundial de la Salud, estiman que las ECVs son las responsables del fallecimiento de ~18 millones de personas al año, representando la mitad de todas las muertes que ocurren en Estados Unidos y en Europa⁵. Un número sustancial de estas muertes se atribuye al consumo de tabaco, aunque la inactividad física o una dieta poco saludable aumenta el riesgo de morir por enfermedad coronaria del orden de 2 a 3 veces⁶. En este contexto, la cardiomiopatía isquémica es la enfermedad cardíaca más común teniendo un impacto significativamente negativo tanto en el individuo que la padece, en su calidad de vida, como en su futuro personal y social.

Cardiomiopatía isquémica

El corazón para su correcto funcionamiento depende de un aporte continuo de nutrientes y de O₂ que de forma continua le llegan a partir del flujo sanguíneo. Como se puede observar en la figura 1.2 de las arterias coronarias principales, que se sitúan sobre la superficie del corazón, aparecen otras mucho más pequeñas que penetran hacia el interior; a través de las cuales el miocardio asimila estos nutrientes. De hecho, solo una décima parte del milímetro de la parte interior de la superficie del endocardio (véase figura 1.1) puede absorber los nutrientes directamente del flujo sanguíneo del interior de las cámaras, por lo que la fuente de nutrición del músculo cardíaco, desde las cámaras interiores, es muy baja.

La isquemia miocárdica es un fenómeno complejo en el que muchos factores contribuyen al daño final infligido al propio miocardio. Surge de manera específica cuando se produce un desequilibrio entre el aporte de O₂ y nutrientes y la necesidad de éstos por el miocardio que se ve afectado —la funcionalidad del miocardio es estrictamente dependiente de la irrigación sanguínea dado que, en su carácter de órgano altamente aerobio, el corazón posee una escasa reserva energética en caso de un aporte sanguíneo deficiente—. De hecho, uno de los elementos claves en este tipo de trastorno es la reducción del flujo sanguíneo a través de las arterias epicárdicas por la formación de placas arterioscleróticas (Fig.1.3). El tipo y grado de oclusión que puede ser total o parcial y la duración de la isquemia producida por la trombosis aguda coronaria —que afecta principalmente al VI—, determinan la extensión del tejido necrosado o isquémico y la severidad del evento agudo.

Inicialmente, el estrechamiento de las arterias coronarias puede ser lo suficientemente grave como para ocasionar una angina estable cuando hay esfuerzo o estrés. Sin embargo, este estrechamiento en algunas ocasiones puede ser asintomático y por razones que aún no se conocen bien, las placas alcanzan un punto en el que se rompen. Bajo estas circunstancias se puede formar un tapón compuesto por plaquetas y coágulos sanguíneos haciendo que un vaso sanguíneo ya estrecho se vuelva más susceptible de bloquearse por completo. Esta situación inestable puede progresar a una oclusión completa del vaso, ocasionando un infarto del músculo cardíaco^{7,8} y la pérdida de una cantidad significativa de miocardio funcional.

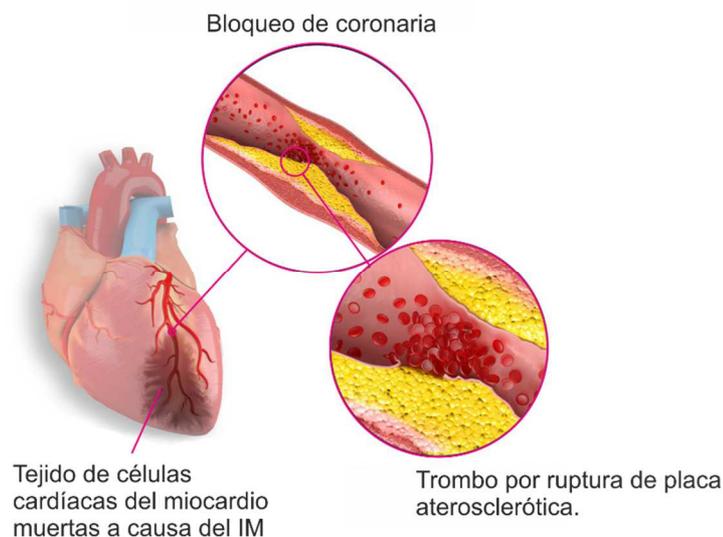


Figura 1.3. *Causas de la isquemia miocárdica.* La isquemia en el miocardio ocurre cuando el flujo de sangre hacia el miocardio es obstruido por un bloque parcial o total de una arteria coronaria, por la formación de un trombo (aterosclerosis).

Infarto de miocardio

El infarto agudo de miocardio (IAM) es un problema sanitario de primer nivel. Si bien su mortalidad en la fase aguda se ha reducido en los últimos años,

su pronóstico a medio y largo plazo sigue siendo malo debido a la repercusión estructural y funcional que conlleva la necrosis miocárdica. Tras el IAM, se ponen en marcha una serie de mecanismos de reparación local en el tejido infartado, fundamentalmente inflamación y fibrosis, que condicionan un riesgo de arritmia ventricular y de deterioro de la función miocárdica sistólica y diastólica, así como otros en el tejido no infartado, fundamentalmente fibrosis e hipertrofia, con una función inicial compensatoria pero que en la evolución conllevan cambios estructurales patológicos y pérdida de la función cardíaca. Es por ello, que el IAM conlleva un elevado riesgo de muerte y evolución a insuficiencia cardíaca (IC), la cual se caracteriza por la incapacidad del corazón para ejercer su función. La IC es un grave problema de salud pública que afecta a cerca del 1 % de la población mayor de 40 años y en torno al 10 % en mayores de 70 años. Es en la actualidad la patología cardiovascular más costosa en países industrializados (2% del presupuesto sanitario) y la primera causa de hospitalización en adultos mayores de 60 años. A pesar de los avances terapéuticos, tras su diagnóstico el riesgo de muerte al año es del 20-50 % según la población, superior al de la mayoría de cánceres. Todo ello ha hecho que los sistemas sanitarios estén desarrollando sistemas de atención específica para esta entidad, y que se haya fomentado la investigación en esta área. Por todo esto, existe una clara necesidad de nuevas estrategias que puedan alterar la evolución de la enfermedad, aliviar los síntomas y prolongar la vida del paciente.

Remodelado Cardíaco tras el IAM

El remodelado cardíaco se puede definir de forma global como el conjunto de respuestas celulares que se inician tras un daño cardíaco y cuya evolución en el tiempo es progresiva y lenta, evocando finalmente a la muerte del tejido afectado y a la aparición de fibrosis. En este contexto de daño en el miocardio, el remodelado

adverso se asocia con variaciones en el tamaño, la forma y la función del corazón hasta hacerlo insuficiente y en determinados casos provocar aneurismas o incluso su ruptura. Este proceso adverso de remodelado, fue descrito por primera vez en un estudio publicado en 1986 por McKay y colaboradores, quienes evaluaron la expansión del IM, la dilatación parcial del VI así como una disminución en la contractilidad en la zona no infartada, estableciendo el concepto de remodelado ventricular izquierdo⁹. Fue en 1990 cuando Pfeffer y Braunwald, determinaron que tras un IAM extendido y transmural se producen alteraciones en la topografía tanto de la zona infartada como de la zona no infartada, lo que de forma significativa afectaba a la funcionalidad del corazón y *por ende* al pronóstico de supervivencia de los pacientes afectados¹⁰.

Aunque el IAM —que aparece, como se ha descrito con anterioridad, tras una obstrucción completa de una arteria coronaria epicárdica— es la causa aguda más frecuente relacionada con el desarrollo de un remodelado adverso cardíaco, otras patologías cardíacas asociadas con una sobrecarga de presión sobre el miocardio o incluso alteraciones en el volumen del propio corazón, también pueden estar asociadas con el desarrollo de un remodelado adverso. Así por ejemplo, procesos de hipertensión arterial de tipo crónico, enfermedades valvulares o el tratamiento de pacientes con determinados quimioterapéuticos como las antraciclinas, pueden estar asociadas con un remodelado adverso cardíaco¹¹.

Hay datos que ponen de manifiesto que tras un IAM en la zona del miocardio afectada se activa un protocolo de muerte celular por oncosis junto con una respuesta celular adversa; asociada con el estrés biomecánico por sobrecarga de presión al que se ve sometido la pared del miocardio. Estos procesos que se han descrito, desencadenan a continuación una respuesta inflamatoria local de fase aguda que tiende a generalizarse^{12,13} con una acumulación local de células polimorfonucleares

y macrófagos así como la activación de leucocitos, proteína C reactiva y un aumento en la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias^{14,15}. Un rasgo característico de este proceso de remodelado adverso, es la aparición de una respuesta adaptativa del propio miocardio al incremento de tensión que su pared empieza a soportar tras el IAM, con el objetivo de mantener el gasto cardíaco. Una de estas respuestas adaptativas es el aumento de tamaño del propio cardiomiocito, la activación del programa de muerte celular apoptótico así como variaciones en la composición y organización de los componentes que forman la matriz extracelular (MEC). Se inicia entonces una respuesta fibrótica adversa que de forma paulatina empieza a extenderse y a afectar la zona no infartada. Este efecto adverso está potenciado por el hecho de que ~2/3 de la población de células que conforman la estructura del corazón son células de tipo no muscular. De hecho, uno de los tipos celulares más abundantes, son los fibroblastos (~70 % del total). Estos últimos son muy sensibles a determinadas señales intercelulares que son liberadas al medio por otros tipos de células adyacentes a ellos y que inducen su activación^{9,10}.

La suma de todos estos eventos adversos que se activan tras un IAM, en especial el proceso de fibrosis, conducen a una disfunción sistólica y diastólica del ventrículo y finalmente a IC. De esta forma, el proceso de remodelado cardíaco que se activa de forma inicial como una respuesta compensatoria al daño y al estrés biomecánico, poco a poco se convierte en un proceso adverso que conduce a una disfunción ventricular^{10,16}. El conocimiento detallado de los mecanismos moleculares que determinan el desarrollo de un remodelado adverso tras un IAM, favorece el diseño de nuevos tratamientos que sean capaces de detener o bloquear el proceso.

Inflamación

En la fase aguda de la isquemia miocárdica las lesiones que se producen sobre el intersticio de la zona afectada así como la muerte celular por oncosis de los diferentes componentes celulares del miocardio, causa la activación de una respuesta pro-inflamatoria aguda a través de la acción concertada de varios procesos moleculares: (1) la activación en cascada del complemento; (2) la producción de especies con oxígeno reactivo; y (3) la activación de los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Estos últimos pueden interactuar con los receptores de reconocimiento a patrones moleculares asociados al patógeno (PRR), entre ellos los receptores de tipo Toll (TLRs), así como con la familia de receptores tipo NOD (NLRs)¹⁷⁻¹⁹. Como consecuencia se produce un incremento de la expresión de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), de quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), así como varias citocinas entre las que se destacan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina-6 (IL-6), y la interleucina-33^{20,21}; las cuales inducen el reclutamiento de células inflamatorias en la zona del miocardio infartado, lo que acentúa aún más esta respuesta pro-inflamatoria asociada al IAM. Al dirigirse a la zona del borde del VI infartado, la infiltración de leucocitos puede inducir la muerte de los cardiomiocitos, extendiendo así la lesión isquémica más allá de la zona de infarto original.

Diversos estudios han evidenciado que una respuesta pro-inflamatoria excesiva, persistente y expandida hacia la zona del borde del VI infartado puede empeorar de forma significativa el proceso de remodelado adverso del VI tras el

IAM, a través de: (1) activación de proteasas²²; (2) el aumento de la expresión de citocinas que puede inducir la apoptosis de los cardiomiocitos y suprimir la contractilidad del miocardio; (3) el aumento de deposición de MEC que puede resultar en un VI más rígido y causar una disfunción diastólica²³; y (4) la activación de los fibroblastos cardíacos en la zona del borde del VI infartado lo que puede ayudar a expandir la fibrosis en la zona viable del VI.

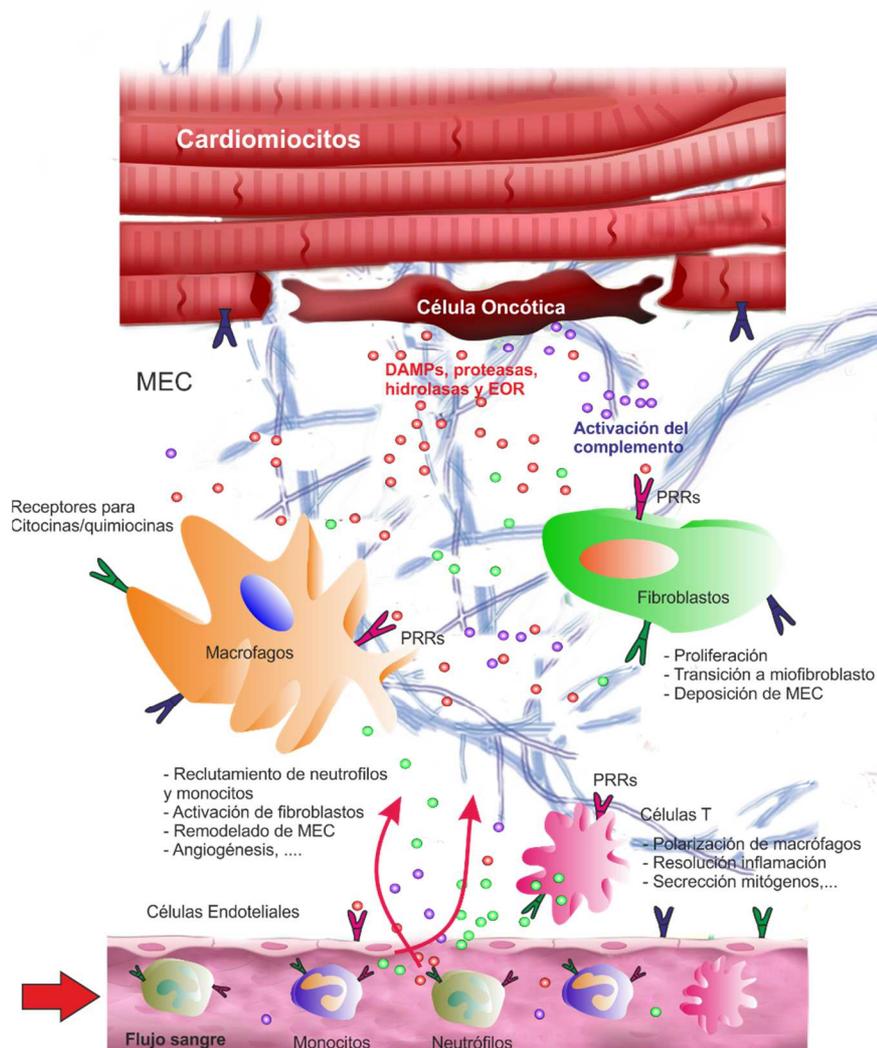


Figura 1.4. *Daño cardíaco inducido por inflamación.* La liberación del contenido citoplásmico de células oncóticas activa una respuesta inflamatoria que incluye la liberación de DAMPs, proteasas, hidrolasas y especies con oxígeno reactivo (EOR). Los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) activan directamente los receptores de reconocimiento PRRs presentes sobre macrófagos, monocitos y neutrófilos circulantes, así como células residentes, incluidas las células endoteliales, los fibroblastos y cardiomiocitos. Las proteasas, las hidrolasas y las EOR

activan el sistema del complemento, así como al inflammasoma, y degradan la matriz extracelular (MEC), lo que induce la propagación de la respuesta inflamatoria. Macrófagos residentes el tejido dañado secretan citocinas para atraer monocitos y neutrófilos, activar las células endoteliales para promover la adhesión y permeabilidad celular, y remodelar la MEC.

Datos experimentales han demostrado que los niveles de expresión miocárdica de las citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α , e IL-1 β) a las 8 y 20 semanas después del IAM en un modelo de rata, se asociaron significativamente con el volumen diastólico final del VI (VDFVI)²⁴. De manera similar, en pacientes infartados con elevación de ST, los niveles de IL-1 β medidos antes, durante y después de los 7 días posteriores a la intervención coronaria percutánea pudieron predecir el volumen sistólico final del VI indexado (VSFVI) y los valores de VDFVI medidos al año²⁵. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inflamatoria persistente o crónica al IAM puede proporcionar dianas terapéuticas para prevenir la remodelación adversa del VI después del IAM.

Fibrosis

Tras un IAM, $\sim 1 \times 10^3$ millones de células cardíacas mueren como consecuencia del estrés al que se ven sometidas tras el proceso isquémico²⁶. El miocardio de un mamífero adulto tiene una capacidad muy limitada para poder regenerarse después de una lesión, y las células muertas son reemplazadas por una cicatriz fibrótica¹¹.

La fibrosis miocárdica, se puede definir como el aumento de la deposición de colágeno en el miocardio dañado²⁷. Esta acumulación, que es progresiva, es causa de disfunción ventricular y afecta en primer lugar a la funcionalidad diastólica y posteriormente al rendimiento sistólico cardíaco²⁸. Hay varios tipos de fibrosis miocárdica (Fig.1.5). La *fibrosis intersticial reactiva* es un tipo de remodelado caracterizado por un incremento en la síntesis de colágeno donde no se pierde

miocardio viable²⁹. Como consecuencia se produce un incremento del volumen del intersticio sin modificarse el volumen del cardiomiocito. En este caso, la deposición de colágeno es típicamente difusa y ocurre en respuesta a varios estímulos tales como un incremento de la presión o el volumen dentro del VI. Este tipo de fibrosis suele tener un curso crónico y progresivo y aparece en pacientes con cardiomiopatía coronaria. Este tipo de remodelado cardíaco se puede revertir cuando el daño desaparece o en respuesta a una terapia dirigida. Otro tipo de fibrosis es la *de reemplazo* que se activa en respuesta a la muerte de los componentes celulares del miocardio infartado, con el consiguiente aumento de la deposición de colágeno tipo I y la expansión de la MEC²⁹⁻³¹. Este tipo de fibrosis conduce a una alteración de la conformidad de la cámara y *por ende* a un aumento de la rigidez ventricular lo que compromete finalmente el gasto cardíaco^{32,33}. Típicamente, la fibrosis de reemplazo ocurre en el contexto de la isquemia miocárdica, pero también puede ocurrir en respuesta a otros estímulos asociados con la muerte del cardiomiocito. Este proceso fibrótico está asociado con el aumento de la síntesis de colágeno, que reemplaza a los miocitos muertos. Este proceso puede ser agudo o crónico, y puede conducir a una fibrosis difusa o focal en el miocardio infartado. En este tipo de remodelado cardíaco, el tejido que se ve afectado no es viable y el miocardio no puede recuperar su contractilidad después de que se produzca la revascularización o cuando desaparezca el estímulo causal. Finalmente, la *fibrosis intersticial infiltrativa* es el tercer y último tipo de fibrosis, la cual se asocia con enfermedades de tipo infiltrativo como la amiloidosis o la enfermedad de Anderson-Fabry²⁹.

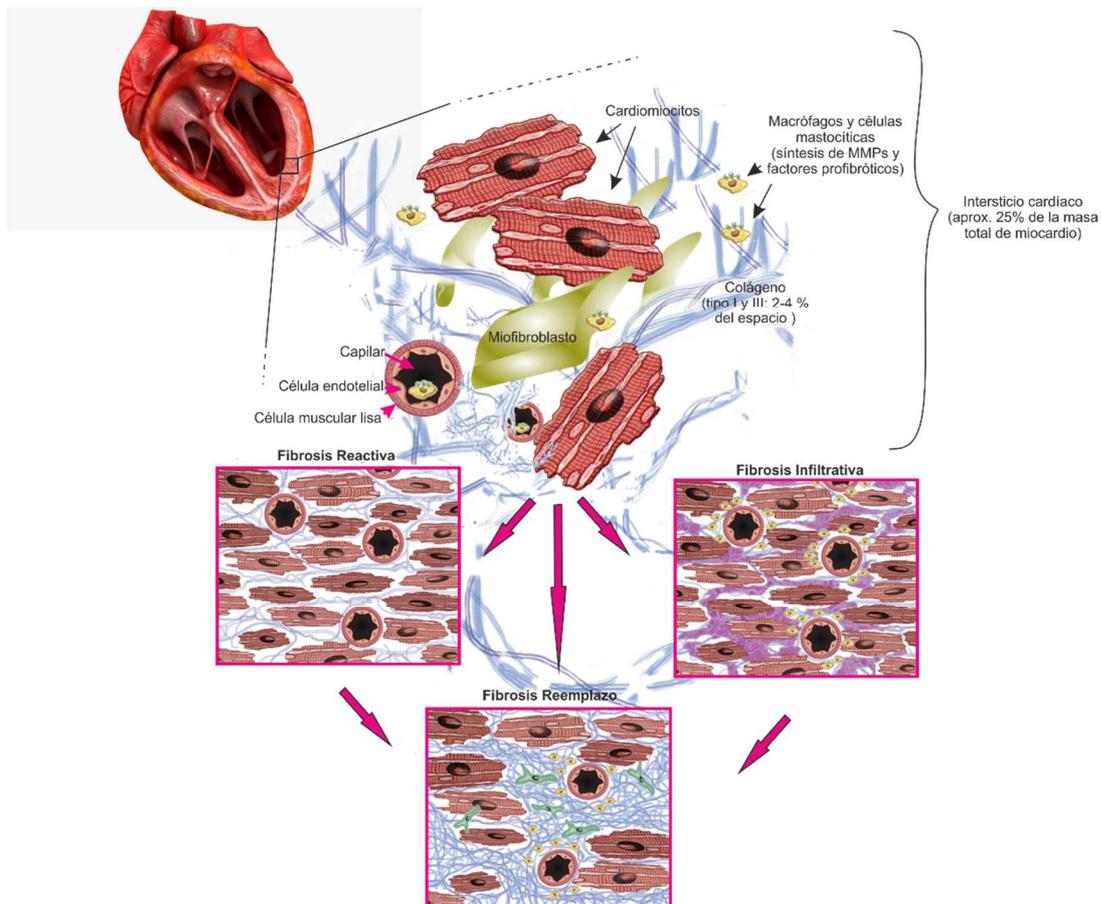


Figura 1.5.- *Etiofisiopatología de la fibrosis miocárdica*. La fibrosis miocárdica es un proceso complejo que involucra a cada componente celular del tejido miocárdico. El fibroblasto en el miocardio tiene una posición central en este proceso, aumentando la producción de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular bajo la influencia de varios factores (sistema renina-angiotensina, apoptosis de cardiomiocitos, citocinas proinflamatorias, especies con oxígeno reactivo).

En cualquier caso se ha demostrado que la fibrosis miocárdica afecta la función eléctrica normal del corazón, lo que predispone a la aparición de arritmias³⁴. De hecho, a la fibrosis cardíaca se la ha identificado como un elemento de riesgo autónomo en IC, es decir, predispone a los pacientes con IC a una muerte cardíaca súbita y aumenta la mortalidad general independientemente de la fracción de eyección³⁵.

Como se ha descrito antes, los fibroblastos cardíacos juegan un papel esencial en este proceso a través de la regulación de la homeostasis y remodelación de la MEC. En condiciones basales, la MEC está compuesta por colágeno fibrilar tipo I y III, fibronectina, laminina, fibrilina, elastina, glicoproteínas y proteoglicanos; siendo los fibroblastos cardíacos la fuente principal de estas proteínas que conforman la MEC³⁶. Los fibroblastos cardíacos también expresan metaloproteinasas (MMPs) de la matriz, así como inhibidores tisulares de estas MMPs, denominados TIMPs —proteínas reguladoras de la MEC—. Las MMPs son proteasas que degradan las proteínas que conforman la estructura de la MEC y los TIMP actúan inhibiendo la función proteolítica asociada con las MMPs, —la existencia de un equilibrio entre ambas proteínas es crítico para mantener la homeostasis de la MEC³⁷. La aparición de un proceso fibrótico es consecuencia de una hiperactividad de los fibroblastos cardíacos que proliferan en el miocardio afectado. Además se activan señales para el reclutamiento y la proliferación de células circulantes derivadas de la médula ósea que finalmente se infiltran en el miocardio infartado y se transforman en fibroblastos cardíacos³⁸. Varios estudios experimentales han evaluado un aumento de la expresión de varios biomarcadores relacionados con la síntesis de colágeno (PICP, PINP, PIIICP, y PIIINP) así como una reducción en suero de los niveles de CITP, un biomarcador relacionado con la degradación de colágeno tipo I. Datos que determinan una deposición significativa de colágeno en el miocardio infartado^{39,40}.

Aunque se han evaluado diferentes rutas de señalización implicadas en la activación del proceso fibrótico en el miocardio infartado^{41,42}, diversos estudios experimentales destacan la importancia de Galectina-3 (Gal-3) en la fibrogénesis cardíaca de modelos experimentales de IC⁴³⁻⁴⁵. De hecho, varios estudios realizados en la última década tanto en población sana como en pacientes con IC demuestran la estrecha relación entre la expresión de Gal-3, la fibrosis cardíaca y la IC⁴⁶⁻⁵⁰. La

Gal-3 tiene una recomendación de clase II en el manejo de la IC de acuerdo con las directrices de ACCF/AHA 2013 y 2016^{51,52}, convirtiéndose en un objetivo emergente para el tratamiento de la fibrosis y de la IC⁵³.

Galectinas

Las lectinas son proteínas que presentan sitios de unión específicos a oligosacáridos presentes en glucoproteínas y en glucolípidos. Dentro de este grupo se han identificado diversas familias, entre las que se encuentran las galectinas —proteínas con capacidad de unión a β -galactósidos—. Hasta la fecha, Galectina-3 (Gal-3) es la única que se ha encontrado en los mamíferos; inicialmente conocida como antígeno Mac-2⁵⁴.

Gal-3 es una proteína quimérica de ~30 kDa. Se compone de un dominio amino-terminal, que es la zona de unión específica a receptores; una secuencia interna repetitiva rica en glicina de tipo colágeno que sirve como sustrato para MMPs de la MEC; y un dominio carboxilo-terminal que contiene la región de unión a carbohidratos^{55,56} (Fig. 1.6). Se expresa de forma predominante en el citosol de diferentes tipos celulares en respuesta a un daño^{57,58}, aunque también puede estar presente en el núcleo, sobre la superficie celular o ser paulatinamente segregada a la MEC y finalmente pasar a la circulación por diversos tipos de células, entre los que se incluyen los macrófagos y los monocitos —células implicadas en diversos procesos como la inflamación crónica y aguda, o la inmunidad adaptativa e innata—⁵⁹.

Diversos estudios han identificado y caracterizado diferentes ligandos tanto intra- como extracelulares con los que Gal-3 puede interactuar. Mientras que algunas de estas interacciones son a través del dominio carboxilo-terminal de Gal-3 (véase Fig. 1.6), la mayoría dependen de la interacción entre su dominio amino-terminal con estructuras proteicas celulares^{60,61}. Esta interacción induce una respuesta generalmente asociada con la activación de diferentes rutas de señalización intracelular. En este sentido, y a causa de su amplia distribución y abundantes ligandos, Gal-3 puede regular el crecimiento, la diferenciación y migración celular, la angiogénesis, procesos de quimio-atracción celular así como diversas actividades inmunes o incluso el desarrollo de enfermedades fibróticas⁶²⁻⁶⁵.

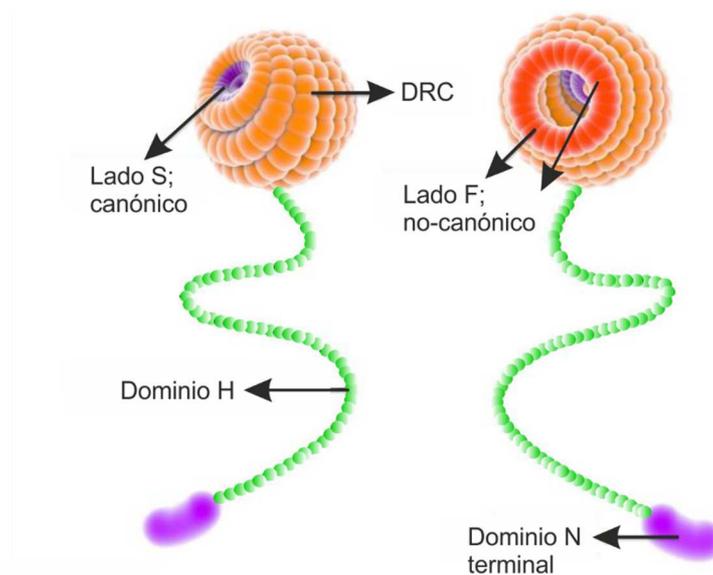


Figura 1.6. Estructura molecular de Galectina-3. Representación simplificada de la estructura de Galectina-3 que indica el dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), el dominio H y el dominio amino-terminal (N-terminal). El DRC es globular y consiste en varias ranuras de unión de carbohidratos. Los sitios de unión de carbohidratos más frecuentemente descritos son la cara S canónica y la cara F no canónica. La cara S se une a β -galactósidos como la lactosa, mientras que los carbohidratos más grandes como MCPs y GMs se unen a la cara F. El DRC continúa como una cola larga y delgada que se muestra de color verde, la cual termina en el dominio terminal N, que se muestra de color púrpura; este último dominio no muestra actividad de

unión de carbohidratos. DRC: dominio de reconocimiento de carbohidratos; MCP: pectina cítrica modificada; GM: galactomanano.

También se ha demostrado que Gal-3 está involucrada en el fenómeno de transición epitelio-mesenquimal inducido por la integrina $\beta 1$, el cual se caracteriza por una pérdida de contacto intercelular, dispersión celular y un aumento tanto de la migración celular como de expresión de fibronectina⁶⁶. Otra de las propiedades asociadas con Gal-3 está relacionada con su capacidad para inducir la proliferación y activación de los fibroblastos cardíacos, la deposición de colágeno, así como la disfunción ventricular⁴⁵; en el estudio publicado por Sharma y col., se identifican sitios de reconocimiento para Gal-3 sobre fibroblastos cardíacos de ratas infartadas así como en el seno de la MEC⁴⁵. En este sentido, diversos estudios han tratado de discernir el posible papel terapéutico que podría tener la inhibición de la expresión y secreción de Gal-3 frente a la fibrosis adversa cardíaca inducida tras el IAM. Se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión endógena de Gal-3 ó su inhibición mediante el uso de N-acetil-lactosamina previene: (1) la fibrosis miocárdica, (2) la activación de los fibroblastos; y (3) la expresión/secreción de colágeno, en el miocardio de ratones tratados con Ang-II o sometidos a un procedimiento quirúrgico para una construcción aórtica⁴⁴.

Otros estudios han tratado de evaluar a través de que vías de señalización intracelulares Gal-3 es capaz de activar el programa fibrótico. En un estudio publicado en 2012 por Azibani y cols., se demostró que Gal-3 a través de la activación de smad-3, era capaz de inducir la activación de los fibroblastos cardíacos tras el IM y con ello una respuesta fibrótica adversa⁶⁷.

Hipertrofia

El remodelado del VI se caracteriza por cambios parietales estructurales, así como una progresiva dilatación de la cámara del VI. Este proceso puede ocurrir en respuesta al aumento crónico de las condiciones de carga en el contexto de la hipertensión arterial o como consecuencia a una evolución desfavorable tras el IM. En general, el crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos es una respuesta adaptativa a estímulos de estrés que se producen sobre el miocardio. Las características que definen a la hipertrofia cardíaca es un aumento de la masa cardíaca debido a: (1) un incremento del tamaño de los cardiomiocitos; (2) una activación de la síntesis proteica; y (3) una reorganización del citoesqueleto del cardiomiocito⁶⁸⁻⁷⁰. Dependiendo del estímulo al que se ve sometido el miocardio, el aumento del tamaño cardíaco se puede dividir en *hipertrofia fisiológica* e *hipertrofia patológica* (Fig. 1.7). La *hipertrofia fisiológica* —que aparece durante el desarrollo cardíaco post-natal, en corazones de mujeres embarazadas o en respuesta a un programa de ejercicio intenso—, está asociada con aumentos proporcionales en la longitud y anchura de los cardiomiocitos, lo cual conduce a una hipertrofia del VI de leve a moderada, y se caracteriza por un mejor rendimiento cardíaco a través de un aumento en el volumen de la apoplejía, contractilidad y consumo de O₂ con relajación preservada.

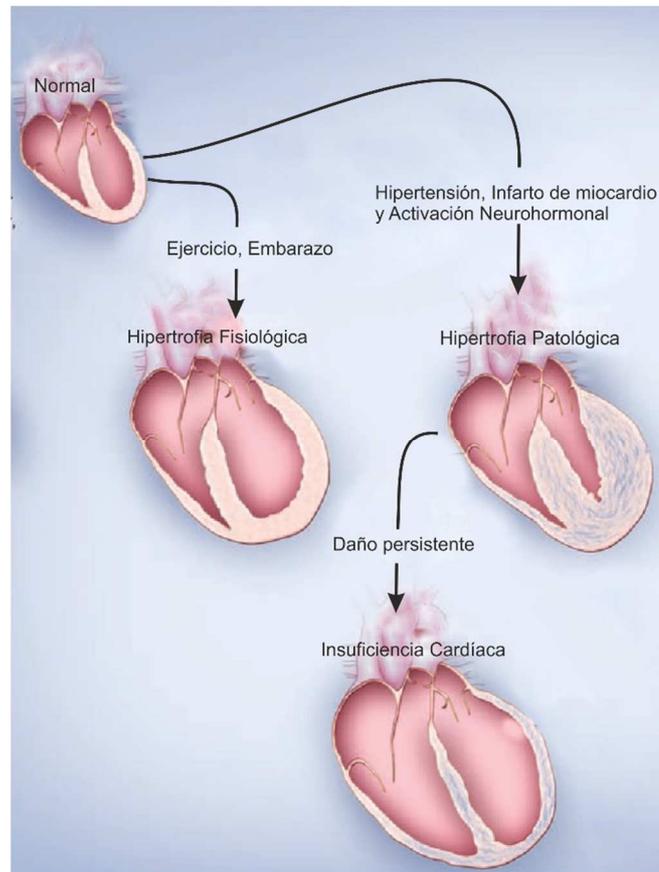


Figura 1.7. Condiciones que conducen al remodelado cardíaco y que contribuyen al desarrollo de hipertrofia.

Por el contrario, la hipertrofia de tipo patológico —que surge de trastornos hemodinámicos comunes como hipertensión, anomalías valvulares y tras un IAM— desencadena una transición metabólica en el corazón de un metabolismo de tipo oxidativo a un metabolismo más glicolítico característico de la etapa fetal. Este cambio metabólico es precedido y se ve acompañado por la re-expresión de genes cardíacos de tipo fetal, que codifican: (1) los péptidos natriuréticos, como ANF y BNP; (2) proteínas involucradas en la contractilidad, como α -MHC, β -MHC y ACTA1; (3) el manejo del calcio, como SERCA2a; y (4) proteínas implicadas en el propio metabolismo, todos ellos considerados como biomarcadores hipertróficos^{69,71,72}.

En el contexto de los biomarcadores, diversos estudios han evaluado la cuantificación de la isoforma soluble del ST2 (sST2) como un valor pronóstico de la IC, lo que ha evidenciado su valor tanto aditivo como individual frente a otros biomarcadores previamente establecidos⁷³. La cuantificación del nivel de sST2 en suero, está incluida en las directrices del *American College of Cardiology/American Heart Association* para la estratificación del riesgo aditivo de pacientes con IC aguda y crónica del año 2017. Además, los inmunoensayos generados para cuantificar la concentración en suero de sST2 están aprobados para uso clínico por la *US Food and Drug Administration*, recibiendo el sello de la *Conformité Européenne*. Sin embargo, a pesar de su aprobación y el uso creciente de sST2 por parte de los médicos en ejercicio, los problemas relacionados con su fisiopatología siguen sin comprenderse de forma completa, incluido los mecanismos asociados con su expresión, así como la identificación de la fuente(es) que expresan y secretan sST2 a la circulación de este tipo de pacientes.

Los primeros indicios de la producción de sST2 por el miocardio están relacionados con los experimentos *in vitro* realizados por Weinberg y cols. usando cardiomiocitos neonatales⁷⁴. Estos datos, publicados hace ya más de 10 años desde el laboratorio de Richard T. Lee en Boston, favorecieron que otros grupos comenzaran a estudiar la isoforma soluble sST2 en el área cardiovascular estando muy bien resumidos en el trabajo realizado por Kakkar y Lee⁷⁵.

Desde el punto de vista de su transcripción, el gen *IL1RL1* esta modulado por dos promotores que junto con procesos paralelos de corte y empalme generan múltiples isoformas entre las que se incluye una isoforma transmembrana denominada ST2L y otra circulante y soluble denominada sST2. Tanto ST2L como sST2 son expresadas por cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos en respuesta a una sobrecarga de presión sobre la pared del miocardio tras un IAM. En un estudio

publicado en 2005 por Schmitz y cols., se identificó a interleucina-33 (IL-33) como el ligando del receptor de membrana ST2L⁷⁶. IL-33 es una citocina similar a IL-1 que puede ser secretada por la mayoría de las células del miocardio en respuesta a un daño⁷⁵. Otros estudios experimentales realizados en células cardíacas sometidas a una deformación biomecánica, así como en modelos animales de IM y sobrecarga de presión, han demostrado que el sistema IL-33/ST2L se activa en respuesta al estrés sobre el miocárdico^{75,77,78}.

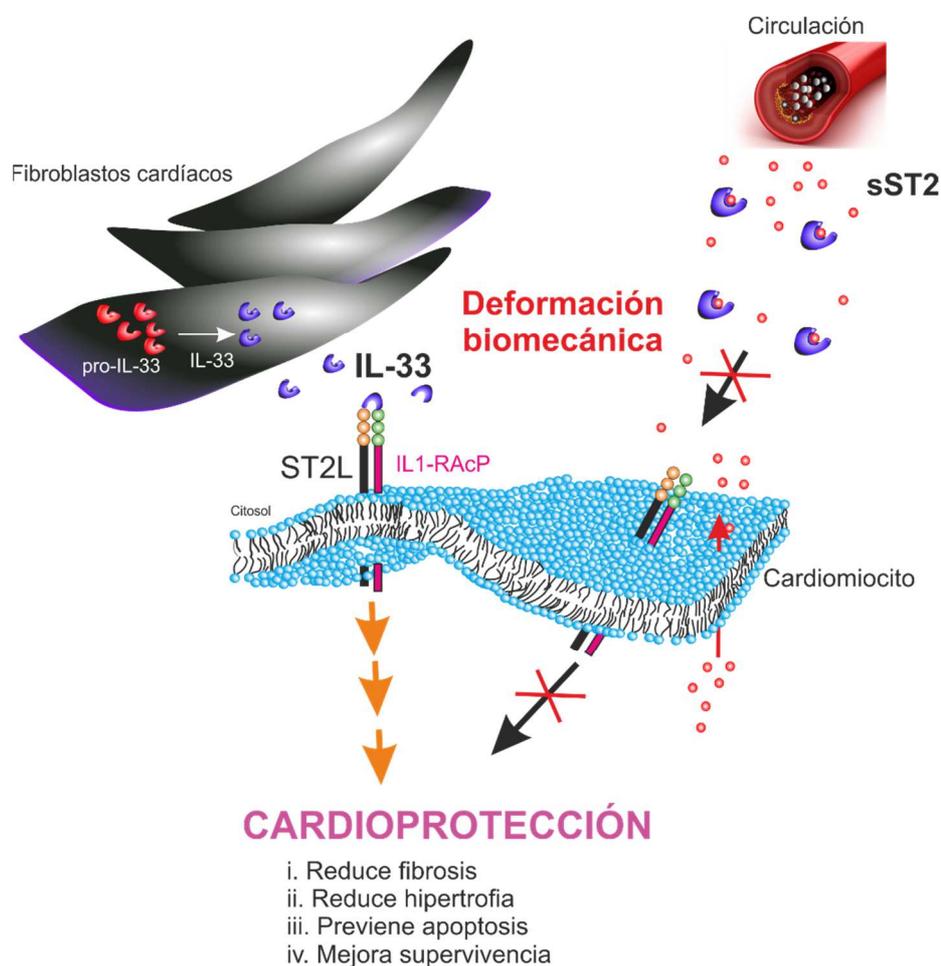


Figura 1.8. *Sistema IL-33/ST2L en la respuesta cardíaca al estrés biomecánico.* El sistema IL-33/ST2 es un sistema de señalización fibroblasto-cardiomiocito recientemente descrito. Esta vía de señalización induce una respuesta anti-hipertrofica y cardioprotectora frente a una sobrecarga de presión en el miocardio infartado. IL-33 es producida por los fibroblastos cardíacos sometidos a una sobre-carga de presión. IL-33 se une a un complejo receptor compuesto por la isoforma ST2L y la proteína accesoria del receptor IL-1 (IL-1RAcP).

La interacción de IL-33 con ST2L induce una respuesta cardioprotectora. La unión de IL-33 a su receptor puede ser bloqueada por la isoforma soluble sST2. En el medio extracelular, sST2 puede unirse a IL-33, y de esta forma disminuir la concentración de IL-33 que está disponible para unirse a ST2L; reduciendo el efecto cardioprotector de IL-33.

Esta activación parece ser una respuesta adaptativa y de defensa del miocardio frente al daño, porque la interacción entre IL-33 y ST2L activa una respuesta intracelular que es cardioprotectora (Fig. 1.8). De hecho, varios estudios experimentales han demostrado que un aumento de IL-33 reduce la hipertrofia cardíaca, la fibrosis, la expresión de diferentes péptidos natriuréticos la disfunción ventricular y la mortalidad prematura en ratones sujetos a una sobrecarga de presión del VI⁷⁷. Por otro lado, el tratamiento con IL-33 a ratas infartadas redujo el tamaño del infarto, la fibrosis y la apoptosis, y mejoró la dilatación ventricular, la función contráctil y la supervivencia tras el IM⁷⁹, a través de la activación de MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88), IRAK (quinasa asociada al receptor de interleucina-1), y ERK (quinasa regulada por señal extracelular), y en última instancia NF- κ B (factor nuclear- κ B). Estos efectos beneficiosos de IL-33 son mediados específicamente a través del receptor de membrana ST2L, ya que al bloquear al receptor ST2L se eliminan todos los efectos cardioprotectores asociados al tratamiento con IL-33^{77,79}.

La isoforma circulante soluble sST2, actúa como un receptor señuelo para la IL-33, de manera que altos niveles de sST2 bloquean los efectos favorables de IL-33 al limitar la activación de la cascada de señalización intracelular desencadenada por la interacción IL-33/ST2L (Fig. 1.8). Por lo tanto, niveles elevados de la isoforma soluble sST2 se asocian con un aumento de la fibrosis miocárdica, remodelación cardíaca adversa y peores resultados cardiovasculares⁸⁰.

Cardioprotección por Metformina: Efectos beneficiosos más allá de la reducción de los niveles de Glucosa

Tal como se ha descrito anteriormente en esta memoria de Tesis Doctoral, el IM constituye un problema sanitario de primer nivel⁸¹ que conlleva un elevado riesgo de muerte y evolución a IC⁸². La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la calidad y prolongar la vida del paciente es de vital importancia.

La metformina es uno de los fármacos más frecuentemente indicados en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2; sin embargo, los efectos de este fármaco no se limitan a su capacidad de reducir la concentración sérica de glucosa⁸³. Estudios recientes han sugerido que metformina también tiene un efecto protector cardiovascular al mejorar de forma significativa el remodelado ventricular post-IM⁸⁴⁻⁸⁷. Sin embargo, los mecanismos moleculares asociados con estos efectos beneficiosos sobre el miocardio son controvertidos y limitados.

Infarto de miocardio: Modelo experimental por ligación de la arteria coronaria anterior descendente en ratas

El modelo experimental de IM a través de la ligación de la arteria coronaria anterior descendente izquierda en roedores (Fig. 1.9) ha sido el modelo animal de IC más utilizado en la investigación en cardiología experimental^{88,89}. Este modelo simula los aspectos fisiopatológicos del remodelado adverso, que han sido descritos previamente en esta memoria, tras el IM y, por lo tanto, proporciona una visión útil de los mecanismos que pueden ser aplicables a la terapia para el uso humano⁸⁹. De hecho, este modelo experimental induce cambios hemodinámicos similares a los que se presentan en humanos tras un IM, como la disminución de la frecuencia cardíaca, la presión arterial media^{90,91} y el aumento de la presión diastólica final⁹¹⁻⁹³. Además,

el modelo produce cambios sistémicos en la regulación neurohormonal del animal⁹³, cambios en la capilarización periférica^{94,95}, así como alteraciones periféricas en relación con el daño oxidativo o el metabolismo⁹⁶.

El modelo fue descrito por primera vez en 1946 en un trabajo publicado por Heimbürger en animales pequeños⁹⁷ y modificado progresivamente por Johns y Olson en 1954⁹⁸. Aunque el procedimiento experimental se describe con detalle en el *Capítulo 2* de esta memoria de Tesis Doctoral —junto con otros modelos experimentales *in vitro*, donde cardiomiocitos son sometidos a protocolos de deformación celular—, la ligación consiste en bloquear el paso de flujo de sangre a través de la coronaria anterior descendente izquierda mediante su obstrucción física por el paso de una sutura a su alrededor⁹⁹.

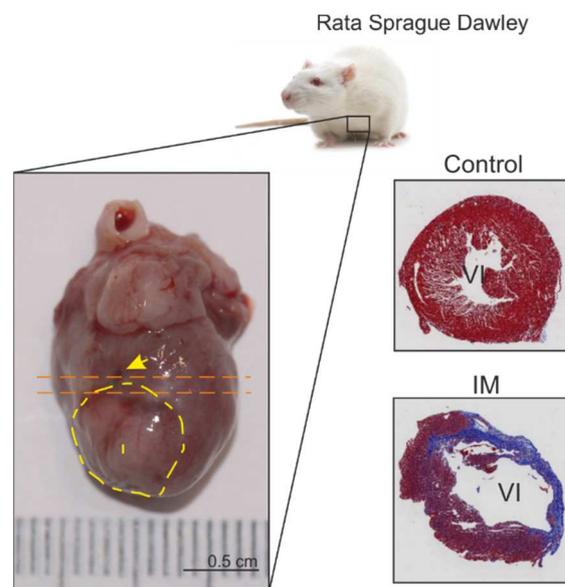


Figura 1.9. *Modelo animal de ligación de la arteria coronaria izquierda.* A la izquierda se muestra corazón infartado de 4 semanas de evolución. La flecha que aparece de color amarillo indica el punto de ligación. La zona infartada (I) se delimita con líneas discontinuas que se muestran en color amarillo. A la derecha de la figura se muestran dos cortes transversales (Tinción de Masson) obtenidos de secciones transversales (sección delimitada con líneas discontinuas naranjas) de corazones control (arriba) y de corazones infartados de 4 semanas de evolución (abajo).

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

¿Cuál es el problema?

Tal como se ha descrito previamente, una concentración sanguínea elevada de Gal-3 ó de la isoforma soluble sST2, representa un marcador de mal pronóstico en pacientes con IC. No existen datos sobre las fuentes y la regulación de la expresión de sST2 ni de los mecanismos moleculares asociados con la expresión de Gal-3 y sus ejes de señalización. Por lo tanto, no existen tratamientos destinados a modular específicamente la expresión de estos biomarcadores, lo que podría contribuir a diseñar nuevas estrategias terapéuticas para reducir dichas concentraciones.

¿Cuál es el impacto?

La IC es un síndrome complejo con una enorme carga socio-sanitaria en términos de coste, morbilidad y mortalidad. En la progresión de esta enfermedad tienen un importante papel los cambios estructurales y funcionales a nivel del miocardio, lo que entendemos como remodelado cardíaco adverso. La principal etiología de la IC es el antecedente de IM, cuya aparición va asociada de forma típica a fenómenos de remodelado miocárdico tanto en el tejido infartado como en el sano, que determinan la progresión hacia IC. La concentración en suero de sST2 y de Gal-3 identifica un peor pronóstico, pero también un remodelado miocárdico más adverso en estos pacientes. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, los mecanismos moleculares que modulan la producción de estos biomarcadores y su señalización a nivel celular no son bien conocidos, lo que supone una oportunidad en la búsqueda de nuevos tratamientos que eviten el remodelado miocárdico adverso y la progresión hacia IC.

En este estudio nos planteamos la hipótesis de que, la identificación de las fuentes, así como los mecanismos asociados con la expresión específica de Gal-3 y sST2 en el miocardio infartado, nos permitirá desarrollar tratamientos más específicos dirigidos a modular su expresión, lo cual mejorará el remodelado adverso cardíaco tras un IM. En base a lo anteriormente expuesto, los objetivos generales planteados en el plan de trabajo de esta Tesis Doctoral son la caracterización de los mecanismos moleculares asociados con la expresión y secreción de Gal-3 por cardiomiocitos y estudiar su acción paracrina sobre los fibroblastos cardíacos adyacentes, así como la identificación de los elementos reguladores de la expresión específica de la isoforma sST2 por el miocardio infartado.

Expresión y secreción de Gal-3 en el miocardio infartado

El plan de acción consiste en identificar el mecanismo molecular asociado con el efecto cardioprotector de metformina sobre la fibrosis cardíaca tras el IM. Nos centraremos en los mecanismos moleculares asociados con la expresión de Gal-3 por cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos tras un IM y en la identificación de plausibles interacciones de tipo paracrino entre ambos componentes celulares. El aumento de la expresión y secreción de Gal-3 ocurre cuando el miocardio se ve sometido a un aumento de la tensión mecánica sobre su pared.

Este estudio se ha realizado usando un modelo animal de IM mediante la ligación de la arteria coronaria anterior descendente izquierda. Además, se ha utilizado un cultivo primario de cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos aislados de corazones de ratones C57BL6/J a los que se les somete a protocolos de deformación biomecánica celular. Para estudiar la señalización paracrina entre cardiomiocitos y

fibroblastos cardíacos se utiliza un protocolo de co-cultivo. Todos los procedimientos experimentales se han detallado en el *Capítulo 2*.

Los objetivos específicos planteados para la consecución del plan de trabajo planteado son:

Dilucidar los mecanismos subyacentes a la acción anti-fibrótica de metformina en el miocardio infartado

- ⊗ Efecto de metformina sobre el tamaño de IM de 4 semanas de evolución.
- ⊗ Efecto de metformina sobre la fibrosis cardíaca adversa en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ⊗ Efecto de metformina sobre el daño oxidativo y muerte celular por apoptosis en las zonas del borde y del infarto del VI.

Estudiar la relación entre las enzimas NADPH oxidasa mitocondrial 4 (mitoNox) y PKC α con la expresión y secreción de Gal-3 como posibles objetivos terapéuticos

- ⊗ Efecto de metformina sobre la expresión de Gal-3 en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ⊗ Efecto de metformina sobre la expresión y actividad de la enzima AMPK y de su diana tuberina en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ⊗ Efecto de metformina sobre la expresión y actividad de las enzimas mitoNox y PKC α en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ⊗ Determinación de la pureza de las fracciones de cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos aislados de corazones de ratones adultos C57BL6/J.
- ⊗ Determinación de la efectividad y efecto *off-target* de los siRNAs usados.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de AMPK α 1/ α 2 sobre las actividades mitoNox y PKC α de cardiomiocitos sometidos a deformación celular (DC).

- ⊗ Efecto del incremento de la expresión de AMPK por metformina sobre la activación de las enzimas mitoNox y PKC α en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de AMPK α 1/ α 2 sobre el nivel de expresión de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto de GKT137831 y Queleritrina sobre las actividades mitoNox y PKC α así como sobre el nivel de expresión de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento endógeno de mitoNox sobre la actividad PKC α y sobre el nivel de expresión de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de PKC α sobre la actividad mitoNox y sobre el nivel de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de AMPK α 1/ α 2 ó GKT137831 ó Queleritrina sobre la cardioprotección asociada al tratamiento con metformina en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto de la disminución de la fosforilación de AMPK sobre la vía de señalización intracelular mTORC1/p70S6K y la secreción de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento endógeno de p70S6K sobre el estado de fosforilación de mTORC1, expresión de mitoNox y la secreción de Gal-3 por cardiomiocitos sometidos a DC.

Estudiar vías de señalización entre cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos sometidos a deformación celular

- ⊗ Efecto del silenciamiento endógeno de AMPK α 1/ α 2 sobre el efecto de metformina en la secreción de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.

- ⊗ Efecto de los inhibidores GKT137831 ó Queleritrina sobre la secreción de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Determinación del efecto de la DC sobre la activación de fibroblastos primarios.
- ⊗ Efecto del medio condicionado de cardiomiocitos bajo DC con o sin metformina sobre la activación de fibroblastos cardíacos.
- ⊗ Efecto que produce la adición de medio condicionado aislado de cardiomiocitos silenciados para AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ y sometidos a DC sobre la activación de fibroblastos cardíacos.
- ⊗ Efecto que produce la adición del medio condicionado aislado de cardiomiocitos tratados con los inhibidores GKT137831 ó Queleritrina sobre la activación de fibroblastos cardíacos.
- ⊗ Efecto que produce la adición de medio condicionado aislado de cardiomiocitos silenciados para Gal-3 y sometidos a DC sobre la activación de fibroblastos cardíacos.
- ⊗ Efecto que produce la adición de medio condicionado aislado de cardiomiocitos silenciados para mitoNox o para PKC α y sometidos a DC sobre la activación de fibroblastos cardíacos.

Regulación específica de la expresión de la isoforma soluble sST2 tras el IM

El segundo objetivo general planteado en esta memoria trata de identificar los elementos implicados en la regulación específica de la isoforma soluble y circulante sST2 en el miocardio infartado —hasta la fecha se desconoce qué elementos regulan su expresión de forma específica; su identificación nos permitirá potenciar la señalización cardioprotectora a través del eje IL-33/ST2L—. El plan de

trabajo inicial consiste en estudiar si el efecto anti-hipertrófico asociado con metformina está relacionado con la modulación del sistema IL-33/ST2L.

Para lograr la consecución de este objetivo global se ha usado un modelo animal de IM mediante la ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, así como una línea celular de cardiomiocitos (H9c2) procedente de tejido embrionario de corazón de rata, al que se le sometió a un protocolo de DC mediante la co-estimulación con PMA+A23187.

Los objetivos específicos a desarrollar en este último plan de trabajo son:

Evaluar si los efectos cardioprotectores asociados al tratamiento con metformina están relacionados con la activación del sistema de señalización IL-33/ST2L

- ⊗ Efecto de metformina sobre el tamaño de IM de 1 y 4 semanas de evolución.
- ⊗ Efecto de metformina sobre el proceso inflamatorio en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ Efecto de metformina sobre el sistema IL-33/ST2L en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ Efecto de metformina sobre la expresión cardíaca de sST2 en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ Efecto de metformina sobre la activación de las proteínas IκB y NF-κB en la zona del borde del VI infartado.

Caracterizar los factores que regulan la expresión diferencial de la isoforma soluble circulante sST2

- ⊗ Estudio del promotor dual del gen *IL1RL1* e identificación y selección de factores de transcripción asociados.

- ⊗ Revisión bibliográfica para la selección de factores de transcripción no relacionados hasta la fecha con el sistema IL-33/ST2L.
- ⊗ Efecto de metformina sobre los niveles de expresión y distribución subcelular del factor de transcripción Ying-yang 1 (Yy1) en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ Efecto de metformina sobre el estado de activación de la deacetilasa HDAC4 en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ Eficiencia del silenciamiento de Yy1 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de Yy1 sobre la expresión de las sST2 y ST2L en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de Yy1 sobre la vía de señalización intracelular activada tras la interacción de IL-33 con ST2L en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto de la inhibición farmacológica de la deacetilasa HDAC4 por KN-93 sobre la expresión de sST2, en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Efecto del silenciamiento de HDAC4 sobre la expresión y secreción de sST2, en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ⊗ Determinación de la interacción entre HDAC4 y el factor Yy1 en la zona del borde del VI infartado y en cardiomiocitos sometidos a DC.



Oxbow Bend (Grand Teton National Park). Ken Lane

2



Procedimientos, materiales y reactivos



MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO DE MIOCARDIO

Acondicionamiento de los animales al estudio

Con el objetivo de disminuir el estrés ocasionado por su transporte, los animales del estudio permanecieron en rack ventilados localizados en habitaciones acondicionadas para la experimentación animal con ratas —ciclos luz/oscuridad de 12 h, un 60 % de humedad relativa y alimentados en agua y comida *ad libitum*— por un periodo no inferior a 7 días antes de su manejo experimental.

Equipamiento

- ♣ Cubeta IVC (*individually ventilated cage*), mod. 1291H Next (Type III). Tecniplast (42,5 × 26,6 × 18,5 cm), capacidad 800 cm².
- ♣ Racks ventilados acoplados a un motor de impulsión de *Tecniplast* con ventilación, temperatura y filtro HEPA de entrada y salida.

Material

- ♣ Agua destilada de red
- ♣ Comida dieta comercial
- ♣ Ratas Sprague-Dawley (SD) adquiridas de ENVIGO (*Barcelona, España*)
- ♣ Ratones C57BL6/J de Jackson Laboratory (*Bar Harbor, ME, EEUU*)

Procedimiento

El acondicionamiento de cada uno de los animales en estudio, comienza a la llegada del animal al animalario, desde ENVIGO o Jackson para ratas y ratones, respectivamente.

1. Sacar los animales de la caja de viaje

2. Trasladar a cada uno de los animales a las cubetas. Se disponen en grupos de 3 en el caso de ratas SD y a un número máximo de 5 para ratones.
3. Colocar las jaulas en rack ventilados en unas condiciones de ventilación y temperatura adecuadas.
4. Mantener en estas condiciones siete días antes de iniciar cualquier procedimiento experimental.

Ligación de la arteria coronaria anterior descendente izquierda

Equipamiento

- ♣ Cámara de oxigenación compuesta por: Caja de metacrilato de 20×10×10 cm conectada a concentrador de O₂.
- ♣ Cortapelo mod. 2100 (*Thrive, España*)
- ♣ Fuente de luz fría con fibra óptica modelo MLC150 C de (*Motic™, España*)
- ♣ Lupa mod. SMZ-168 (*Motic*)
- ♣ Placa termostatzada (*PECO Services; V500DVStat*)
- ♣ Sistema de registro ECG mod. BioPac Systems, Inc MP36
- ♣ Ventilador mecánico mod. CWE SAR-830/AP

Reactivos y material

- ♣ Catéter Safety (Braun) IV con protección automática
- ♣ Material quirúrgico estéril (pinzas, tijeras, ...)
- ♣ Solución de Buprenorfina 0,3 mg/ml
- ♣ Solución de Ciprofloxacino Normon 2 mg/ml.
- ♣ Solución de Clorhexidina 1 % (v/v)
- ♣ Solución de Dexmedetomidina 0,5 mg/ml
- ♣ Solución de DPBS a 37 °C
- ♣ Solución de Ketamina 100 mg/ml

- ♣ Solución de Revertor® 5 mg/ml
- ♣ Sutura de polipropileno de 6-0
- ♣ Sutura de polipropileno de 4-0

Procedimiento

Tal como se ha descrito en el apartado anterior, antes de iniciar el procedimiento de ligación de la coronaria, los animales han permanecido durante al menos 7 días en rack ventilados bajo estricta supervisión del personal veterinario y técnico. Aproximadamente unos 30 min antes de iniciar el procedimiento quirúrgico, a los animales se les administra por vía subcutánea una solución de buprenorfina (0,05 mg/kg). Todo el procedimiento experimental descrito se realiza dentro de los 20 min posteriores a la administración de la anestesia.

1. Anestesiarse a los animales vía intraperitoneal con una mezcla compuesta por ketamina (75 mg/kg) y dexmedetomidina (0,5 mg/kg).
2. Rasurar el pelo de la zona de incisión y tratar la zona quirúrgica con una mezcla formada por clorhexidina+betadine (1:1).
3. Intubar para ventilar al animal por medio del uso de un “catéter intravenoso” de calibre 16 G usando un sistema de ventilación artificial.
4. Ajustar los parámetros de ventilación atendiendo a las indicaciones del sistema de ventilación y ajustándose al peso del animal.
5. Colocar al animal en decúbito lateral izquierdo, y mantenerlo sobre una mesa termostaticada a 37 °C y monitorizado mediante electrocardiograma continuo (ECG) durante todo el procedimiento experimental.
6. Realizar una toracotomía lateral izquierda mediante la realización de una pequeña incisión entre el tercer y cuarto espacio intercostal. Usar un retractor quirúrgico para permitir mantener el espacio intercostal abierto,

- así como retraer a los pulmones —con ayuda una gasa estéril humedecida en DPBS a 37 °C— hacia un plano fuera del área de retracción.
7. Desgarrar la membrana pericárdica que rodea el corazón, sin proceder a la exteriorización del corazón. A continuación, localizar el punto donde se va a realizar la ligación situado a ~8 mm del origen de la coronaria.
 8. Proceder a la ligación usando una hebra de polipropileno de 6-0 mediante la realización de 3 suturas a nudo simple.
 9. Cerrar el plano quirúrgico, primero aproximando las costillas y realizando después una sutura discontinua a nudo simple. Dejar insertado en un extremo de la incisión, un pequeño tubo de plástico de 2 mm de Ø para conectar el espacio intratorácico con el medio exterior.
 10. Aspirar con ayuda de una jeringuilla de 1 ml el aire que permanece, como consecuencia del procedimiento experimental, dentro de cavidad torácica antes de deslizar para extraerlo de forma suave.
 11. Aproximar para cerrar el plano muscular con el mismo tipo de sutura y realizar finalmente una sutura de tipo continuo para cerrar la piel.
 12. Aplicar una solución compuesta por clorhexidina y betadine (1:1), sobre los puntos de sutura cutánea.
 13. Inyectar vía intramuscular 0,25 mg/kg de Revertor[®], y colocar el animal en cámara de oxigenación.
 14. Administrar buprenorfina (0,05 mg/kg) tras 8 h de la cirugía y repetir hasta cuatro dosis. En paralelo, administrar solución de antibiótico.
 15. Controlar de forma visual y a diario la evolución de la herida, para evitar infecciones y controlar cualquier dehiscencia de la zona de sutura.

Recogida y procesamiento de muestras

Al sacrificio muestras de sangre procedente de la aorta abdominal, así como tejido de las zonas del borde e infarto del VI de ratas infartadas (Fig. 2.1) o del VI de ratas control, fueron aisladas y procesadas para estudiar a nivel molecular la evolución del remodelado cardíaco adverso tras el IM.

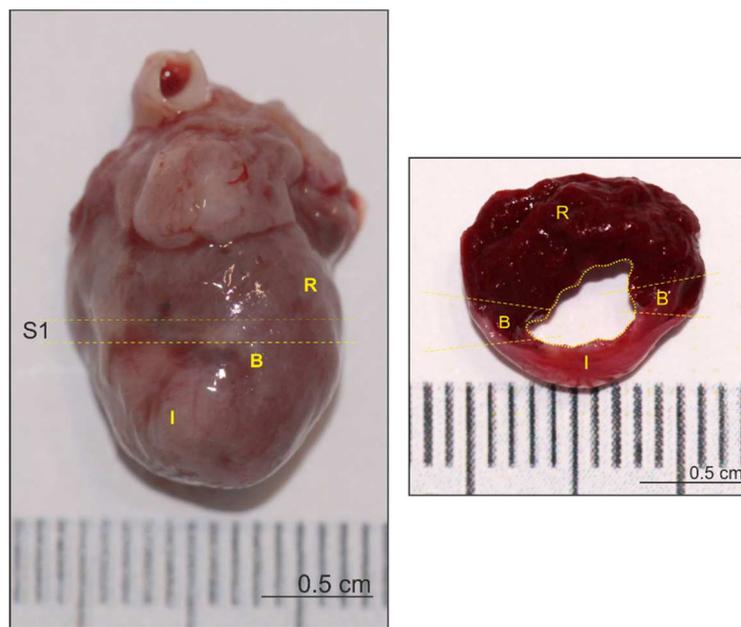


Figura 2.1. Identificación visual del miocardio infartado, zona del borde (B), infarto (I) y zona remota (R). (Izquierda) Imagen representativa de corazón infartado de rata de 4 semanas de evolución. (Derecha) Imagen representativa de una sección transversal, designada como S1 en panel izquierdo. La barra de escala que se muestra equivale a 0,5 cm.

Equipamiento

- ♣ Fuente de luz fría con fibra óptica mod. MLC150 C (*Motic*[™], *Leboriz, España*)
- ♣ Lupa modelo SMZ-168 (*Motic*)

Reactivos y material

- ♣ Criotubos de 2 ml
- ♣ Hielo seco

- ♣ Jeringuilla de 1 ml y aguja
- ♣ Material quirúrgico estéril (pinzas, tijeras, ...)
- ♣ Placa de Petri
- ♣ Solución de DPBS a 4 °C
- ♣ Solución RNAlater[®] a 4 °C
- ♣ Suero fisiológico a 4 °C

Procedimiento

1. Extraer el corazón y colocarlo sobre una placa de Petri en un baño de hielo. Lavar tres veces inyectando suero fisiológico a 4 °C, para eliminar restos de sangre.
2. Localizar el VD con ayuda de una pinza de disección no traumática y cortar para procesar después. Mantener el VI infartado en todo momento sobre baño de hielo y en DPBS a 4 °C.
3. Seccionar por el lado opuesto al punto de ligación con ayuda de unas tijeras y proceder a extender el miocardio sobre la placa de Petri.
4. Tras localizar la zona infartada del VI, que aparece de un color blanquecino, proceder a su aislamiento cortando con ayuda de un bisturí y marcar como zona infartada.
5. A continuación, aislar ~8 mm de la zona fronteriza al tejido infartado previamente procesado y marcar como zona del borde.
6. Congelar los tejidos inmediatamente en un baño de hielo seco en RNAlater[®] —para analizar los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa— o en seco para analizar los niveles de expresión de proteínas por western blot.

Preparación de las secciones cardíacas y medida del tamaño del infarto tras tinción con tricrómico de Masson

Esta técnica permite teñir las fibras de colágeno de tipo I. Para ello emplea tres colorantes: hematoxilina férrica de Weigert, fucsina y azul de anilina. Al finalizar el procedimiento experimental, el color azul intenso es indicativo de tejido fibroso, en color fucsia/rojo aparece teñido el citoplasma y finalmente en color negro se colorean los núcleos celulares.

Equipamiento

- ♣ Baño de flotación (*Kunz Instruments, Suecia*)
- ♣ Estación inclusora mod. Thermo HistoStar™ (*Thermo Fisher Scientific Inc.*)
- ♣ Microtomo motorizado Microm-HM-355S (*Thermo Fisher Scientific Inc.*)
- ♣ Placa de frío (*Thermo Fisher Scientific Inc.*)
- ♣ Procesador histológico de tejidos por microondas KOS Histostation (*Menarini Diagnostics*)

Reactivos y material

- ♣ Agua destilada
- ♣ Casetes histológicos (*Labolan*)
- ♣ Cubreobjetos de 24x60 (*Deltalab*)
- ♣ Etanol absoluto_TechniSolv® (*VWR Chemical*). En agua Milli-Q preparar etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°.
- ♣ Formaldehído al 4 % a pH 7,0 (*Panreac AppliChem*)
- ♣ Kit comercial de tinción Tricrómica según Masson con azul de anilina (*Bio-Óptica*)
- ♣ Medio de montaje NeoMount® (*Merck Millipore*)

- ♣ Parafina Histosec® (*Merck Millipore*)
- ♣ Portaobjetos con carga electrostática Thermo Superfrost Plus™ (*Thermo Fisher Scientific*)
- ♣ Sustituto de xileno Clear Rite™ 3 (*Thermo Fisher Scientific*)

Procedimiento

Al sacrificio y antes de su extracción, la administración —a través de la arteria carótida derecha— de KCl 10 % (p/v) detiene al corazón en diástole.

1. Extraer el corazón de la cavidad torácica y colocarlo en una placa de Petri sobre un baño de hielo.
2. Localizar el VD con ayuda de una pinza de disección no traumática y cortar para desechar. Mantener el VI infartado en todo momento sobre baño de hielo y en DPBS a 4 °C.
3. Cortar una sección de ~5 mm de espesor justo por debajo del punto de ligación en el VI.
4. Fijar en formol al 4 % (v/v) durante 48 h a temperatura ambiente, antes de proceder a su inclusión en bloques de parafina. Introducir las muestras en casetes histológicos.
5. Cortar secciones de 3 µm de grosor procedentes de estos bloques, mediante el uso del micrótopo.
6. Mantener las muestras en una estufa a 60 °C durante 1 h antes de incluirlas en xileno durante 10 min y en un gradiente decreciente de alcohol etílico después.
7. Iniciar tinción con Masson siguiendo el diseño experimental descrito por el fabricante.
8. Rehidratar, aclarar y montar sobre portaobjetos.

9. Visualizar y analizar las secciones teñidas usando un microscopio convencional con cámara digital integrada, Leica SN400F.
10. Analizar con ayuda de un equipo Leica SN400F (*Leica Microsystems*) las secciones teñidas.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica ampliamente utilizada, basada en la detección, amplificación y visibilización de un determinado antígeno, que normalmente es una proteína. Se basa en la identificación de un epítipo de la proteína diana por un anticuerpo específico contra él. Esta técnica permite identificar la localización específica de un determinado agente a nivel tisular o celular.

Equipamiento

- ♣ Cámara de desenmascaramiento antigénico Thermo PT-link (*Thermo Fisher Scientific*)
- ♣ Cámara de incubación (*Labolan*)

Reactivos y material

- ♣ Agua destilada
- ♣ Anticuerpo primario
- ♣ Anticuerpo secundario (Kit de inmunohistoquímica Dako EnVision Flex system, Dako., K4003)
- ♣ Cubreobjetos de 24x60 (*Deltalab*)
- ♣ Diaminobencidina (DAB) (*Dako*)
- ♣ Etanol absoluto_TechniSolv® (*VWR Chemical*). En agua Milli-Q preparar etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°.

- ♣ Hematoxilina de Harris (*Thermo Fisher Scientific*)
- ♣ Lápiz graso (*Dako*).
- ♣ Medio de montaje NeoMount[®] (*Merck Millipore*)
- ♣ Reactivo comercial inhibidor de peroxidasa endógena (*Dako*)
- ♣ Solución de lavado TBS-Tween (*Dako*)
- ♣ Solución enzimática comercial (*Dako*)

Procedimiento

El procedimiento experimental descrito nos permite cuantificar la acumulación de una proteína determinada en el tejido en estudio.

1. Mantener las muestras en una estufa a 60 °C durante 1 h antes de incluirlas en xileno durante 10 min. Rehidratación en un gradiente decreciente de alcohol etílico y mantenerlas en agua destilada.
2. Lavar en agua destilada. Desenmascaramiento antigénico inducido por calor (97 °C) de las secciones, usando una solución de desenmascaramiento adecuada a las especificaciones del anticuerpo primario.
3. Lavar en TBS-Tween tres veces durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Delimitar la zona de incubación con el lápiz graso (para evitar la dispersión y derrame de los reactivos y que queden centrados sobre el tejido).
5. Bloquear la peroxidasa endógena mediante solución comercial (3 % H₂O₂/TBS (1:1)) durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Lavar en TBS-Tween tres veces durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Bloquear uniones inespecíficas mediante incubación con tampón de bloqueo (BSA 5 % (p/v), Suero fetal bovino 10 % (v/v) en DPBS) durante 30 min a temperatura ambiente.

8. Incubar las secciones con el anticuerpo primario específico a la dilución de trabajo (en TBS-Tween) durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.
9. Lavar con TBS-Tween dos veces durante 5 min a temperatura ambiente.
10. Incubar con el polímero secundario del Kit de inmunohistoquímica durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda.
11. Lavar en TBS-Tween tres veces durante 5 min a temperatura ambiente.
12. Revelar con DAB de acuerdo a las instrucciones del Kit durante 5 min a temperatura ambiente.
13. Lavar con agua de 5 a 10 min.
14. Añadir Hematoxilina de Harris e incubar durante 2 min. a temperatura ambiente.
15. Lavar con agua durante 5 min.
16. Deshidratar, aclarar y montar.
17. Visualizar en microscópico. La inmunoreacción positiva se identifica como un precipitado de color marrón oscuro sobre fondo azul intenso.

MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO POR DEFORMACIÓN CELULAR

Subcultivo de la línea celular H9c2

La línea celular H9c2 procedente de ventrículo cardíaco de embrión de rata fue establecida en 1976 por Kimes y Brandt¹⁰⁰. Estas células —cardiomiocitos— tienen apariencia fusiforme y una longitud de ~100 µm cuando crecen en monocapa, pero tienden a fusionarse entre sí para formar células multinucleadas muy largas a las que se las denomina miotubos; las cuales son capaces de apilarse entre sí para formar estructuras tridimensionales. La fusión de los cardiomiocitos se evita impidiendo que la confluencia del cultivo supere el 70-80 %. El tiempo de

duplicación de las células en nuestras condiciones de cultivo es de unas 24 h por tanto un subcultivo por semana es suficiente para mantener la población de mioblastos

Equipamiento

- ♣ Baño de agua termostatzado a 37°C
- ♣ Cabina de flujo laminar vertical mod. AV100 (*Telstar*[®], *Tarrasa., España*)
- ♣ Centrífuga refrigerada mod. Universal 320 R Hettich Lab Technology TM
- ♣ Incubador de CO₂ al 5 %
- ♣ Microscopio invertido AE 20/21 (*Motic*[®])

Reactivos y material

- ♣ Cámara de Neubauer
- ♣ Material estéril necesario: puntas, frascos de cultivo, pipetas serológicas
- ♣ Medio de cultivo completo, compuesto por DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, suero fetal bovino al 10 % (v/v), penicilina 100 unidades/ml y estreptomycinina 100 µg/ml.
- ♣ Solución de DPBS a 37 °C
- ♣ Solución de Tripsina/EDTA 0,25 %

Procedimiento

El protocolo de subcultivo se realiza cuando el cultivo alcanza una confluencia de ~70-80 %. El número máximo de pases es de 8 ó 9 para evitar que los cardiomiocitos sufran alteraciones fenotípicas no deseadas.

1. Aspirar el medio de cultivo y lavar tres veces con DPBS (0,13 ml/cm²). Lavar y eliminar muy bien el medio de cultivo ya que los restos de suero inhiben la tripsinización posterior.

2. Precalear la disolución de tripsina en el baño de agua de 37 °C y añadir 5 ml por cada frasco en una proporción de 0,067 ml/cm². Comprobar que la monocapa de células queda completamente cubierta. Incubar durante 3 min a 37 °C dentro del incubador.
3. Dar unos ligeros golpes en el frasco de cultivo con la palma de la mano para despegar las células adheridas. Comprobarlo con el microscopio invertido.
4. Añadir DMEM con suero al frasco de cultivo en proporción de 0,13ml/cm² para parar la tripsinización, recoger la suspensión de células y pasarla a un tubo estéril de 50 ml que se mantiene frío en un baño de hielo.
5. Centrifugar a 480 ×g durante 10 min a 4 °C en la centrífuga refrigerada.
6. Desechar el sobrenadante. Resuspender el sedimento de células en medio de cultivo completo. Contar las células usando una cámara de Neubauer.
7. Diluir la suspensión de células en los frascos de cultivo junto con medio de cultivo completo hasta la concentración apropiada y retornar los frascos al incubador de CO₂.

Aislamiento de células adultas primarias de ratón

Los corazones fueron extraídos de la cavidad torácica de ratones macho C57BL6/J. Se realizó una perfusión retrógrada coronaria, método Langendorff, usando enzimas para digerir el corazón, seguido de un aislamiento celular mediante sedimentación por gravedad.

Equipamiento

- ♣ Baño de agua termostatzado a 37 °C
- ♣ Microscopio estereoscópico Leica M125C
- ♣ pHmetro
- ♣ Sistema de perfusión tipo Langendorff

Reactivos y material

- ♣ Agua Milli-Q estéril
- ♣ Albúmina de suero bovino (BSA)
- ♣ Colagenasa tipo D
- ♣ Esparadrapo
- ♣ Etanol al 70 % (v/v)
- ♣ Material quirúrgico estéril (pinzas, tijeras, ...)
- ♣ Proteasa aislada de *Streptomyces griseus*
- ♣ Sistema de canulación (jeringuilla de 1 ml insertada en la pared lateral de una placa Petri)
- ♣ Solución de Heparina (5000 UI/ml)
- ♣ Sutura de seda 3-0 (*LorcaMarín SA.*)
- ♣ Tampón de perfusión compuesto por: NaCl 120,4 mM, KCl 14,7 mM, KH₂PO₄ 0,6 mM, Na₂HPO₄ 0,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 10 mM, NaHCO₃ 4 mM. Almacenar a 4 °C. Justo antes de iniciar el protocolo de aislamiento adicionar a este tampón: taurina 30 mM y glucosa 5,5 mM. Ajustar el pH a 7,4.

Procedimiento

1. Limpiar la zona de trabajo con etanol al 70 % (v/v).
2. Limpiar el sistema de perfusión, para ello dejaremos circular por el sistema primero etanol al 70 % (v/v) durante 5 min, luego agua Milli-Q estéril durante 8 min y por último tampón de perfusión durante unos segundos hasta que no observemos ninguna burbuja en el sistema. La velocidad de perfusión será modificada dependiendo del proceso.

3. Preparar una solución de BSA 6 mg/ml, pesando 300 mg de BSA en 50 ml de tampón de perfusión que contiene glucosa y taurina.
4. Preparar la dilución de enzimas. Para ello disolver 22 mg. de Colagenasa D en 15 ml de tampón de perfusión y 1,5 mg de Proteasa en otros 15 ml de tampón de perfusión.
5. Administrar heparina al animal (50 UI/g) vía intraperitoneal y esperar alrededor de 5 min.
6. Colocar el sistema de canulación acoplado a una aguja de canulación bajo el microscopio estereoscópico para la canulación aórtica. Rellenar con tampón de perfusión el sistema y colocar una hebra de seda alrededor de la cánula.
7. Anestesiarse al ratón con isoflurano (1 %), y comprobar que ha alcanzado una sedación profunda antes de comenzar con el procedimiento quirúrgico.
8. Preparar al ratón sobre la placa termostaticada a 37 °C. Inmovilizar cada uno de sus miembros con esparadrapo.
9. Rasurar y desinfectar con etanol al 70 % (v/v) la zona de la incisión. Levantar la piel con unas pinzas debajo del esternón y realizar una incisión con unas tijeras cortando la piel en forma de “V” ascendiendo hasta las axilas por ambos lados. Con unas pinzas hemostáticas retraer la piel hacia la cabeza, y mantener en esa posición.
10. Romper y retirar el pericarpio con unas pinzas finas.
11. Levantar el corazón con unas pinzas y cortar por la zona del arco aórtico. A continuación, colocar el corazón en una placa Petri con tampón de perfusión frío, y limpiar el exceso de tejido no cardíaco con ayuda de unas tijeras finas.

12. Colocar el corazón en el sistema de canulación e introducir la cánula por la aorta del corazón. Mantener precaución y no generar burbujas de aire en la jeringa antes de la canulación pues podrían producir embolia gaseosa. Para reducir este riesgo, el proceso de la canulación debe realizarse con el corazón sumergido lo máximo posible en tampón de perfusión.
13. Anudar dos veces con la hebra de seda que hay alrededor de la cánula para fijar el corazón a la cánula.
14. Realizar una comprobación para verificar el éxito del proceso de canulación. Para ello presionar la jeringa que contiene tampón de perfusión y deberíamos observar la salida de sangre por las venas y arterias cardíacas.
15. Separar la aguja de canulación con el corazón unido de la jeringa, y colocarlo en el sistema de perfusión.
16. Lavar el corazón durante 2-5 min con tampón de perfusión a 37 °C, antes de perfundir con tampón de digestión, que contiene la mezcla de las enzimas Colagenasa y Proteasa. Al comienzo de la perfusión por digestión enzimática observaremos un cambio de color en el corazón, que torna a un color marrón claro debido a la presencia de Colagenasa.
17. Perfundir el corazón aproximadamente 10-15 min con el tampón de digestión; iremos observando que el corazón se encorva debido a que el colágeno se degrada y pierde soporte mecánico.
18. Retirar el corazón de la cánula con ayuda de unas pinzas. Colocarlo sobre una placa de Petri que contiene 10 ml de medio formado por BSA en tampón de perfusión. Cerrar y seguir con el protocolo en una cabina de flujo laminar.

Separación y cultivo de células cardíacas adultas de ratón

El procedimiento experimental que se detalla a continuación trata de generar dos cultivos celulares separados, a partir de la suspensión anteriormente generada por el método de Langendorff: (1) cultivo primario de cardiomiocitos; y (2) cultivo primario de fibroblastos cardíacos. El número máximo de pases es de 7 para evitar que las células sufran alteraciones fenotípicas no deseadas. Las células aisladas se mantienen a 37 °C en fase de crecimiento exponencial utilizando un incubador de CO₂ que se ajusta al 5 % y con una humedad relativa que proporciona el baño de agua a ≥ 95 %. Todas las manipulaciones de cambios de medios, subcultivos y demás, se realizan en una cabina de flujo laminar con caudal de filtración de 1000 m³.

Equipamiento

- ♣ Baño termostatzado a 37°C
- ♣ Cabina de flujo laminar vertical mod. AV100 (*Telstar*[®], *Tarrasa*., *España*)
- ♣ Centrífuga refrigerada mod. Universal 320 R Hettich Lab Technology TM
- ♣ Incubador de CO₂
- ♣ Microscopio invertido AE 20/21 (*Motic*[®])

Reactivos y material

- ♣ Filtros de 100 μ m (*Corning*)
- ♣ Material estéril necesario: puntas, frascos de cultivo, pipetas serológicas
- ♣ Medio de cultivo completo compuesto por MEM suplementado con suero fetal bovino al 5 % (v/v), 2, 3-butanodiona-monoxima 10 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1 % (v/v)
- ♣ Solución de L-glutamina
- ♣ Solución de penicilina/estreptomicina

- ♣ Suero fetal bovino
- ♣ Tampón de perfusión (véase composición descrita en el apartado de *aislamiento de células adultas primarias de ratón*)

Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos primarios

Procedimiento

1. Abrir la placa que contiene el corazón en la cabina de flujo y mediante el uso de unas pinzas finas romperlo en fragmentos cada vez más pequeños.
2. Tamizar el tejido disgregado —que corresponde a un solo corazón adulto de ratón—, obtenido del punto 18 del apartado anterior, a través de un filtro de 100 μm sobre un tubo estéril de 50 ml.
3. Mantener durante 10 min en baño termostatzado a 37 °C, para permitir la sedimentación de los cardiomiocitos. Centrifugar a 800 $\times g$ durante 1 min a 21 °C.
4. Recoger el sobrenadante con pipeta Pasteur y marcar como fracción de fibroblastos. Mantener a temperatura ambiente.
5. Resuspender el precipitado en 20 ml de tampón de perfusión, 1 ml de suero fetal bovino y 5 μl de CaCl_2 1 M; la concentración de Ca^{2+} en la suspensión celular es 240 μM . Mantener a 37 °C en incubador de CO_2 .
6. Adicionar volúmenes crecientes de CaCl_2 1M a la suspensión celular para incrementar de forma gradual la concentración de Ca^{2+} a: 500, 750, 1000 y 1200 μM . Realizar las adiciones de CaCl_2 cada 20 min.
7. Sembrar en placas de cultivo la suspensión de cardiomiocitos en medio de cultivo completo y mantener a 37 °C en un incubador de CO_2 .

8. Evaluar la pureza del cultivo celular por PCR cuantitativa en el pase 1 y 5 del cultivo; usar c-TnT, β -MHC y α -actinina, como marcadores específicos de cardiomiocitos.
9. Realizar subcultivos, hasta un máximo de 7, siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente (véase *Subcultivo de la línea celular H9c2*).

Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos primarios

El procedimiento experimental comienza con el uso del sobrenadante obtenido en el punto 4 del apartado anterior.

Procedimiento

1. Centrifugar a 1200 \times g durante 5 min a 21 °C. Desechar el sobrenadante obtenido.
2. Resuspender el precipitado en medio de cultivo MEM suplementado con suero fetal bovino al 5 % (v/v), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1 % (v/v). Los fibroblastos aislados se mantienen a 37 °C en un incubador de CO₂.
3. Evaluar la pureza de la fracción celular obtenida por PCR cuantitativa en el pase 1 y 5 del cultivo; usar vimentina, FSP-1 y DDR2, como marcadores específicos de fibroblastos.
4. Realizar subcultivos, hasta un máximo de 7, siguiendo el procedimiento experimental descrito anteriormente (véase *Subcultivo de la línea celular H9c2*).

Modelos de deformación celular

Deformación celular biomecánica y procesamiento del medio condicionado

La inducción de la deformación biomecánica se realizó siguiendo el protocolo experimental descrito por Banerjee y cols¹⁰¹. El procedimiento experimental descrito a continuación se basa en la inducción de un daño por deformación celular sobre un cultivo primario de cardiomiocitos o fibroblastos cardíacos, usando MEM como medio experimental.

Equipamiento

- ♣ Cabina de flujo laminar AV100 (*Telstar*)
- ♣ Centrífuga refrigerada 5415 R Eppendorf[®]: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Incubador de CO₂
- ♣ Sistema *Flexcell[®] FX-5000TM*

Material y medios

- ♣ Material estéril necesario: puntas, frascos de cultivo, pipetas serológicas
- ♣ MEM atemperado a 37 °C
- ♣ Placas de 6 pocillos *Flex I (BF-3001C; Flexcell International, USA)*
- ♣ Solución de DPBS a 37 °C

Procedimiento

En general, el sistema *Flexcell[®] FX-5000TM* consiste en un soporte de placa de cultivo, conectado a un equipo informático y un sistema de vacío. Las células son cultivadas en placas específicas con fondo flexible de silicona de 6 pocillos. Se siembran $\sim 4 \times 10^5$ células/pocillo en 2 ml de medio de cultivo completo y se mantienen durante 2 días en incubador de CO₂ antes de iniciar el protocolo

experimental de deformación celular. En la figura 2.2 se muestra una representación esquemática que ilustra cómo se aplica este estímulo a las células.

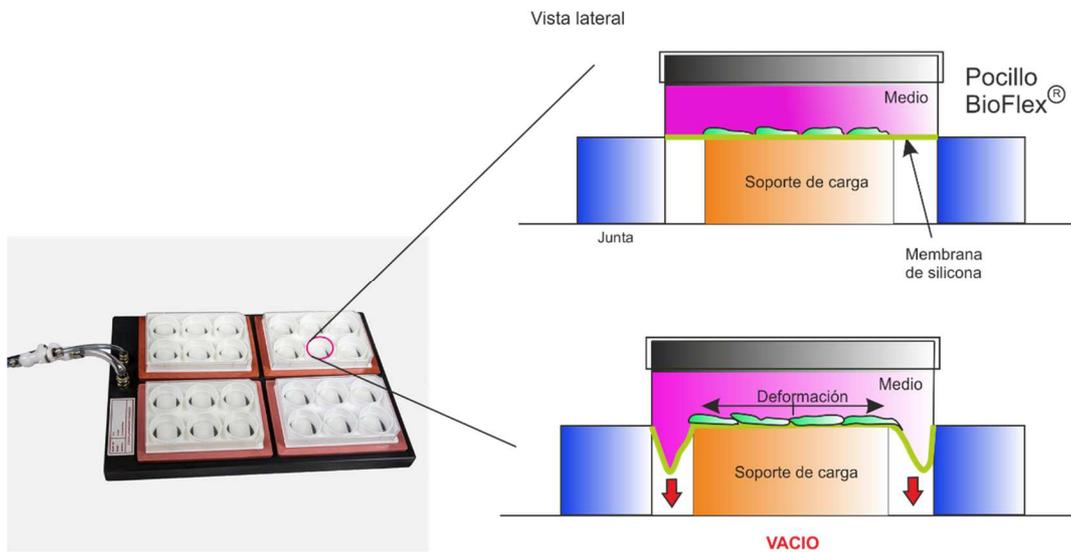


Figura 2.2. Estiramiento celular mediante el sistema Flexcell® FX-5000™. Las Células fueron cultivadas en placas cuya base está formada por una membrana de silicona. A través de un sistema de vacío fue posible controlar la intensidad y frecuencia, para inducir la deformación celular.

1. Retirar el medio de cultivo completo y lavar tres veces con DPBS ($0,3 \text{ ml/cm}^3$) antes de adicionar 2 ml de medio MEM a 37°C .
2. Iniciar la deformación biomecánica celular sometiendo a las células a un protocolo preestablecido de vacío que permite el alargamiento de la superficie de silicona de la placa un 16 %, a una frecuencia de 60 ciclos/min (1 Hz).
3. Mantener las células en las condiciones estándares de cultivo durante 15 h en incubador de CO_2 .
4. Recoger el medio MEM y centrifugar a $480 \times g$ durante 10 min a 4°C .
5. Desechar el precipitado y marcar el sobrenadante obtenido como medio condicionado (véase *Capítulo 3*).

Deformación celular química

Este procedimiento experimental descrito por otros autores¹⁰²⁻¹⁰⁶, permite la inducción simulada de un estado de hipertrofia celular mantenida en el tiempo. El procedimiento experimental se realiza sobre cardiomiocitos H9c2 sembrados en placas de 6 pocillos y usando DMEM como medio experimental.

Equipamiento

- ♣ Cabina de flujo laminar AV100 (*Telstar*)
- ♣ Centrífuga refrigerada 5415 R Eppendorf[®]: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Incubador de CO₂

Reactivos y medios

- ♣ Material estéril necesario: puntas, frascos de cultivo, pipetas serológicas
- ♣ PMA 1 mM en Me₂SO
- ♣ DMEM atemperado a 37 °C
- ♣ Solución de DPBS a 37 °C
- ♣ A23187 0,2 mM en Me₂SO

Procedimiento

1. Aspirar el medio de cultivo completo y lavar tres veces con DPBS atemperado a 37 °C.
2. Añadir medio DMEM atemperado a 37 °C sobre el cultivo celular y adicionar directamente sobre el cultivo PMA 0,2 μM y a continuación A23187 0,4 μM.
3. Agitar suavemente por balanceo la placa de cultivo y retornar al incubador de CO₂.

4. Mantener en incubador a 37 °C durante 6 h y recoger el medio DMEM para centrifugar a 480 ×g durante 10 min a 4 °C. Guardar medio a – 80 °C.
5. Recoger las células para su análisis.

GENERACIÓN DE UN MODELO KNOCKDOWN *IN VITRO*

Equipamiento

- ♣ Agitador orbital
- ♣ Baño termostatzado
- ♣ Cabina de flujo laminar AV100 (*Telstar*)
- ♣ Centrífuga refrigerada 5415 R Eppendorf®: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Incubador de CO₂

Reactivos y material

- ♣ Lipofectamina 2000 (*Thermo Fisher Scientific*)
- ♣ Medio de cultivo
- ♣ Medio OptiMEM
- ♣ Secuencias comerciales de siRNAs

Procedimiento

El procedimiento experimental se inicia sembrando $\sim 2 \times 10^5$ células en placas de cultivo de 6 pocillos usando medio de cultivo completo en ausencia de antibiótico. En estas condiciones las células en monocapa se mantienen durante dos días en las condiciones óptimas de cultivo, antes de iniciar la transfección — el protocolo de transfección se inicia sobre un cultivo celular en monocapa con ~ 40 - 50 % de confluencia—.

1. Preparar el medio de transfección siguiendo el procedimiento descrito para el uso de Lipofectamina 2000 usando 20 nM de siRNA. Incubar a temperatura ambiente 30 min en agitación orbital.

2. Aspirar el medio de cultivo completo y lavar tres veces con DPBS a 37 °C.
3. Adicionar el medio de transfección y mantener en incubador de CO₂ a 37 °C durante 8 h.
4. Añadir medio de cultivo suplementado con L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino 20 % (v/v).
5. Mantener en incubador de CO₂ a 37 °C durante 48 h.
6. Aspirar medio y lavar tres veces con DPBS a 37 °C.

MICROSCOPIA CONFOCAL DE BARRIDO

Esta técnica permite visualizar la fluorescencia de moléculas presentes en un único plano de foco. Se basa en la capacidad de los fluorocromos de emitir fluorescencia cuando son excitados por luz a una determinada longitud de onda.

Localización del factor de transcripción Yin yang 1

El procedimiento experimental requiere la fijación y la permeabilización de las células antes de adicionar el intensificador de señal *Image-iTTM FX* (*Molecular Probes*). Por último, se realiza la incubación con anticuerpos. Primero con anti-Yy1 en combinación con anti-tubulina y después con anti-IgG conjugado a Alexa Fluor[®] 488 y anti-IgG conjugado a Alexa Fluor[®] 594.

Equipamiento

- ♣ Baño de agua a 37 °C
- ♣ Microscopio confocal de barrido (*Leica*)
- ♣ Incubador de CO₂

Reactivos y material

- ♣ Alexa Fluor[®] 488 anti-ratón SFX (*Thermo Fisher Scientific*) compuesto por: intensificador de señal *Image-iTTM FX* y anticuerpo secundario anti-

IgG de ratón (molécula completa) conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor®488

- ♣ Alexa Fluor® 594 anti-conejo SFX (*Thermo Fisher Scientific*) compuesto por: intensificador de señal *Image-iT™ FX* y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (molécula completa) conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor®594
- ♣ Anticuerpos primarios anti-Yy1 y anti- γ -tubulina
- ♣ Cultivo en monocapa de H9c2
- ♣ Material estéril necesario: puntas, frascos de cultivo, pipetas serológicas
- ♣ Me₂SO anhidro
- ♣ Medio de permeabilización formado por: TX-100 0,1 % (v/v) en DPBS. Filtrar y guardar a 4 °C
- ♣ Medio DMEM a 37 °C
- ♣ Placa de cultivo de 150 mm de \emptyset
- ♣ Placas de cultivo de vidrio de 35 mm de \emptyset
- ♣ Solución de DAPI 14,3 mM: Preparar una solución stock de DAPI disolviendo el contenido del vial (D1306; *Thermo Fisher Scientific*) en 2 ml de agua Milli-Q. Guardar a – 20 °C y en oscuridad.
- ♣ Solución formaldehído 4 % (p/v)

El experimento comienza con la siembra de una placa de 35 mm de \emptyset con 4×10^5 células en presencia de 2 ml de medio de cultivo completo. Las células se mantienen en el incubador de CO₂ durante 2 días antes de comenzar el experimento. Antes de iniciar el procedimiento las células se lavan tres veces con DPBS a 37 °C.

Fijación y permeabilización de células

Procedimiento

1. Fijar las células añadiendo lentamente sobre la pared de la placa de cultivo 2 ml de formaldehído al 4 % (v/v) temperatura ambiente. Mantener durante 15 min.
2. Retirar el medio de fijación y lavar la placa tres veces —un min cada vez— con 2 ml de DPBS.
3. Permeabilizar las células añadiendo 0,5 ml de solución de permeabilización y mantener 15 min a temperatura ambiente.
4. Lavar la placa tres veces —un min cada vez— con 2 ml de DPBS a temperatura ambiente.

Intensificación de señal e incubación con anticuerpos

Procedimiento

1. Añadir 0,3 ml del intensificador de señal *Image-iTTM FX* sobre la monocapa de células.
2. Incubar 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz y en un ambiente húmedo —introducir las células en el interior de una placa de 150 mm de Ø que contiene algodones humedecidos con agua Milli-Q— para evitar la evaporación del intensificador.
3. Lavar tres veces —un min cada vez— con 2 ml de DPBS a temperatura ambiente.
4. Diluir los anticuerpos primarios a 1:100 en DPBS con BSA al 1 % (p/v). Incubar las células con 0,3 ml de este medio durante toda la noche a 4 °C y manteniendo ambiente de humedad (como se ha descrito en el punto 2).

5. Lavar tres veces —cinco min cada vez— con 2 ml de DPBS a temperatura ambiente.
6. Diluir en DPBS con BSA al 1 % (p/v) el anticuerpo secundario a 1:200 a temperatura ambiente. Incubar las células con 0,3 ml de esta disolución durante 1 h a temperatura ambiente.
7. Lavar tres veces —cinco min cada vez— con 2 ml de DPBS a temperatura ambiente.

Carga de las células con DAPI

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es una sonda fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. Es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia. La longitud de onda de excitación es 358 nm y la de emisión es 461 nm.

Procedimiento

1. Preparar una dilución de DAPI 300µM, añadiendo 2,1 µl de DAPI 14,3 mM a 100 µl de DPBS.
2. Generar una solución de DAPI 300 nM diluyendo DAPI 300 µM 1:1000 en DPBS.
3. Añadir suficiente volumen de DAPI 300 nM sobre las células previamente fijadas, permeabilizadas y lavadas con DPBS.
4. Incubar 5 min a temperatura ambiente y proteger de la luz.
5. Lavar tres veces —1 min cada vez— con DPBS antes de observar en el microscopio confocal.

EXTRACCIÓN DE PROTEINAS

Fracción proteica total

El procedimiento experimental se realiza en cámara frigorífica a 4 °C y se inicia lavando las muestras tres veces con DPBS a 4 °C.

Aislamiento de proteínas totales a partir de tejido

Equipamiento

- ♣ Cámara frigorífica a 4 °C
- ♣ Centrífuga refrigerada 5415 R Eppendorf®: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Homogeneizador *Omni-THq 2054 (Taper)*
- ♣ Homogeneizador ultrasónico, serie 4710 (*Cole-Parmer*)
- ♣ Ultracongelador de -80°C

Reactivos y material

- ♣ Material manejo de muestras biológicas: bisturí, puntas, pipetas serológicas y placas de Petri
- ♣ Medio de extracción de proteínas totales (véase apartado de disoluciones de tipo general y medios tamponados en *Capítulo 2*)
- ♣ Muestras biológicas de miocardio, almacenadas a – 80 °C
- ♣ Solución de DPBS a 4 °C
- ♣ Tubos de 50 ml fondo cónico sin faldón
- ♣ Tubos de polipropileno de 5 ml estériles

Procedimiento

1. Descongelar y pesar ~30 mg de miocardio sobre una placa de Petri que se mantiene sobre un baño de hielo.
2. Lavar tres veces con DPBS a 4 °C y cortar con ayuda de un bisturí en pequeños fragmentos.

3. Recoger los fragmentos de tejido y colocarlos en un tubo de polipropileno. Adicionar 0,5 ml de medio de extracción de proteínas totales.
4. Disgregar la muestra 5 veces durante 10 s —haciendo pausas de 30 s— en el homogeneizador *Omni-THq*.
5. Repetir el paso 4 tratando la suspensión en el homogeneizador ultrasónico en baño de hielo.
6. Centrifugar a 20.000 ×g durante 20 min a 4 °C.
7. Recoger el sobrenadante y guardarlo en alícuotas de 20 µl a -80 °C. Desechar la fase sólida y calcular la concentración de proteína.

Aislamiento de proteínas totales a partir de cultivo celular en monocapa

Equipamiento

- ♣ Cabina de flujo laminar AV 100 (*Telstar*)
- ♣ Cámara frigorífica a 4 °C
- ♣ Centrífuga refrigerada 5415 R Eppendorf[®]: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Homogeneizador ultrasónico, serie 4710 (*Cole-Parmer*)
- ♣ Ultracongelador de -80°C

Reactivos y material

- ♣ Cultivo celular en monocapa
- ♣ Material manejo de muestras biológicas: Raspador celular estéril, puntas, y pipetas serológicas
- ♣ Medio de extracción de proteínas totales (véase apartado de disoluciones de tipo general y medios tamponados en *Capítulo 2*)
- ♣ Tubos de 50 ml fondo cónico sin faldón

Procedimiento

1. Lavar el cultivo de células en monocapa tres veces con DPBS a 4 °C.
2. Adicionar medio de extracción de proteínas totales en una proporción de 0,01 ml/cm².
3. Raspar la monocapa de células y recoger en un tubo Eppendorf que se mantiene frío en baño de hielo.
4. Tratar la muestra 5 veces durante 10 s —haciendo pausas de 30 s— en el homogeneizador ultrasónico; manteniendo la muestra en baño de hielo.
5. Centrifugar a 20.000 ×g durante 20 min a 4 °C.
6. Recoger el sobrenadante y guardarlo en alícuotas de 20 µl a -80 °C. Desechar la fase sólida y calcular la concentración de proteína.

Aislamiento de proteínas desde compartimentos subcelulares*Equipamiento*

- ♣ Centrifuga refrigerada 5415 R Eppendorf[®]: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Homogeneizador mod. *Potter S.* de Sartorius (*Sartorius Stedium, Goettingen, Alemania*)
- ♣ Homogeneizador ultrasónico, serie 4710 (*Cole-Parmer*)

Material y medios

- ♣ Solución de DPBS a 4 °C
- ♣ Medio de extracción STM a 4 °C; (véase composición en *disoluciones de tipo general y medios tamponados*)
- ♣ Medio NET a 4 °C; (véase composición en *disoluciones de tipo general y medios tamponados*)
- ♣ Medio SOL a 4 °C (véase composición en *disoluciones de tipo general y medios tamponados*)

Procedimiento

El procedimiento experimental, que es común para el aislamiento de las proteínas subcelulares desde tejido o cultivo celular en monocapa, requiere el lavado inicial de cada una de las muestras en estudio tres veces con DPBS a 4 °C en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas/fosfatasa diluido 1/100. Para ello, las células son sedimentadas por centrifugación a 480 ×g durante 10 min a 4 °C, y los tejidos cortados en pequeños fragmentos sobre una placa de Petri en baño de hielo. A continuación, el medio DPBS se retira y las muestras se resuspenden en 500 µl de medio STM a 4 °C.

1. Homogeneizar las muestras en el homogeneizador *Potter S.* durante 1 min a 800 r.p.m., en baño de hielo.
2. Agitar el homogeneizado obtenido en vórtex durante 4 periodos de 10 s cada uno —haciendo pausas de 5 min— y manteniendo siempre la muestra en baño de hielo.
3. Centrifugar a 800 ×g durante 15 min a 4 °C. Marcar el sedimento como P0 y mantener en baño de hielo. Etiquetar el sobrenadante como S0 para el aislamiento de las fracciones mitocondrial y citosólica (Fig. 2.3).
4. Resuspender el sedimento P0 (que contiene núcleos y desechos) en 500 µl de medio STM, y agitar en vórtex a máxima velocidad durante 15 s antes de centrifugar a 500 ×g durante 15 min a 4 °C. Siguiendo el paso anterior, marcar el sedimento nuclear como P1 y mantener en baño de hielo, y desechar el sobrenadante S1 (restos celulares). Con el objetivo de aumentar la pureza de la fracción P1, lavar con 400 µl de medio STM, agitar en vórtex a máxima velocidad durante 15 s y luego centrifugar a 1.000 ×g durante 15 min a 4 °C.

5. Marcar el sedimento lavado como P2 (se descartó S2) y resuspender — mediante el uso de una micropipeta hasta homogeneizar— en 100 μ l de medio NET.
6. Agitar el homogeneizado obtenido en vórtex durante 4 periodos de 10 s cada uno —haciendo pausas de 5 min— manteniendo siempre la muestra en baño de hielo.
7. Tratar en un homogeneizador ultrasónico durante 4 períodos de 5 s cada uno —haciendo pausas de 30 s— manteniendo siempre la muestra en baño de hielo y centrifugar a 9.000 \times g durante 30 min a 4 °C. Marcar el sobrenadante como fracción S3 —que corresponde a la fracción nuclear— y guardar a -80 °C.
8. Centrifugar, la fracción S0 a 1.000 \times g durante 5 min a 4 °C. Marcar el sobrenadante obtenido como S4 y descartar el precipitado.
9. Centrifugar la fracción S4 a 10.000 \times g durante 15 min a 4 °C y marcar el sobrenadante como S5 (contiene la fracción citosólica y mitocondrial).
10. Proceder a precipitar las proteínas de la fracción S5 en presencia de acetona al 100 % en frío a -20 °C durante 1 h. Centrifugar a 12.000 \times g durante 5 min a 4 °C. Marcar el precipitado como fracción P6 antes de resuspenderlo en 250 μ l de medio STM “fracción citosólica” y congelarla a - 80 °C.
11. Resuspender la fracción P5 en 200 μ l de medio STM y se centrifugar a 11.000 \times g durante 10 min. Resuspender el precipitado (P7) que contiene la “fracción mitocondrial” en 100 μ l de medio SOL.
12. Tratar en un homogeneizador ultrasónico durante 4 períodos de 5 s cada uno —haciendo pausas de 30 s— manteniendo siempre la muestra en baño de hielo y marcar como "fracción mitocondrial" antes de almacenar a - 80 °C.

reactivo y el cromóforo, proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos¹⁰⁷.

Equipamiento

- ♣ Baño termostatzado a 37 °C
- ♣ Fotocolorímetro Eppendorf[®] mod. 6131: *Hamburg-Alemania*

Reactivos y material

- ♣ Agua Milli-Q
- ♣ BSA 20 mg/ml
- ♣ Proteínas en solución a -80 °C
- ♣ Reactivo A: *Pierce*[™] *BCA Protein Assay*
- ♣ Reactivo B, compuesto por: 0,4 g de CuSO₄ en 10 ml de agua Milli-Q

Procedimiento

Preparar la mezcla de reacción, atendiendo al volumen total necesario; por ejemplo, para un volumen total de 10 ml mezclar 1,96 ml de reactivo A, 40 µl de reactivo B y 8 ml de agua Milli-Q.

1. Diluir la disolución de BSA a 1 mg/ml en agua Milli-Q.
2. Tomar 0, 10, 30, 50, 75 y 100 µl de la disolución de BSA 1 mg/ml, equivalente a 0-100 µg de proteína y añadirlos a diferentes tubos de ensayo (Tabla 2.1).
3. Diluir veinte veces la muestra problema en agua Milli-Q.
4. Completar el volumen de cada tubo a 100 µl añadiendo agua Milli-Q.
5. Añadir 0,9 ml de mezcla de reacción a cada tubo y agitar en el vórtex.
6. Incubar durante 30 min en baño termostatzado a 37 °C.

7. Enfriar los tubos hasta temperatura ambiente y medir la absorbancia a 562 nm de los tubos con BSA en el fotolorímetro; automáticamente el aparato genera una curva patrón y calcula la pendiente correspondiente.
8. Registrar las absorbancias de las muestras problema; el fotolorímetro calcula la concentración de cada una de las muestras en base a la recta patrón anteriormente generada.

Tabla 2.1. Composición de la mezcla de reacción para el cálculo de la concentración de proteína.

<i>Tubo</i>	<i>Proteína Problema (μl)</i>	<i>BSA 1 mg/ml (μl)</i>	<i>Agua Milli-Q (μl)</i>	<i>Reactivo de Trabajo (μl)</i>
1	-----	0	100	900
2	-----	10	90	900
3	-----	30	70	900
4	-----	50	50	900
5	-----	75	25	900
6	-----	100	0	900
7	5	-----	95	900

Tabla 2.1. *Detalle de la composición del medio de reacción para el cálculo de la concentración de proteína de una muestra problema por el método del ácido bicinónico.*

INMUNOBLOT

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas, de la mezcla obtenida a partir de los procedimientos descritos anteriormente, se pueden separar mediante el uso de una técnica electroforética disociante siguiendo el protocolo descrito por Laemmli en 1970¹⁰⁸.

Equipamiento

- ♣ Baño termostatzado a 100 °C
- ♣ Fuente de alimentación PowerPac 300 (*Bio Rad*)
- ♣ Sistema Mini-PROTEAN® 3 (*Bio Rad*)

Reactivos y material

- ♣ Agua Milli-Q
- ♣ Medio de desnaturalización (2×) (véase composición en *disoluciones de tipo general y medios tamponados*)
- ♣ Medio de electroforesis Bio Rad (10×): Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS al 0,1 % (p/v) a pH 8,3. Diluir a (1×) en el momento de usar mezclando 50 ml de tampón de electroforesis (10×) con 450 ml de agua Milli-Q.
- ♣ Solución al 30 % de Acril:Bis (*Merck*)
- ♣ Solución de DPBS a temperatura ambiente
- ♣ Solución de PSA al 1 % (p/v). En el momento de usar, disolver 0,01 g de PSA en 1 ml de agua Milli-Q.
- ♣ Solución de SDS al 1 % (p/v) en agua Milli-Q
- ♣ TEMED (*BioRad*)
- ♣ Tris-HCl 0,5 M ajustado a pH 6,8 con HCl
- ♣ Tris-HCl 1,5 M ajustado a pH 8,8 con HCl

Procedimiento

1. Limpiar los cristales primero con Etanol absoluto y después con agua Milli-Q. Secar.
2. Preparar un gel separador en base a la composición que se describe en la tabla 2.2.
3. Verter la mezcla sobre el sistema de placas, previamente montado, muy lentamente para evitar la formación de burbujas. Finalmente, añadir agua

Milli-Q para generar una superficie de polimerización homogénea. Dejar polimerizar 30 min a temperatura ambiente.

Tabla 2.2. Composición de geles separadores en gradiente continuo.

<i>Componentes</i>	<i>AA</i>	<i>AA</i>	<i>AA</i>
	<i>6 % (ml)</i>	<i>8 % (ml)</i>	<i>10 % (ml)</i>
Agua Milli-Q	2,68	2,35	2,01
Acril:Bis	1	1,33	1,67
Tris 1,5 M, pH8,8	1,25	1,25	1,25
SDS al 10 % (v/v)	0,05	0,05	0,05
PSA al 1 % (p/v)	0,02	0,02	0,02
TEMED	0,002	0,002	0,002
Volumen final	5	5	5

Tabla 2.2. Descripción de la composición de geles de AA en gradiente continuo de AA al 6, 8 y 10 %. AA: acrilamida; PSA: persulfato amónico; SDS: dodecilsulfato sódico.

4. Retirar el agua y secar con ayuda de un papel absorbente.
5. Preparar el gel hacinador según se describe en la tabla 2.3.
6. Verter esta mezcla sobre el gel separador y colocar el peine para permitir que se formen las calles donde se adicionarán las muestras en estudio. Dejar polimerizar 30 min a temperatura ambiente.

Tabla 2.3. Detalle composición gel hacinador.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (ml)</i>
Agua Milli-Q	1,26
Tris 0.5M pH 6.8	0,5
SDS al 10 % (v/v)	0,02
Acril:Bis	0,2
PSA al 1 % (p/v)	0,02
TEMED	0,002
Volumen final	2

Tabla 2.3. Descripción de la composición del gel hacinador.

7. Retirar el peine y limpiar las calles con medio de electroforesis (1×) antes de montar el sistema de electroforesis vertical. Añadir medio de electroforesis (1×).
8. Preparar las muestras que van a ser utilizadas en la electroforesis en medio de desnaturalización. Incubar a 100 °C durante 7 min.
9. Cargar las calles con cada una de las muestras preparadas, con un volumen máximo de 50 µl.
10. Cerrar la cubeta de electroforesis, y realizar la electroforesis a 100 V. El tiempo total de electroforesis dependerá del peso molecular de la proteína de interés. La electroforesis se realiza en cámara fría a 4 °C.
11. Finalizar la electroforesis, una vez haya transcurrido el tiempo fijado, desmontar los cristales, separar el gel hacinador del gel separador, seleccionando el gel separador.

Electrotransferencia de proteínas

Esta técnica es necesaria para que las proteínas, separadas por electroforesis, sean accesibles a la detección por anticuerpos. Para ello se las transfiere desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF por acción de un campo eléctrico. Las proteínas del gel se desplazan hacia el polo positivo quedando atrapadas en la membrana de PVDF, según el procedimiento experimental descrito por Kyhse-Andersen¹⁰⁹.

Equipamiento

- ♣ Agitador magnético
- ♣ Cámara fría a 4°C
- ♣ Equipo de transferencia húmeda (*BioRad*)
- ♣ Fuente de alimentación *PowerPac 300* (*Bio Rad*)

Reactivos y materiales

- ♣ Cubeta de incubación de 9'5×6'5×1'5 cm
- ♣ Filtros de papel *BioRad Mini Trans-Blot* (7,5 x 10 cm)
- ♣ Medio de transferencia (10×) de *BioRad*: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8,3. El día antes de su uso preparar el medio de transferencia (1X): 100 ml de medio (10×), 1 ml SDS 10 % (v/v), 150 ml metanol y completar con agua Milli-Q hasta 1000 ml. Guardar a 4 °C.
- ♣ Membrana de PVDF de *BioRad Immun-Blot PVDF*, (26 cm x 3,3 m) de 0,2 μm.
- ♣ Metanol

Procedimiento

1. Mantener el gel en el medio de transferencia (1×) para favorecer la eliminación de sales y detergentes procedentes del medio de electroforesis. Mantener 15 min en cámara fría a 4 °C.
2. Cortar una membrana de PVDF con las mismas dimensiones del gel y sumergirla durante 1 min en metanol. Lavar 5 min en agua Milli-Q antes de incubarla otros 15 min en medio de transferencia (1×) en agitación a 4 °C.
3. Sumergir 2 piezas de filtro en medio de transferencia y mantener a 4 °C durante 15 min.
4. Montar la unidad de electrotransferencia húmeda y conectar a la fuente de alimentación. Rellenar la cubeta con medio de electrotransferencia (1x).
5. Transferir a 100 V durante 60 min en cámara fría.
6. Desconectar la fuente de alimentación y abrir el sistema de transferencia. Sacar con cuidado los distintos componentes apilados.
7. Colocar la membrana de PVDF, orientando la cara de la membrana con las proteínas fijadas hacia arriba, en una cubeta de incubación para iniciar el protocolo de inmunodetección.

Inmunodetección con anticuerpos específicos

Equipamiento

- ♣ Agitador de balanceo Ovan
- ♣ Agitador Mini Rocker
- ♣ Membrana de PVDF con las proteínas fijadas en cubeta de incubación

Muestra y medios

- ♣ Agua Milli-Q
- ♣ Anticuerpos primario y secundario

- ♣ Medio de bloqueo: BSA al 5 % (p/v) en TBST
- ♣ TBST (véase composición en *disoluciones de tipo general y medios tamponados*)

Procedimiento

1. Lavar la membrana de PVDF una vez con TBST durante 5 min.
2. Añadir medio de bloqueo e incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
3. Lavar la membrana una vez con TBST durante 5 min.
4. Añadir medio de unión formado por medio de bloqueo al que se le adiciona el anticuerpo primario (Tabla 2.4). Incubar durante toda la noche a 4°C en agitación orbital y en cámara fría.
5. Lavar cuatro veces la membrana con TBST durante 5 min cada vez.
6. Añadir medio de unión y adicionar el anticuerpo secundario (Tabla 2.5). Mantener en agitación orbital durante 1 h a temperatura ambiente.
7. Repetir el paso 5 antes de iniciar el procedimiento de revelado.

Tabla 2.4. Detalle de los anticuerpos usados en el estudio.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Código</i>	<i>Dilución</i>
Anti-AMPK	Conejo	Cell signaling Tech	2532	1:1000
Anti-COX IV	Conejo	Abcam	ab16056	1:2000
Anti-Fosfo-AMPK	Conejo	Cell signaling Tech	2535	1:1000
Anti-Fosfo-HDAC4	Conejo	Abcam	ab39408	1:2000
Anti-Fosfo-I κ B α	Ratón	Cell signaling Tech.	9246	1:1000
Anti-Fosfo-mTORC1	Conejo	Merck KGaA	09-213	1:2000
Anti-Fosfo-p70S6K	Conejo	Cell signaling Tech.	9205S	1:1000
Anti-Fosfo-PKC α	Conejo	My BioSource	MBS004503	1:1000
Anti-Fosfo-Tuberina	Conejo	Cell signaling Tech.	5584S	1:1000
Anti-Gal-3	Ratón	Thermo Fisher Scientific	MA1-940	1:2000
Anti-GAPDH	Ratón	Sigma-Aldrich	G8795	1:5000
Anti-HDAC4	Ratón	Cell signaling Tech.	5392	1:1000
Anti-IL-33	Ratón	Abcam	ab54385	1:500
Anti-I κ B α	Conejo	Cell signaling Tech.	4812	1:2000
Anti-mitoNox	Conejo	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-30141	1:500
Anti-mTORC1	Conejo	Merck KGaA	04-385	1:2000
Anti-NF- κ B	Conejo	Cell signaling Tech.	8242	1:1000
Anti-p70S6K	Conejo	Cell signaling Tech.	9202S	1:1000
Anti-PKC α	Conejo	My BioSource	MBS9382673	1:1000
Anti-ST2	Conejo	Proteintech [®]	11920-1-AP	1:1000
Anti-TBP	Conejo	Cell signaling Tech.	8515	1:5000
Anti- γ -Tuberina	Conejo	Cell signaling Tech.	3612S	1:1000
Anti-Yy1	Ratón	Santa Cruz Biotech.	sc7341	1:500

Tabla 2.4. *Listado de los anticuerpos primarios usados para western blot donde se detalla la especie que reconoce, proveedor, código, así como la dilución usada.*

Tabla 2.5. Lista de anticuerpos secundarios usados para western blot.

Anticuerpo	Proveedor	Código	Isotipo	Dilución
Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa	Promega	W402B	IgG de Cabra	1:5000
Anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa	Promega	W401B	IgG de Cabra	1:10.000

Tabla 2.5. Descripción de los anticuerpos secundarios usados donde se detalla el proveedor, el código y la dilución usada.

Revelado de la membrana

Equipamiento y reactivos

- ♣ Reactivo de quimioluminiscencia *ECL Prime Western Blotting* (GE Healthcare; Life Sciences)
- ♣ Sistema de revelado de BioRad *Chemidoc XRS+*

Procedimiento

1. Preparar el reactivo de quimioluminiscencia mezclando los reactivos suministrados (1:1) y mantener a temperatura ambiente.
2. Adicionar sobre la membrana el reactivo de quimioluminiscencia y mantener 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
3. Revelar la membrana en el equipo citado.

Stripping de la membrana

La membrana puede ser analizada de forma secuencial con diferentes anticuerpos siempre que se realice un protocolo de *stripping*. Este proceso nos permite eliminar los anticuerpos que quedan retenidos en la membrana mediante el uso combinado de detergentes y calor.

Equipamiento

- ♣ Agitador balanceo
- ♣ Estufa de incubación *Nahita*[®] a 50 °C

Reactivos y material

- ♣ Tampón para *Stripping* que contiene: (100 ml de volumen total) 6,25 ml de Tris-HCl 1M pH 6,8, 10 ml de SDS 20 % (p/v) y 700 µl de β-mercaptoetanol.
- ♣ TBST

Procedimiento

1. Después de revelar la membrana, lavarla cuatro veces con TBST 5 min cada vez.
2. Incubar la membrana 30 min a 50 °C en la estufa y en agitación vigorosa, con el tampón de *stripping*.
3. Lavar seis veces la membrana con TBST, 5 min cada vez.
4. Bloquear la membrana y repetir el procedimiento experimental descrito en el apartado de *Inmunodetección con anticuerpos específicos*.

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

La determinación de la viabilidad celular mediante el uso del ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), es un método de tipo colorimétrico sensible y cuantitativo. Esta técnica se basa en el poder reductor de las células vivas; las deshidrogenasas mitocondriales son capaces de reducir un sustrato soluble como es el MTT, en un producto insoluble de color azul oscuro, el formazano. El formazano forma cristales insolubles en agua que permanecen en el interior de las células y que pueden ser solubilizados con un medio orgánico antes de realizar la medida colorimétrica.

Equipamiento

- ♣ Baño termostatzado a 37°C
- ♣ Cabina de flujo laminar
- ♣ Incubador a 37°C
- ♣ Lector de placas Infinite[®] M200Pro (*Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza*)

Reactivos y material

- ♣ Me₂SO
- ♣ Solución de DPBS a 37 °C
- ♣ Reactivo MTT. Este reactivo se prepara a una concentración de 1 mg/ml. Para ello pesamos 0,05 g de MTT y lo disolvemos en 50 ml de DPBS precalentado a 37 °C. Posteriormente agitar en vórtex hasta que se disuelva totalmente el MTT y filtrar para asegurar condiciones de esterilidad. Guardar protegido de la luz a 4 °C.

Procedimiento

El procedimiento experimental descrito a continuación se inicia con células sembrada en placas *FlexI* sometidas o no a deformación celular (véase procedimiento experimental en página 56).

1. Aspirar el medio de cultivo de cada pocillo y lavar las células con DPBS tres veces a 37 °C.
2. Añadir 300 µl/pocillo de MTT 1 mg/ml y mantener en incubador de CO₂ durante 1 h a 37 °C. Todos los pasos que a continuación se describen se realizan en oscuridad.
3. Retirar el medio MTT y añadir 250 µl de Me₂SO. Agitar vigorosamente durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Añadir 25 µl de Tris 2 M a pH 10,5. La concentración final de Tris es de 0,2 M.

5. Transferir 200 μl de cada muestra a una nueva placa de 96 pocillos. Medir la absorbancia en el lector de placas a 570 nm como longitud de onda de medida y 690 nm como longitud de onda de referencia.
6. Realizar un ensayo en blanco añadiendo 300 μl de MTT sobre un pocillo en ausencia de células. Restar la medida de absorbancia obtenida a cada uno de los valores registrados.

DAÑO OXIDATIVO

Determinación de los niveles de Especies con Oxígeno Reactivo (EOR)

Equipamiento

- ♣ Lector de placas FLUOstar[®] Omega (*BMG Labtech*)

Reactivos y material

- ♣ Medio de carga. En el momento de usar diluir la sonda H2DCFDA a 10 μM en medio de Tyrode. Mantener a 37 °C.
- ♣ Medio de Tyrode a 4 °C (véase apartado de disoluciones de tipo general y medios tamponados en *Capítulo 2*)
- ♣ Solución de BSA 0,1 % (p/v) en DPBS
- ♣ Solución de DPBS
- ♣ Solución de disociación celular (*Thermo Fisher Scientific*)
- ♣ Sonda H2DCFDA (*Thermo Fisher Scientific*)

Procedimiento

El procedimiento experimental se realiza sobre células sembradas en placas de cultivo *FlexI*.

1. Aspirar el medio de cultivo y lavar tres veces con DPBS a 37 °C.
2. Adicionar medio de carga y mantener en incubador durante 30 min a 37 °C.

3. Retirar el medio de carga y lavar tres veces con DPBS e incubar 30 min a temperatura ambiente.
4. Añadir solución de disociación celular a razón de 0,1 ml/cm² para despegar las células y mantener 2 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 480 ×g durante 10 min a 4 °C.
5. Resuspender el precipitado celular en DPBS a 4 °C y contar usando cámara de Neubauer.
6. Medir la absorbancia de 3 x 10⁵ células en un lector de placas usando 485 y 530 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente.

Cuantificación de los niveles de MDA

Equipamiento

- ♣ Lector de placas Infinite® M200Pro (*Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza*)
- ♣ Homogeneizador *Omni-THq 2054 (Taper)*

Reactivos y material

- ♣ 1,1,3,3-tetrametoxipropano (*Merck*)
- ♣ Solución de DPBS a 4 °C
- ♣ KCl 1,15 % (p/v) a 4 °C
- ♣ Medio de solubilización compuesto por: SDS 0,4 % (p/v), ácido acético (pH 3,5) 7,5 % (v/v) y ácido tiobarbitúrico 0,3 % (v/v).

Procedimiento

El procedimiento experimental que se describe a continuación se realiza en cámara fría a 4 °C, usando tejido procedente del VI de ratas infartadas y de ratas no infartadas.

1. Pesar ~30 mg de tejido y homogeneizar en 0,4 ml KCl 1,15 %.
2. Recoger todo el volumen sobre un tubo estéril de 50 ml que contiene 15,6 ml de medio de solubilización.
3. Preparar una recta patrón de 0-100 μ M usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano.
4. Mezclar vigorosamente todas las muestras y calentar durante 2 h a 95 °C. Enfriar a temperatura ambiente.
5. Añadir n-butanol/piridina (15:1).
6. Agitar enérgicamente y centrifugar a 14.500 \times g durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Recoger el sobrenadante y medir en el lector de placas seleccionando 532 nm como longitud de onda de medida.

EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA

Equipamiento

- ♣ Agitador orbital
- ♣ Baño termostatzado a 70 °C
- ♣ Cabina de flujo laminar
- ♣ Centrífuga refrigerada 5415 R Eppendorf®: *Hamburg-Alemania*
- ♣ Concentrador de partículas magnéticas (gradilla magnética) (120.20D) (*Invitrogen*)
- ♣ Homogeneizador *Omni-THq 2054 (Taper)*
- ♣ Mini-centrifuga C1301B (*LABNET International*)
- ♣ NanoDrop™ 2000 (*ThermoFisher Scientific*)
- ♣ Termociclador LightCycler® 2.0 (*Roche LifeScience*)
- ♣ Termociclador TC-412 (*TECHNE*)

Reactivos y material

- ♣ Agua DEPC (*Merck*)
- ♣ Capilares LightCycler® de 20 µl (*Roche LifeScience*)
- ♣ Etanol al 70 % (v/v)
- ♣ Kit *Applied Biosystems™ GeneAmp™ RNA PCR Core* (*Fisher Scientific*)
- ♣ Kit de purificación *Dynabeads™ mRNA™* (*ThermoFisher Scientific*)
- ♣ Material estéril necesario: Jeringas de 1 ml y agujas 21G, tubos Eppendorf, tubos de polipropileno de 5 ml, placas de Petri, puntas, pinzas y tijeras
- ♣ Solución descontaminante *RNase™ AWAY* (*ThermoFisher Scientific*)
- ♣ *SYBR® Premix Ex Taq™* (*Takara*)

Extracción de ARNm

Para el aislamiento de ARNm utilizamos el Kit *Dynabeads® mRNA DIRECT™*, que permite el aislamiento de ARNm poliadenilado puro e intacto procedente de lisado de tejidos o de cultivos de células. El protocolo se basa en la unión específica entre la cola de poli(A) presente en el extremo 3' del ARNm y las secuencias de Oligo (dT)₂₅ unidas de forma covalente a la superficie de unas bolitas magnéticas denominadas *Dynabeads*. El procedimiento permite el aislamiento de la población de ARNm de la muestra. El ARN ribosómico, ADN, proteínas y otras moléculas de ARN al no unirse a estas bolitas magnéticas, se descartan. Los agentes inhibidores de ARNasas en el tampón de lisis/unión junto con estrictas condiciones de lavado e hibridación garantizan el aislamiento de ARNm puro e intacto.

Extracción de ARNm a partir de muestras de tejido del VI*Procedimiento*

Todo el material usado se trata antes de su uso con solución descontaminante y se mantiene en el interior de una cabina de flujo durante todo el procedimiento. Mantener todos los componentes del kit de purificación Dynabeads™ durante 30 min a temperatura ambiente.

1. Agitar y coger 175 μ l de bolitas del kit Dynabeads™ y depositar sobre tubos Eppendorf debidamente marcados.
2. Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética y esperar 2 min. Las bolas quedan orientadas hacia los imanes, y de esta forma podemos retirar el tampón en el que se encontraban suspendidas.
3. Añadir 150 μ l de tampón de lisis del kit Dynabeads™ y retirar los Eppendorf de la gradilla magnética. Agitar suavemente en el vórtex y colocar de nuevo en los imanes. Mantener en estas condiciones 2 min y retirar el tampón de lisis.
4. Pesar ~30 mg de tejido y colocar en una placa de Petri sobre baño de hielo. Adicionar 1 ml de tampón de lisis del kit Dynabeads™.
5. Cortar el tejido en pequeños fragmentos y pasar a un tubo de polipropileno de 5 ml.
6. Utilizar *Omni-THq* para homogenizar las muestras, en baño de hielo, durante 3 periodos de 20 s cada uno —haciendo pausas de 10 s— y manteniendo siempre la muestra en baño de hielo. Evitar la formación de espuma.
7. Pasar las muestras a través de una jeringa con una aguja de 21G de 3-5 periodos. Centrifugar a 16.000 \times g durante 1 min a 4 °C y recoger el

- sobrenadante y adicionar en los tubos Eppendorf que contenían las bolitas (véase paso 3).
8. Retirar los Eppendorf de la gradilla y agitar vigorosamente en vórtex para mezclar la muestra durante unos segundos.
 9. Colocar todas las muestras en el agitador orbital y mantener en estas condiciones durante 15 min a temperatura ambiente.
 10. Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética y mantener 5 min a temperatura ambiente.
 11. Retirar el tampón de lisis y comenzar con los lavados añadiendo 0,8 ml. de Tampón A del kit Dynabeads™. Agitar en vórtex y de nuevo colocar en la gradilla magnética durante otros 2 min. Repetir este paso otra vez.
 12. Añadir 0,8 ml de tampón B del kit Dynabeads™ y agitar suavemente en vórtex y de nuevo colocar en la gradilla magnética durante 3 min.
 13. Retirar lentamente el tampón B sin generar burbujas.
 14. Añadir 22 µl de agua DEPC y agitar suavemente. Trasladar los tubos Eppendorf con las muestras al baño termostático a 70 °C y mantener durante 2 min.
 15. Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética y esperar otros 5 min.
 16. Recoger el agua DEPC —que contiene la población de ARNm— en nuevos tubos Eppendorf estériles que se mantienen en todo momento en baño de hielo. Guardar a – 80 °C.

Extracción de ARNm a partir de cultivo celular

El procedimiento experimental descrito a continuación se basa en el aislamiento de ARNm a partir de un cultivo celular sembrado en placa de 6 pocillos.

Procedimiento

1. Agitar y coger 175 μ l de bolitas del kit Dynabeads™ y depositar sobre tubos Eppendorf debidamente marcados.
2. Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética y esperar 2 min. Las bolas quedan orientadas hacia los imanes, y de esta forma podemos retirar el tampón en el que se encontraban suspendidas.
3. Añadir 150 μ l de tampón de lisis del kit Dynabeads™ y retirar los Eppendorf de la gradilla magnética. Agitar suavemente en el vórtex y colocar de nuevo en los imanes. Mantener en estas condiciones 2 min y retirar el tampón de lisis.
4. Aspirar medio de la placa de cultivo y lavar dos veces con DPBS a 4 °C.
5. Adicionar 1 ml de tampón de lisis del kit Dynabeads™ /pocillo y mantener la placa sobre un baño de hielo. Raspar con un raspador celular y recoger sobre tubos Eppendorf.
6. Pasar la muestra a través de una jeringa con una aguja de 21G de 3-5 periodos. Centrifugar a 16.000 \times g durante 1 min a 4 °C y recoger el sobrenadante y adicionar en los tubos Eppendorf que contenían las bolitas (véase paso 3).
7. Retirar los Eppendorf de la gradilla y agitar vigorosamente en vórtex para homogeneizar la muestra durante unos segundos.
8. Colocar todas las muestras en el agitador orbital y mantener en estas condiciones durante 15 min a temperatura ambiente.
9. Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética y mantener 5 min a temperatura ambiente.

10. Retirar el tampón de lisis y comenzar con los lavados añadiendo 0,8 ml. de Tampón A del kit Dynabeads™. Agitar en vórtex y de nuevo colocar en la gradilla magnética durante otros 2 min. Repetir este paso otra vez.
11. Añadir 0,8 ml de tampón B del kit Dynabeads™ y agitar suavemente en vórtex y de nuevo colocar en la gradilla magnética durante 3 min.
12. Retirar lentamente el tampón B sin generar burbujas.
13. Añadir 17 µl de agua DEPC y agitar suavemente. Trasladar los tubos Eppendorf con las muestras al baño termostatzado a 70 °C y mantener durante 2 min.
14. Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética y esperar otros 5 min.
15. Recoger el agua DEPC —que contiene la población de ARNm— en nuevos tubos Eppendorf estériles que se mantienen en todo momento en baño de hielo. Guardar a – 80 °C.

Retrotranscripción

El kit usado *Applied Biosystems*® *GeneAmp*® *RNA PCR Core* contiene todos los componentes necesarios para la retrotranscripción de la población de ARNm a ADNc; utilizando la enzima transcriptasa inversa *MuLV*.

Procedimiento

1. Evaluar el grado de pureza y concentración de cada una de las muestras de ARNm obtenidas y almacenadas a – 80 °C.
2. Preparar en tubos Eppendorf el medio de reacción siguiendo las adiciones que se detallan en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Detalle de la composición del medio de reacción para pasar de ARNm a ADNc; kit *Applied Biosystems® GeneAmp® RNA PCR Core*.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (μl)</i>
MgCl ₂ 25 mM	4
Tampón II (10×)	2
dGTP	2
dATP	2
dTTP	2
dCTP	2
Inhibidor RNAsa	1
MuLV	1
Oligo (dT)	1

Tabla 2.6. Descripción de la composición del medio de reacción para la retrotranscripción.

3. Añadir 0,5 μg de ARN a la mezcla de reacción preparada en el punto 2 y completar a un volumen final de 20 μl con agua DEPC.
4. Utilizar la mini-centrifuga para concentrar todo el volumen de reacción.
5. Colocar los Eppendorf en el termociclador y seleccionar los parámetros siguientes: 15 min a 42 °C, 5 min a 99 °C y 5 min a 5 °C. Sacar los Eppendorf y guardar a –80 °C.

PCR cuantitativa

Procedimiento

1. Evaluar el grado de pureza y concentración de cada una de las muestras de ADNc obtenidas y almacenadas a – 80 °C.
2. Preparar el medio de reacción siguiendo las adiciones que se detallan en la tabla 2.7.

Tabla 2.7. Detalle de la composición del medio de reacción para la realización de la PCR cuantitativa; *SYBR® Premix Ex Taq™*.

<i>Componentes</i>	<i>Volumen (μl)</i>
SYBR® (2×)	10
Primer (Fw)	0,4
Primer (Rv)	0,4

Tabla 2.7. Descripción del medio de reacción para la PCR cuantitativa.

3. Añadir 0,5-2 μl de ADNc y completar con agua DEPC a un volumen final de 20 μl en capilares de vidrio. El volumen de ADNc añadido al medio de reacción dependerá de los resultados obtenidos de diluciones seriadas. Las secuencias de los primers utilizados se detallan en las tablas 2.8 y 2.9.
4. Utilizar la centrífuga para concentrar todo el volumen de reacción en el fondo de cada uno de los capilares usados.
5. Colocar los capilares en el termociclador *LightCycler®* 2.0 y amplificar seleccionando los parámetros: 10 s a 95 °C, 10 s a 60 °C y 15 s a 72 °C.

Tabla 2.8. Detalle de los primers usados para PCR cuantitativa en rata.

<i>Moléculas</i>	<i>Forward primer (5'→3')</i>	<i>Reverse primer (5'→3')</i>
AMPK α 1	ATTCTTGGTTGCCGAAACAC	CCCGATCTCTGTGGAGTAGC
AMPK α 2	ACAGGCCATAAAGTGGCAGT	CAACACGTTCTCTGGCTTCA
Col 1a1	CCAGCCGCAAAGAGTCTACA	GGTTTCCACGTCTCACCATT
Col 3a1	TGGTTTCTTCTCACCTGCT	GGGCAGTCTAGTGGCTCATC
FAP1	CATATGGGGATGGTCCTACG	GCTCTTGCCATCACAGTTGA
Galectin-3	CCCGACTGGACCACTGACA	CAGCATGCGAGGCATGACT
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTA	AGAGGGGGCCATCCACAGTC
HDAC4	ACGGTCAAGGCTTAAGCAGA	ACGTTGCCAGAGCTGCTATT
IL-33	GTGCAGGAAAGGAAGACTCG	TGGCCTCACCATAAGAAAGG
IL6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	CAGAATTGCCATTGCACAAC
MCP1	TTCCTTATTGGGGTCAGCAC	CAGTTAATGCCCCACTCACC
MitoNox	TCCTGGGTGTCTGACTCCTT	CTTCCCATCAATTCCCAGA
PKC α	ATTAGCCTCTTGGGGGAAGA	CCGTCCATGAGGTAGGTTTG
Smad-2	ATGTCGTCCATCTTGCCATTC	AACCGTCCTGTTTTCTTTAGCTT
Smad-3	AGGGCTTTGAGGCTGTCTACC	ACCCGATCCCTTTACTCCCA
sST2	GGTGTGACCGACAAGGACT	TTGTGAGAGACACTCCTTAC
ST2L	AGTTGTGCATTTACGGGAGAG	GGATACTGCTTTCCACCACAG
TGF- β	CACCCGCGTGCTAATGGT	GGCACTGCTTCCCGAATG
TNF α	ATACACTGGCCCGAGGCAAC	CCACATCTCGGATCATGCTTTC
Yy1	AGTGGGAACAGAAGCAGGTG	CGTGCGCAAATTGAAGTCCA
α -SMA	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA

Tabla 2.8. Descripción de las secuencias de los primers específicos para rata, usados para la PCR cuantitativa.

Tabla 2.9. Detalle de secuencias específicas de *primers* de ratón para PCR cuantitativa.

<i>Moléculas</i>	<i>Forward primer (5'→3')</i>	<i>Reverse primer (5'→3')</i>
AMPK α 1	CTCAGTTCCTGGAGAAAGATGG	CTGCCGGTTGAGTATCTTCAC
AMPK α 2	CATGGCTGAGAAGCAGAAGCAC	CTTAACTGCCACTTTATGGCCTG
Col 1a1	CTGGCAAGAAGGGAGATGA	CACCATCCAAACCACTGAAA
Col 3a1	ACAGCAAATTCACCTTACACAGTTC	CTCATTGCCTTGCGTGTTT
FAP1 α	CACCTGATCGGCAATTTGTG	CCCATTCTGAAGGTCGTAGATGT
Galectin-3	CAGTGCTCCTGGAGG CTATC	AAGGGGAAGGCTGACTGTCT
GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTGAACG	TCGTTGATGGCAACAATCTC

Tabla 2.9. Descripción de las secuencias de *primers* específicos para ratón

REACTIVOS FRECUENTEMENTE UTILIZADOS

Tabla 2.10. Reactivos y referencias de compra.

<i>Reactivos</i>	<i>Distribuidor (Nº de Catálogo)</i>
A23187	Merck (C7522)
Acril:Bis al 30 %	Merck (A3699)
Agua DEPC	Merck (693520)
BSA	Merck (A9647)
Buprenorfina	Fatro Ibérica SL., Barcelona
CaCl ₂	Merck Millipore (109943)
Clorhexidina	DCCA500B (Vialta, Españ)
Colagenasa D	Merck (11088882001)
CuSO ₄ anhidro	Scharlau (CO0087)
DAB	Dako (K4003)
DAPI	Thermo Fisher Scientific (D1306)
Dexmedetomidina	(Orion Pharma SL., Madrid)
DPBS	Thermo Fisher Scientific (14190-094)
EDTA	Merck (ED2SS)
Etanol	Merck Millipore (1009831000)
Etanol absoluto; IHC	VWR Chemical (83813.360).
ECL™ Prime	Amersham (RPN2232)
Formaldehido; IHC	Panreac (252931.1215)

GKT137831	Cayman (17764)
Glicerol	Scharlau (GL0028)
Glucosa	Merck (G8270)
Hematoxilina Harris	Thermo Fisher Scientific (6765004)
Heparina	Merck Millipore (L6510)
HEPES	Merck (H3375)
Inh. Fosfatasas	Merck (P0044)
Inh. Proteasas	Merck (P8340)
Isoflurano	Henry Schein® (1182097)
KCl	Merck (P9541)
Ketamina	Fatro Ibérica
KH ₂ PO ₄	Merck (P5379)
Kit Applied Biosystems™	Thermo Fisher Scientific (N8080143)
Kit Dynabeads™	Thermo Fisher Scientific (61012)
Kit Tricrómico Masson	Bio-Optica (04-010802)
L-Glutamina	Lonza (BE17-605E)
Lipofectamina 2000	Thermo Fisher Scientific (11668-019)
Medio montaje; IHC	Merck Millipore (1.09016.0500)
Metformina	Merck (D150959)
MgCl ₂	Panreac (131396-1210)
MgSO ₄	Merck (M2643)
MTT	Merck (M5655)
Na ₂ HPO ₄	Scharlau (SO0336)
Na ₃ VO ₄	Merck (S6508)
NaCl	Merck (S9888)
NaF	Merck (201154)
NaHCO ₃	Merck (S6014)
P/S	Lonza (DE17-602E)
Parafina	Merck Millipore (1.11609.9025)
Pierce™ BCA	Thermo Fisher Scientific(23223)
PMA	Merck (P8139)
PMSF	Merck (11359061001)
Proteasa	Merck (P5147)
Quelcritrina	Merck (220285)
React. Inh. Peroxidasa	Dako (K4003)

Revertor®	Virbac España SA
RNAlater®	Thermo Fisher Scientific (AM7021)
RNase™ AWAY	Thermo Fisher Scientific (7002PK)
SDS	Merck (L3771)
Sol. de disociación celular	Thermo Fisher Scientific (13151014)
Sol. Enz.; IHC	Dako (GV804; GV805)
Sol. Lavado; IHC	Dako (GC-820)
Suero fetal	Thermo Fisher Scientific(10270)
Suero fisiológico	(NaCl 0,9 %) (Labesfal Almiro, Portugal)
Sustituto Xileno, IHC	Thermo Fisher Scientific (6915)
SYBR® Premix Ex Taq™	Takara (RR041A)
Taurina	Merck (T8691)
1,1,3,3-Tetrametoxipropano	Merck (108383)
Tripsina	Merck (T4049)
Tris	Merck (93363)
TX-100	Merck (T8787)
β-mercaptoetanol	Merck (M6250)
[³ H]-Fenilalanina	PerkinElmer (NET1122001MC)

Tabla 2.10. *Detalle de los productos químicos usados en el plan de trabajo de esta memoria de Tesis Doctoral.*

DISOLUCIONES DE TIPO GENERAL Y MEDIOS TAMPONADOS

Medios de aislamiento de proteínas

Medio de extracción de proteínas totales

Este medio de extracción está formado por: Tris-HCl 150 mM, EGTA 1 mM, TX-100 al 1 % (v/v), desoxicolato sódico al 1 % (p/v), SDS al 0,1 % (p/v). Ajustar el pH a 7,4 con NaOH, filtrar para esterilizar. Conservar a 4 °C. Justo en el momento de usar adicionar: PMSF 1 % (p/v), cóctel inhibidor de proteasas 1 % (v/v), cóctel inhibidor de fosfatasas 1 % (v/v), Na₃VO₄ 5 mM y NaF 50 mM. Agitar vigorosamente y mantener en baño de hielo.

Medio de extracción STM

Este medio de extracción está compuesto por: sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH, filtrar para esterilizar. Conservar a 4 °C. En el momento de usar adicionar: PMSF 1 % (p/v), cóctel inhibidor de proteasas 1 % (v/v), cóctel inhibidor de fosfatasas 1 % (v/v), Na₃VO₄ 5 mM y NaF 50 mM. Agitar vigorosamente y mantener en baño de hielo.

Medio de extracción de proteínas NET

El medio citado está constituido por: Hepes 20 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 0,2 mM, glicerol 20 % (v/v) y TX-100 1 % (v/v). Ajustar el pH a 7,4 con NaOH, filtrar para esterilizar. Conservar a 4 °C. Justo en el momento de usar adicionar: PMSF 1 % (p/v), cóctel inhibidor de proteasas 1 % (v/v), cóctel inhibidor de fosfatasas 1 % (v/v), Na₃VO₄ 5 mM y NaF 50 mM. Agitar vigorosamente y mantener en baño de hielo.

Medio de extracción de proteínas SOL

El medio SOL está formado por: Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, TX-100 al 0,5 %. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH, filtrar para esterilizar. Conservar a 4 °C. Justo en el momento de usar adicionar: PMSF 1 % (p/v), cóctel inhibidor de proteasas 1 % (v/v), cóctel inhibidor de fosfatasas 1 % (v/v), Na₃VO₄ 5 mM y NaF 50 mM. Agitar vigorosamente y mantener en baño de hielo.

Medio de desnaturalización (2×)

El medio de desnaturalización está formado por: Tris-HCl 0,125 mM, SDS al 4 % (p/v), 2-mercaptoetanol al 10 % (v/v), glicerol al 20 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,004 % (p/v). Guardar en alícuotas a -20 °C.

Tampón TBS (10×)

El medio TBS (10×) está compuesto por: Tris 0,2 M, NaCl 1,4 M. Ajustar pH con NaOH a 7,6. Conservar a 4 °C.

Tampón TBST

Para un volumen total de 500 ml: Diluir 50 ml de TBS (10×) en 450 ml de agua Milli-Q. Adicionar 0,1 % de Tween-20. Agitar vigorosamente y guardar a 4 °C.

Medio de bloqueo

En el momento de usar preparar generar una solución formada por BSA al 5 % (p/v) en TBST (1×).

Medio de Tyrode

El medio de Tyrode está formado por: Hepes 10 mM, NaCl 124 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 5mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, Glucosa 10 mM y BSA 0,25 % (p/v). Ajustar el pH a 7,4 con NaOH. Filtrar para esterilizar y guardar a 4 °C.

MATERIAL FUNGIBLE FRECUENTEMENTE UTILIZADO

Tabla 2.11. Descripción del material fungible.

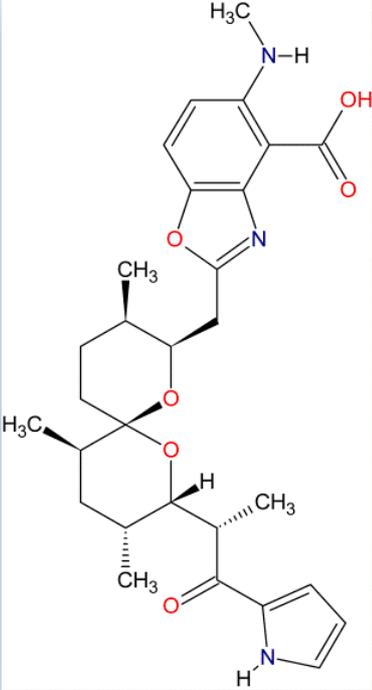
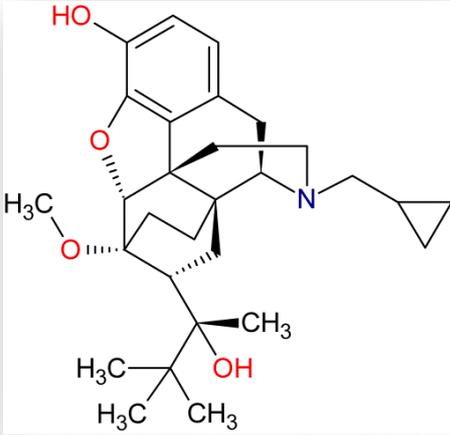
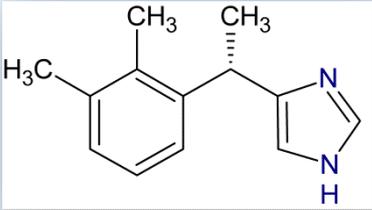
<i>Fungible</i>	<i>Distribuidor (N° de Catálogo)</i>
Bisturí estéril desechable	B Braun (BA822SU)
Capilares LightCycler® de 20 µl	Roche LifeScience (04929292001)
Casetes histológicos; IHC	Labolan (100713)
Cubreobjetos de 24×60; IHC	Deltalab (D102460)
Filtros Falcon® de 100 µm	Corning (352360)
Filtros para electrotransferencia	BioRad (1703932)

Frascos de cultivo de 175 cm ²	Sarstedt (83.1812.002)
Frascos de cultivo de 25 cm ²	Sarstedt (83.1810.002)
Frascos de cultivo de 75 cm ²	Sarstedt (83.1813.002)
Lápiz Graso; IHC	Dako (S2002)
Membrana de PVDF	BioRad (1620177)
Pipetas Pasteur de vidrio	Brand (747720)
Pipetas Pasteur estériles de polietileno (3 ml)	Deltalab (200007)
Pipetas serológicas Falcon® de 10 ml	Corning (357551)
Pipetas serológicas Falcon® de 5 ml	Corning (357543)
Placas de cultivo de 150 mm de Ø	Sarstedt (18.1803)
Placas de cultivo de 24 pocillos	Sarstedt (83.1836)
Placas de cultivo de 35 mm	MatTek Corp. (P35G-1.5-14-C)
Placas de cultivo de 96 pocillos	Sarstedt (83.1835)
Placas de cultivo Flex I	Flexcell® Inter. Corp. (BF-3001C)
Portaobjetos; IHC	Thermo Fisher Scientific (J1800AMNZ)
Raspador celular	Corning (353086)
Sutura de polipropileno de 4-0 PROLENE™	ETHICON (W525)
Sutura de polipropileno de 6-0 PROLENE™	ETHICON (W8718)
Sutura de seda de 3-0	LorcaMarín (55146)
Tubos CELLStar® de 50 ml	Greiner Bio-one (227 261)
Tubos Eppendorf de 0,2 ml	VWR™ (732-0548)
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	Greiner Bio-one (616201)
Tubos Falcon® de 15 ml	Corning (352096)
Unidad de filtración de 0,22 µm (250 ml)	Merck Millipore (SCGPU02RE)

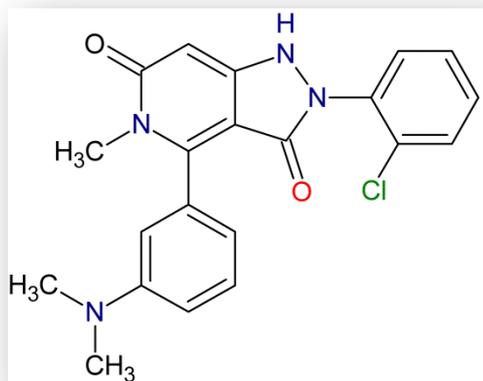
Tabla 2.11. *Descripción del material fungible usado en el plan de trabajo de esta memoria de Tesis Doctoral.*

DETALLE DE ALGUNAS ESTRUCTURAS MOLECULARES

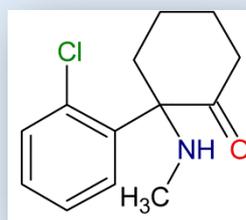
Tabla 2.12. Detalle de estructuras moleculares de reactivos.

Reactivos	Estructura
A23187	
Buprenorfina	
Dexmedetomidina	

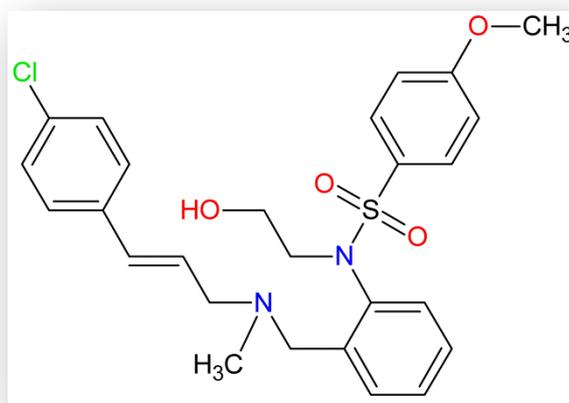
GKT137831



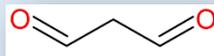
Ketamina



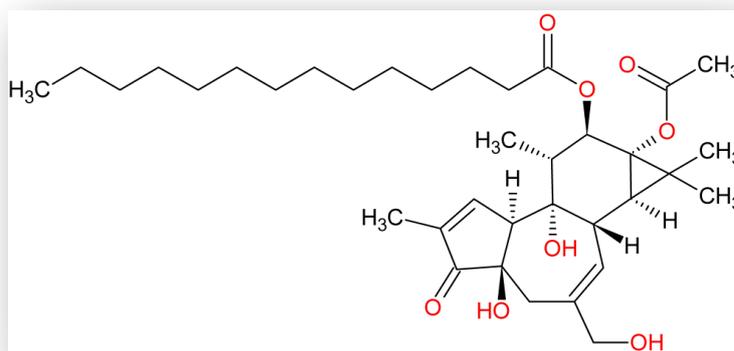
KN-93



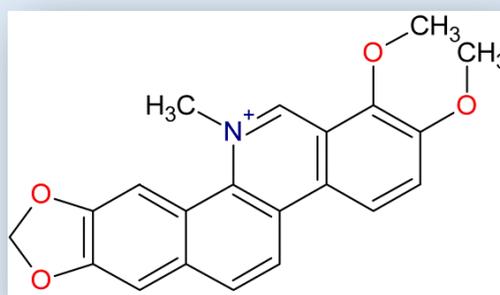
MDA



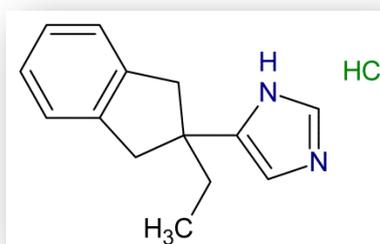
PMA



Quelerritina



Revertor





Blue Hour In Black And White Portland Head Light. Jeff Sinon.

3



La inhibición farmacológica de la ruta NADPH oxidasa 4 mitocondrial/PKC α /Gal-3, reduce la fibrosis ventricular tras el infarto de miocardio....



RESUMEN

Aunque en la fase más aguda tras un infarto de miocardio se activa un proceso de fibrosis reparativa que es necesario para prevenir la ruptura de la pared ventricular, una respuesta fibrótica exagerada, así como una fibrosis reactiva fuera del área lesionada, inducen un efecto perjudicial sobre el miocardio infartado. Aunque metformina además de proporcionar un control sobre el estado glucémico puede prevenir la fibrosis adversa tras el infarto de miocardio, los mecanismos que subyacen a este efecto cardioprotector no se conocen con exactitud. Este estudio describe el efecto de la enzima mitocondrial NADPH oxidasa 4 (mitoNox) y la proteína quinasa C alfa (PKC α) sobre la fibrosis adversa cardíaca, así como los mecanismos implicados en la expresión de Galectina-3 por los cardiomiocitos tras el infarto de miocardio.

Para la realización del estudio ratas aleatorizadas a recibir metformina o solución salina, se someten a un proceso quirúrgico para la inducción de infarto de miocardio por ligadura permanente de la arteria coronaria anterior izquierda. En paralelo se utiliza un modelo de deformación celular, así como un protocolo de cocultivo celular con el objetivo de evaluar la comunicación paracrina entre cardiomiocitos y fibroblastos. El tratamiento a largo plazo con metformina después del infarto de miocardio se asocia con: i) una reducción de la fibrosis miocárdica y de los niveles de Gal-3; ii) un aumento en los niveles de expresión de AMPK α 1/ α 2, y iii) una inhibición tanto de la expresión como de las actividades enzimáticas de mitoNox y PKC α . Estos hallazgos son reproducidos en un modelo celular donde el silenciamiento de la expresión de la enzima AMPK bloquea la capacidad de metformina para proteger a los cardiomiocitos de los efectos deletéreos asociados con la deformación celular. Por otro lado, el uso de inhibidores específicos o siRNAs nos proporciona evidencias de que la enzima

PKC α actúa aguas abajo de mitoNox, y que la activación de esta vía da como resultado un incremento de los niveles de expresión de Gal-3. Nuestros datos determinan que Gal-3 secretada por los cardiomiocitos bajo deformación celular activa a los fibroblastos cardíacos en la fase aguda del infarto de miocardio.

En conclusión, el incremento de la expresión de AMPK inducido por metformina mejora el remodelado cardíaco adverso tras el infarto de miocardio, lo cual está relacionado con una inhibición de la ruta mitoNox/PKC α /Gal-3. La manipulación farmacológica o genética de esta vía de señalización puede ofrecer nuevas opciones terapéuticas frente al remodelado adverso cardíaco al prevenir la activación de la población de fibroblastos en el miocardio.

INTRODUCCIÓN

Metformina, un antidiabético oral perteneciente al grupo de las biguanidas, es el fármaco más usado para el tratamiento de la diabetes de tipo II¹¹⁰. Un estudio clínico publicado en 2008 determinó que la terapia con metformina en pacientes con sobrepeso y diagnosticados con diabetes de tipo II, estaba relacionado con una reducción significativa de los eventos cardiovasculares asociados a la enfermedad¹¹¹. Este efecto protector de metformina se ha podido evaluar también en modelos experimentales animales con desórdenes de naturaleza no diabética y en estudios que evalúan su habilidad para limitar el tamaño de infarto y prevenir la fibrosis cardíaca adversa tras el IM¹¹²⁻¹¹⁴. Datos publicados recientemente muestran como el tratamiento con metformina previene el daño inducido por isquemia a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)^{115,116}. De hecho, se ha descrito como metformina es capaz de prevenir la muerte celular apoptótica de cardiomiocitos y mejorar la función cardíaca de corazones caninos afectados a través de la activación de AMPK¹¹⁶. Estos estudios determinan, por tanto, que la terapia con metformina puede tener un potencial terapéutico contra la IC. A pesar de ello, el mecanismo molecular relacionado con esta acción cardioprotectora de metformina no se conoce con exactitud.

Existe un interés cada vez mayor por estudiar el papel que desempeñan las enzimas NADPH oxidasa 4 mitocondrial (mitoNox) y la proteína quinasa C-alfa (PKC α) sobre el remodelado cardíaco adverso tras el IM^{117,118}. Diversos estudios han determinado que la enzima mitoNox se localiza en las mitocondrias lo que contribuye a aumentar la producción de especies con oxígeno reactivo (EOR)¹¹⁹⁻¹²¹. Otros autores han determinado que el aumento de su expresión contribuye al desarrollo de una remodelación miocárdica adversa¹¹⁷. Por otro lado, la enzima PKC α se ha identificado como una proteína importante que está relacionada con

respuestas cardíacas adversas entre las que destacan la fibrosis, la hipertrofia y la inflamación —procesos relacionados con la IC y la isquemia—^{118,122,123}. Se ha encontrado que los niveles de PKC α aumentan significativamente tanto en modelos animales como en pacientes con IC^{124,125} y que su inhibición selectiva induce efectos cardioprotectores^{123,126}. Por otro lado, existen evidencias experimentales que relacionan el aumento del daño oxidativo con la activación de PKC α a través de la inducción de una modificación oxidativa directa de las proteínas¹²⁷. A pesar de lo expuesto anteriormente, poco se sabe sobre las vías de señalización que son activadas aguas abajo de las enzimas mitoNox y PKC α y que conducen al desarrollo de una fibrosis adversa tras el IM.

La Galectina-3 (Gal-3) es una lectina de unión a β -galactósido que media la fibrosis miocárdica y la progresión a IC^{45,128}. De hecho, *in vitro*, la adición de Gal-3 exógeno sobre fibroblastos en cultivo induce su proliferación^{129,130}. Gal-3 participa en la respuesta pro-fibrótica y se ha propuesto como un objetivo terapéutico para prevenir el remodelado cardíaco adverso tras el IM¹³¹⁻¹³³. Aunque varios estudios han caracterizado la participación de mitoNox, PKC α y Gal-3 en la fibrosis miocárdica de forma independiente¹³⁴⁻¹³⁶, su relación y los mecanismos subyacentes son poco conocidos.

Este estudio tiene como objetivo global dilucidar los mecanismos subyacentes a la acción anti-fibrótica de metformina en el miocardio infartado mediante la evaluación de la participación de Gal-3 y la vía de señalización mitoNox/PKC α . Además, dado que la activación de las enzimas mitoNox y PKC α está involucrada en la fibrosis adversa y en la IC, este estudio también tiene como objetivo estudiar la relación entre estas enzimas y la expresión de Gal-3, como posibles objetivos terapéuticos en la prevención de la remodelación miocárdica adversa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y aspectos éticos

Los protocolos experimentales desarrollados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (Referencia: A13150105). Todos los ensayos experimentales se han realizado en base siempre de la legislación vigente. El estudio se realizó usando ratas adultas *Sprague-Dawley* (SD) macho de 6 semanas obtenidas de ENVIGO RMS, SL (Barcelona, España). A su llegada, los animales fueron alojados en unas instalaciones adecuadas para ellos, libres de patógenos con salas controladas, cuyos ciclos luz/oscuridad eran de 12 h, con una temperatura regulada de ~22 °C, un 60 % de humedad, y alimentados *ad libitum*. Después de siete días de adaptación los animales fueron sometidos a un protocolo de inducción de IM (véase *Inducción experimental de IM en ratas; protocolo detallado en Capítulo 2*).

Inducción experimental de IM en ratas

Desde el inicio del procedimiento experimental los animales permanecen, tal como se ha descrito en el apartado anterior, alojados en una instalación libre de patógenos bajo estricta supervisión del personal veterinario y técnico del animalario de la Universidad de Murcia (CEIB) y en condiciones estándares. Tras la inducción del IM a los animales se les aporta una dieta comercial y agua *ad libitum*.

Antes de iniciar el procedimiento quirúrgico y sobre una mesa termostatzada a 37 °C, los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla compuesta por ketamina (75 mg/kg) y medetomidina (0,5 mg/kg), antes de ser intubados y ventilados mediante el uso de un “catéter intravenoso” de calibre 16 G mediante un sistema de ventilación artificial (véase *Capítulo 2*). Tras 10 min los animales —en un plano de anestesia profundo— se colocaron en decúbito lateral izquierdo, mantenidos a 37 °C y monitorizados por electrocardiograma (ECG) durante todo el proceso experimental quirúrgico (véase *Capítulo 2*).

La toracotomía del lado izquierdo se realizó mediante la realización de una pequeña incisión entre el tercer y cuarto espacio intercostal. El uso de un retractor quirúrgico nos permitió por un lado mantener el espacio intercostal abierto y situar a los pulmones —con ayuda de gasas estériles humedecidas en DPBS a 25 °C— fuera del área de retracción. La membrana pericárdica, que rodea el corazón, se desgarró sin proceder a la exteriorización del corazón. El punto donde se realizó la ligación de la arteria coronaria anterior descendente izquierda (CADI) se sitúa aproximadamente a 8 mm de su origen y se realizó mediante el uso de una hebra de polipropileno con un calibre de 6-0. La aparición de palidez y cianosis en la pared anterior del VI, inflamación de la aurícula izquierda, así como elevación en el segmento ST, se toman como indicativos de una ligadura satisfactoria. Finalmente, las costillas y los músculos se unen usando suturas sintéticas absorbibles solubles de 6-0. En esta última fase se deja colocado —en el plano quirúrgico— un pequeño tubo de plástico de 2 mm de Ø para conectar el espacio intratorácico con el medio exterior y con el objetivo final de aspirar el aire que puede permanecer, como consecuencia del procedimiento experimental, dentro de la cavidad torácica. A continuación, el tubo se deslizó y extrajo suavemente para

no dañar ningún tejido y finalmente se aplicó una solución compuesta por clorhexidina y betadine (1:1), sobre los puntos de sutura. Al finalizar, y por vía subcutánea, los animales recibieron cuatro dosis de buprenorfina (0,05 mg/kg) a intervalos de 8 h. De forma visual y a diario se controló la evolución de la herida, para evitar infecciones y controlar cualquier dehiscencia de la zona de sutura. Todo el procedimiento experimental descrito se realizó dentro de los 20 min posteriores a la administración de la anestesia (El procedimiento experimental se describe con detalle en el *Capítulo 2* de esta memoria de Tesis Doctoral)

Con el objetivo de estudiar la evolución del daño cardíaco, se realizó un examen ecocardiográfico a todas las ratas a las 24 h y 4 semanas después de la inducción del IM (justo antes del *sacrificio*). Utilizamos un equipo de ultrasonidos comercial (*HD11 XE Philips, Andover, Massachusetts, EEUU*) equipado con un transductor sectorial *phased array* de 4-12 MHz. La ecocardiografía se realizó de forma ciega, acorde al protocolo del *Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology of the American College of Veterinary Internal Medicine* y las recomendaciones de la *American Society of Echocardiography*^{137,138}. Antes del examen ecocardiográfico los animales se anestesiaron con una combinación de ketamina (75 mg/kg) y medetomidina (0,5 mg/kg) vía intraperitoneal. Se obtuvieron las imágenes estándar en modo eco-cardiográfico 2D tanto en eje largo como corto. Los signos de IM se definieron, mediante ecocardiografía 2D, como cualquier segmento con incremento de ecogenicidad y/o cambio en el espesor miocárdico o movimiento sistólico (hipoquinesia, aquinesia o disquinesia). El tamaño del IM se determinó a partir de las imágenes de eje corto obtenidas a partir del acceso paraesternal derecho al nivel de la válvula mitral, músculos papilares y ápex, utilizando un sistema de 12 segmentos. En cada uno de los tres planos, la cavidad ventricular en diástole se dividió en doce segmentos. En cada plano de

imagen, se obtuvo la media aritmética de tres medidas y se consideró el índice de esfericidad (IS), expresado como el porcentaje en la ecuación: $IS (\%) = \text{número de segmentos afectados} / 12 \times 100$. Los volúmenes telesistólico (*ESLVV*) y telediastólico (*EDLVV*) se obtuvieron a partir de las imágenes cuatro cámaras de eje largo, mediante el método Simpson y la fracción de eyección (FE) se determinó automáticamente como $FE = \frac{EDLVV - ESLVV}{EDLVV} \times 100$. A partir de la imagen de eje corto a nivel de las cuerdas tendinosas del VI se calcularon las áreas de acortamiento circunferencial en telesístole (*ESCSA*) y en telediástole (*EDCSA*) trazando la superficie interna del endocardio, y el área de acortamiento circunferencial global (ACC) se calculó mediante la fórmula $ACC = \frac{EDCSA - ESCSA}{EDSA} \times 100$. Al nivel de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral se determinaron las dimensiones ventriculares telesistólicas y telediastólicas mediante el modo M eco-cardiográfico. El índice de esfericidad (IS) del VI se calculó dividiendo la longitud del VI en diástole (obtenido a partir de la imagen paraesternal derecha de eje largo, cuatro cámaras) mediante el *EDLVD* (obtenido a partir de las imágenes en modo M). A los animales del grupo control se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico excepto que la arteria coronaria no fue ocluida. La mortalidad postoperatoria fue del 22 % durante las primeras 48 h, después de la cual no falleció ningún animal.

Grupos generados y diseño experimental del estudio

Los animales que sobrevivieron al procedimiento quirúrgico se dividieron en cuatro grupos experimentales: (1) grupo control tratado con placebo (NaCl al 0,9 % (p/v) en bloques de gelatina) (grupo control, n=10); (2) grupo infartado tratado con placebo (grupo IM, n=20); (3) grupo infartado tratado con metformina (metformina a una dosis diaria oral de 250 mg/kg, en bloques de gelatina) (grupo

IM+Met, n=20); y (4) grupo control tratado con metformina (grupo control+Met, n=10). Aunque la dosis de metformina —adquirida de *Merck* con referencia D150959— administrada fue mayor que la recomendada en humanos (10-40 mg/kg), diversos estudios demuestran que se necesitan dosis relativamente altas de metformina para que ejerza sus efectos en modelos experimentales^{139,140}. La administración de metformina se inició 24 h después de la inducción del IM y se mantuvo hasta su sacrificio 1 ó 4 semanas después del IM. La dosis de metformina se ajustó de forma semanal de acuerdo con el peso corporal de cada animal. El día del sacrificio y bajo condiciones de anestesia (isoflurano 1 %) suplementado con O₂ al 100 %, las áreas del borde y del infarto del VI se aislaron y procesaron para su posterior análisis. Un esquema representativo del aislamiento de cada una de las zonas se detalla en el *Capítulo 2*. La concentración de metformina en plasma se cuantificó por HPLC al sacrificio ($1,0 \pm 0,05$ nM a 1 semana, y $1,3 \pm 0,06$ mM a las 4 semanas).

Aislamiento de células cardíacas adultas de ratón

Los corazones fueron extraídos de la cavidad torácica de ratones macho C57BL6/J (véase *Capítulo 2*). A continuación, la arteria coronaria se perfundió con medio A compuesto por: NaCl 120,4 mM, KCl 14,7 mM, KH₂PO₄ 0,6 mM, Na₂HPO₄ 0,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 4 mM, HEPES 10 mM, y taurina 30 mM, mediante el uso de un sistema de perfusión retrogrado a través de la canulación de la aorta. La enzima Colagenasa de tipo D (*Merck KGaA, Alemania*) se adicionó para facilitar la disociación enzimática del ventrículo. Las células disociadas sedimentan a 37 °C durante 10 min permitiendo que los cardiomiocitos se acumulen formando un precipitado mientras que las células de naturaleza no miocítica permanecen en el sobrenadante. Los cardiomiocitos fueron a

continuación resuspendidos en un medio B formado por: 20 ml de tampón A, 1 ml de suero fetal bovino y 5 μ l de CaCl_2 1 M. De forma gradual se añadió CaCl_2 a la suspensión celular hasta alcanzar una concentración final de 1,2 mM. A continuación, los cardiomiocitos fueron *pre-sembrados* en una placa de cultivo en presencia de medio de cultivo MEM suplementado con suero fetal bovino al 5 % (v/v), 2, 3-butanodiona-monoxima 10 mM, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1 % (v/v) a 37 °C en un incubador de CO_2 . Para el aislamiento de fibroblastos cardíacos, el sobrenadante rico en células no miocíticas se centrifugó y el precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo MEM suplementado con suero fetal bovino al 5 % (v/v), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1 % (v/v). Los fibroblastos aislados son mantenidos a 37 °C en un incubador de CO_2 . Para determinar la pureza de cada una de las fracciones celulares aisladas, el nivel de ARNm para c-TnT, β -MHC y α -actinina, como marcadores específicos de cardiomiocitos y el nivel de ARNm para vimentina, FSP-1 y DDR2, como marcadores específicos de fibroblastos, fueron evaluados mediante PCR cuantitativa (véase Fig. 3.10).

Para inducir la deformación celular utilizamos el protocolo experimental descrito por Banerjee y cols.,¹⁴¹ utilizando el sistema experimental *Flexcell® FX-5000™*. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos específicas para este sistema —cuya base está formada por una membrana de silicona pretratada con colágeno tipo I (véase *Capítulo 2*)— y se mantuvieron durante 2 días en las condiciones óptimas de cultivo celular. Es importante señalar que todos los ensayos experimentales que se citan a continuación se realizaron en ausencia de suero fetal bovino y antibióticos.

Los modelos *Knockdown* en cardiomiocitos se generaron antes de inducir la deformación celular y siguiendo el protocolo experimental que se describe más

abajo. En este caso, después de finalizar el protocolo de transfección, las células se mantuvieron en medio de cultivo completo durante 48 h —lo que incrementó la flexibilidad y la respuesta celular al estiramiento— antes de iniciar el protocolo de deformación celular. La aplicación de una tensión cíclica se asoció con una disminución significativa del índice de supervivencia celular, que fue similar en todos los ensayos. Cuando se indica, los cardiomiocitos se pretratan con GKT137831 1 μM ¹⁴² o con Queleritrina 10 μM —inhibidores específicos de mitoNox y PKC α , respectivamente—, durante 30 min; o con metformina 4 mM durante 24 h, antes de iniciar el protocolo de deformación celular. La concentración de metformina —que representa la concentración en plasma fisiológica—¹⁴³ se seleccionó de acuerdo con estudios realizados previamente¹⁴⁴.

Efecto del medio condicionado de cardiomiocitos sobre los fibroblastos cardíacos bajo deformación celular.

El medio condicionado procedente de cardiomiocitos bajo deformación celular se usó para evaluar su efecto sobre fibroblastos cardíacos. Al finalizar el protocolo experimental de deformación celular sobre los cardiomiocitos (véase *Capítulo 2*), el medio MEM es aislado, centrifugado a baja velocidad —con la finalidad de eliminar todos los desechos celulares presentes en suspensión— y marcado finalmente como medio condicionado antes de su uso inmediato. Con el objetivo de evaluar la posible interacción de tipo paracrino entre cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos, sembramos $\sim 4 \times 10^5$ fibroblastos/pocillo en placas de 6 pocillos *FlexI*. En confluencia, los fibroblastos cardíacos se lavaron tres veces con DPBS a 37 °C antes de la adición del medio condicionado —procedente de los cardiomiocitos sometidos a deformación— y se les sometió a deformación celular (véase *Capítulo 2* y diagrama esquemático en figura 3.17, panel a). El medio

condicionado de cardiomiocitos que no habían sido sometidos a deformación celular fue adicionado también de forma paralela sobre fibroblastos en cultivo y se usó como control.

Extracción de ARN y PCR cuantitativa

Tejido fresco (~30 mg) —procedente de las zonas del borde y del infarto del VI— fue lavado primero con DPBS a 4 °C antes de ser cortado en pequeños fragmentos, en una placa de Petri y sobre un baño de hielo. De forma similar, cardiomiocitos en cultivo fueron lavados tres veces con DPBS a 4 °C en cámara fría, y concentrados por centrifugación a 16.000 ×g durante 1 min a 4 °C. En el *Capítulo 2* se detalla el procedimiento experimental de extracción tanto de tejido como de células. El ARNm se aisló mediante el uso del kit comercial *Dynabeads mRNA Direct* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EEUU). El cDNA se sintetizó utilizando el kit comercial *GeneAmp® RNA PCR Core Kit* (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la realización de la PCR cuantitativa usamos la sonda fluorescente *SYBR Premix Ex Taq* (Takara Biothechnology, Dalian, China) en un sistema *LightCycler* (Roche). Los datos se normalizaron con respecto al nivel de ARNm de GADPH. La eficiencia de cada par de primers fue evaluada usando diluciones seriadas de cDNA. En este sentido, 0,5-2 µl de cDNA se amplificaron usando un protocolo establecido de 40 ciclos de PCR cuantitativa (10 s a 95 °C, 10 s a 60 °C y 15 s a 72 °C), seguido de un periodo de disociación para estar seguros de que solo se amplifica un solo producto. Los genes amplificados y las secuencias de los *primers* utilizados se describen en las tablas 2.8 y 2.9 del *Capítulo 2*.

Aislamiento de la fracción proteica y western blot

El procedimiento experimental para el aislamiento de la fracción proteica total de muestras de tejido (~30 mg) procedente de la zona del borde del VI infartado, así como de células tratadas y células no tratadas ($\sim 8 \times 10^6$ células) se inició lavando las muestras tres veces con DPBS a 4 °C antes de homogeneizarlas en medio de extracción de proteínas totales (véase *Capítulo 2*, sección medios y diluciones). La muestra se trató en un homogeneizador ultrasónico y luego fue centrifugada a $20.000 \times g$ durante 20 min a 4 °C (véase *Capítulo 2*). El sobrenadante obtenido se guardó a -80 °C. La concentración de proteína de cada muestra se determinó por el método del ácido bicinónico¹⁰⁷. Para el aislamiento y separación de las fracciones mitocondrial y citosólica, usamos el método experimental descrito por Dimauro y cols.,¹⁴⁵ con algunas modificaciones (véase *Capítulo 2*).

La separación y detección de proteínas se realizó mediante procedimientos estándares, como se describió anteriormente¹⁴⁶ (véase *Capítulo 2*). En primer lugar, las muestras de proteína soluble se hirvieron durante 6 min en medio de desnaturalización (véase *Capítulo 2*, sección medios y diluciones) para separar y evitar interacciones entre proteínas. A continuación, cantidades iguales de proteína se cargaron en geles de poliacrilamida del 8 ó 10 %¹⁰⁸. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF a 4 °C usando un equipo de electrotransferencia húmeda (*Bio-Rad*) en presencia de metanol durante 1 h a 100 V. Para evaluar proteínas de alto peso molecular (>100 kDa), la transferencia se realizó a 4 °C en ausencia de metanol durante toda la noche a 25 V. Las membranas de PVDF tras la electrotransferencia se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h en medio de bloqueo (véase *Capítulo 2*, sección medios y diluciones). La incubación con el anticuerpo primario se realizó en medio de bloqueo a 4 °C

durante toda la noche y con agitación orbital. La membrana se lavó dos veces durante 10 min y otras dos veces durante 5 min con TBST (véase *Capítulo 2, sección medios y diluciones*) y se incubó de nuevo a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario durante 1 h en medio de bloqueo. Se usaron dos anticuerpos secundarios —teniendo en cuenta la especie de procedencia del anticuerpo primario— anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo, que se usaron a una dilución de 1:10.000 y 1:5.000, respectivamente. La membrana se lavó cinco veces durante 10 min cada vez con TBST y las bandas de proteína se detectaron mediante reacción de quimioluminiscencia con el reactivo *ECL Primer de Amersham* (RPN2232) (véase *Capítulo 2*), utilizando un equipo para análisis y documentación de geles ChemiDoc XRS+ acoplado al software *Image Lab de Bio-Rad* (Berkeley, CA, EEUU). Para el análisis cuantitativo de las bandas de proteína se usó el software *Gel-Pro Analyzer 3.1*. La eficacia de la transferencia se comprobó usando marcadores preteñidos de peso molecular: (1) *See Blue™ Plus2* (LC5925) de *Life technologies* —para seguimiento de proteínas de bajo/medio peso molecular); o (2) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (1610374) de *BioRad* —para el seguimiento de proteínas de alto peso molecular—. Como control de carga se utilizó: (1) para la fracción proteica total y citosólica el anticuerpo primario anti-GADPH; y (2) para la fracción proteica nuclear el anticuerpo primario anti-TBP. Las referencias, casa comercial y las diluciones para los anticuerpos primarios usados, se resumen en la tabla 2.4 del *Capítulo 2*.

Preparación de las secciones cardíacas y medida del tamaño de infarto

La preparación de las secciones cardíacas se realizó siguiendo el procedimiento experimental descrito en el *Capítulo 2*. La longitud y área de infarto del VI se analizó mediante el uso del software *ImageJ 1.34* y se calculó como el

porcentaje del tamaño del infarto circunferencial (tamaño del IM) dividido por el tejido total del VI: % del tamaño del infarto = (área del infarto/área total del VI) x100.

Inmunohistoquímica

Secciones de tejido cardíaco de 3 µm de grosor e incluidas en parafina se adhirieron a un portaobjetos pre-tratado con poli-L-lisina. Las secciones fueron desparafinadas y pre-tratadas con Dako PT Link a 97 °C durante 20 min usando el kit comercial EnVision™ FLEX, High pH, (Dako, Dinamarca) siguiendo el protocolo experimental descrito (véase *Capítulo 2*). Para la determinación del nivel de expresión de Gal-3, secciones rehidratadas de tejido del borde fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal contra Gal-3 (MA1-940; *Thermo Fisher Scientific*) a una dilución 1:400. El tiempo y las condiciones experimentales de incubación con el anticuerpo contra CD-68 fueron diferentes. En este caso, las secciones se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal contra CD-68 (MA5-13324, *Thermo Fisher Scientific*) a una dilución 1:200. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado que se usa a una dilución 1:200. Las proteínas de interés fueron identificadas mediante reacción con 2-2´diaminobencidina (DAB). La inmunotinción positiva se identificó como un precipitado citoplasmático de color marrón oscuro. Se obtuvieron imágenes de alta resolución a través de un microscopio Leica SN400F (*Leica Microsystems, Gateshead, Reino Unido*). La expresión de Gal-3 y CD-68 se expresó como *ratio* entre área marcada del miocardio/área total y referida al grupo control.

Medida de la actividad enzimática mitoNox

La actividad NADPH oxidasa 4 mitocondrial se estudió en la fracción mitocondrial aislada de la zona del borde del VI infartado o de células tratadas y células no tratadas por quimioluminiscencia. La reacción se basa en la cuantificación de la luz que emite lucigenina cuando es reducida por el sustrato NADPH¹⁴⁷ a una temperatura de 25 °C. El ensayo comienza con la adición de lucigenina 25 µM y NADPH 100 µM a 0,2 ml de medio de reacción compuesto por: KH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, EGTA 1 mM, sacarosa 150 mM y 200 µg de proteínas de la fracción mitocondrial. Los fotones emitidos son captados cada 4 min usando un lector de placas modelo FLUOstar[®] Omega (*BMG Labtech*). Para calcular la actividad mitoNox, cuantificamos la pendiente del segmento lineal de la gráfica obtenida y se representa respecto a la pendiente obtenida en el ensayo control. La ausencia de NADPH en el medio de reacción previno la activación de la enzima.

Medida de la actividad enzimática PKCα

Las muestras de tejido procedente de la zona borde del VI infartado o de cardiomiocitos fueron lavadas tres veces con DPBS a 4 °C antes de iniciar el procedimiento de lisis y posterior almacenamiento a -80 °C. La actividad PKCα específica se midió en 30 µg de lisado proteico total, usando el kit comercial con referencia ab139437 (*Abcam, Cambridge, Reino Unido*) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se muestran como media ± el error estándar de la media.

Actividad enzimática AMPK

La actividad AMPK se midió mediante el uso del kit comercial *AMPK KinEASE FP Fluorescein Green Fluorescence Polarization* y siguiendo el protocolo experimental descrito por el fabricante (*Millipore, Billerica, EEUU*). Los ensayos se realizan por triplicado y los datos son mostrados como media \pm el error estándar de la media.

Generación de un modelo *Knockdown* mediante el uso de RNA de interferencia de pequeño tamaño (*siRNA*).

Con el objetivo de silenciar la expresión endógena de AMPK α 1 y/o AMPK α 2 se sembraron $\sim 2 \times 10^5$ cardiomiocitos/pocillo en una placa de 6 pocillos *Flex I* —en las condiciones de cultivo descritas en el *Capítulo 2*— 2 días antes de iniciar el protocolo de silenciamiento. Se utilizó una combinación de tipo comercial compuesta por 3 siRNAs dirigidos contra secuencias distintas del mismo ARNm, lo que permite: (1) una mayor eficiencia de reducción de los niveles de ARNm diana, y (2) un menor efecto *off-target*. De forma específica, los cardiomiocitos fueron transfectados con la combinación siAMPK α 1 (sc-270142) y/o con la combinación siAMPK α 2 (sc-155985), adquiridas de *Santa Cruz Biotechnology Inc.* Como control de la transfección, otros ensayos fueron realizados en presencia de la secuencia control (siRNA-Ctrl): 5'-AUUUAACUUCUGGUGACGAUACU-3'.

Inicialmente se valoró la eficiencia de cada una de las combinaciones adquiridas así como de cada uno de sus componentes individuales sobre el nivel de ARNm de AMPK α 1 y de AMPK α 2. Las secuencias individuales de la combinación siAMPK α 1 fueron: sc-270142A, sc-270142B, y sc-270142C; y para

la combinación siAMPK α 2: sc-155985A, sc-155985B, y sc155985C; todas adquiridas también de *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*

Un ensayo paralelo demostró además la especificidad de cada una de las combinaciones adquiridas sobre su diana. De hecho, la transfección de cardiomiocitos con la combinación citada como siAMPK α 1 no tuvo efecto sobre la expresión de AMPK α 2 y *viceversa* (véase Fig. 3.11). Otros siRNAs diseñados para bloquear la expresión endógena de la quinasa p70S6K con referencias 6566 y 6572, fueron adquiridos de *Cell Signaling Technology, Inc.*, y se transfectaron en combinación sobre cardiomiocitos en cultivo.

A modo de resumen, los cardiomiocitos sembrados en placas de cultivo *Flex I* se transfectaron usando Lipofectamina 2000 con: (1) la combinación siAMPK α 1; (2) la combinación siAMPK α 2; (3) una mezcla de las combinaciones comerciales siAMPK α 1+siAMPK α 2; ó (4) la secuencia control siRNA-Ctrl, siguiendo las indicaciones del fabricante. El procedimiento experimental de transfección se detalla en el *Capítulo 2* de esta memoria. Las células transfectadas se mantienen 48 h en medio de cultivo completo (cultivo primario), antes de ser lavadas tres veces con DPBS a 37 °C. A continuación, las células se mantuvieron en ausencia de suero otras 24 h en presencia o en ausencia de metformina, antes de iniciar el protocolo de deformación celular. Siguiendo un protocolo de transfección similar, y con el objetivo de silenciar la expresión endógena de la quinasa p70S6K, los cardiomiocitos fueron transfectados con la combinación de los dos siRNAs citados anteriormente.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó usando el método del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)¹⁴⁸. Brevemente, se aspiró el medio

MEM procedente de cardiomiocitos sometidos a deformación celular o de controles antes de lavar tres veces con DPBS a 37 °C. El potencial redox de las células se evaluó adicionando 300 µl de MTT 1 mg/ml e incubando después durante 1 h a 37 °C en un incubador de CO₂ —incubación que se realizó sin someter a las células a deformación celular—. Las mitocondrias de las células viables, reducen el reactivo de MTT a formazano, que aparece de color púrpura. A continuación, el precipitado de formazano se disuelve añadiendo 250 µl de Me₂SO agitando la placa durante 5 min a temperatura ambiente. El ensayo colorimétrico —protocolo para estudiar la reducción del MTT— se detalla en el *Capítulo 2*.

Actividad de las Caspasas -3 y -9

Las actividades de las Caspasas -3 y -9 se evaluaron utilizando los kits comerciales: (1) Ensayo de actividad de la Caspasa 3 (5723); y (2) Ensayo de actividad de la Caspasa 9 (ab65608), obtenidos de *Cell Signaling Technology*[®] y *Abcam*, respectivamente, y siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Peroxidación lipídica

El manolilaldehído (MDA), el principal producto de la peroxidación lipídica, se cuantificó a través de la reacción con el ácido tiobarbitúrico debido a la formación de un aducto de color rojo¹⁴⁹. El procedimiento experimental se describe en el *Capítulo 2*. Brevemente, tejido procedente del VI de ratas infartadas y de ratas no infartadas (~30 mg) se lavó tres veces con DPBS frío y se homogeneizó en 0,4 ml de KCl 1,15 % (p/v), antes de añadirle el medio de solubilización compuesto por: SDS 0,4 % (p/v), ácido acético (pH 3,5) 7,5 % (v/v) y ácido tiobarbitúrico 0,3 % (v/v). La muestra se agitó de forma vigorosa y posteriormente se calentó en baño termostatzado a 95 °C durante 2 h. Después de enfriar

a temperatura ambiente, cada muestra se mezcló con n-butanol y piridina (15:1. v/v), se agitó enérgicamente y se centrifugó a 14.500 xg durante 10 min a temperatura ambiente. La absorbancia del sobrenadante resultante se midió a 532 nm en un lector de placas Infinite[®] M200Pro. La cuantificación de MDA en cada una de las muestras analizadas se llevó a cabo mediante un diagrama de calibración utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano en el rango de 0 a 100 μ M como estándar de concentración.

Medida de la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó utilizando el kit comercial (N^o Cat., 6813) de *Cell Signaling Technology*[®]. La incorporación de BrdU en el ADN celular durante la proliferación celular se detectó a 450 nm utilizando un lector de placas Infinite[®] M200Pro (*Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza*). Los datos se representan respecto al ensayo control.

Niveles de especies con oxígeno reactivo

Las especies con oxígeno reactivo inducidas por la deformación celular se evaluaron usando la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) de acuerdo con el procedimiento experimental descrito por Lax y cols¹⁵⁰. Brevemente, 30 min antes de terminar el protocolo de deformación celular, a los cardiomiocitos sembrados en placas de cultivo *Flex I* de 6 pocillos, se les adicionó 10 μ M de DCFDA en medio Tyrode y se les mantuvo 30 min a 37 °C (véase *Capítulo 2*). El exceso de sonda se retiró posteriormente lavando el cultivo tres veces con DPBS a temperatura ambiente antes de incubar otros 30 min a 25 °C. Se utilizó un lector de placas FLUOstar[®] Omega con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. La

acumulación de DCF se expresa en unidades arbitrarias (u.a.) con respecto al ensayo control en ausencia de deformación.

Determinación de la concentración extracelular de Galectina-3

La concentración de Gal-3 tanto en suero como en el sobrenadante celular, se midieron usando los kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de RayBiotech Life (*Parkway Lane Suite; EEUU*) con referencia P08699. El blanco, los estándares diluidos y las muestras se adicionaron a una placa de 96 pocillos que se mantuvo a temperatura ambiente durante 2,5 h. La absorbancia se determinó a 450 nm usando un lector de placas CLARIOstar[®], (BMG Labteck, Ortenberg, Alemania). En ambos casos, la precisión intraensayo y la precisión entre ensayos fueron inferiores al 10 %.

Análisis estadístico

Los datos se han presentado como media \pm error estándar de la media. La normalidad se ha evaluado utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Para estudiar las diferencias globales entre grupos se ha utilizado el test de Kruskal-Wallis y, para comparaciones múltiples con respecto al grupo control, la prueba de Siegel-Castellan. Las correlaciones se estudiaron de forma no paramétrica solo en los animales infartados utilizando el método de Kendall. Todos los análisis han sido realizados con el software estadístico SPSS versión 22 (*IBMC Corp., Armonk, NY, EEUU*) y los gráficos con la versión 11.0 del software SigmaPlot. Se han considerado significativos los p-valores menores a 0,05.

RESULTADOS

Estudio del efecto protector de metformina sobre el miocardio infartado

La evolución del tejido cardíaco y el tamaño del IM se muestran en la figura 3.1, panel a; las áreas centrales aparecen de color blanco pálido con una congestión de sangre en la circunferencia tras 1 semana del infarto, que fue seguida por la formación de una cicatriz densa tras 4 semanas del IM. La terapia con metformina se asoció con una reducción significativa del tamaño de IM después de 1 semana de la ligación de la coronaria. El efecto protector fue mayor cuando el tiempo de incubación se incrementó a 4 semanas (Fig. 3.1, panel a). La presencia de IM se confirmó mediante la realización de medidas ecocardiografías seriadas y programadas a las 24 h de la ligación de la coronaria (Fig. 3.1, panel b; imagen superior) y tras 4 semanas de la inducción del IM (Fig. 3.1, panel b; imagen inferior). El tamaño de la cicatriz (citado en tabla 3.1 como TIM) medida a las 4 semanas de IM ($27.2 \pm 5 \%$) no fue significativamente diferente del evaluado tras 24 h de infarto ($27.4 \pm 3 \%$). Las ratas tratadas con metformina (grupo IM+Met) durante 4 semanas mostraron una reducción significativa del tamaño de infarto ($15.4 \pm 7 \%$), en comparación con el valor obtenido en los mismos animales, pero tras 24 h de infarto ($31.2 \pm 6 \%$) (Tabla 3.1).

Cabe señalar que en el grupo citado como IM+Met, no se observaron signos de IM en un total de seis ratas a las 4 semanas, mientras que el IM se redujo en un 50 % en dos ratas, un 25 % en una rata, y finalmente en otra rata el tamaño de infarto evaluado tras 4 semanas fue similar al observado después de 24 h de ligación. En el grupo con IM, la función cardíaca se vio significativamente comprometida tanto a las 24 h como a las 4 semanas.

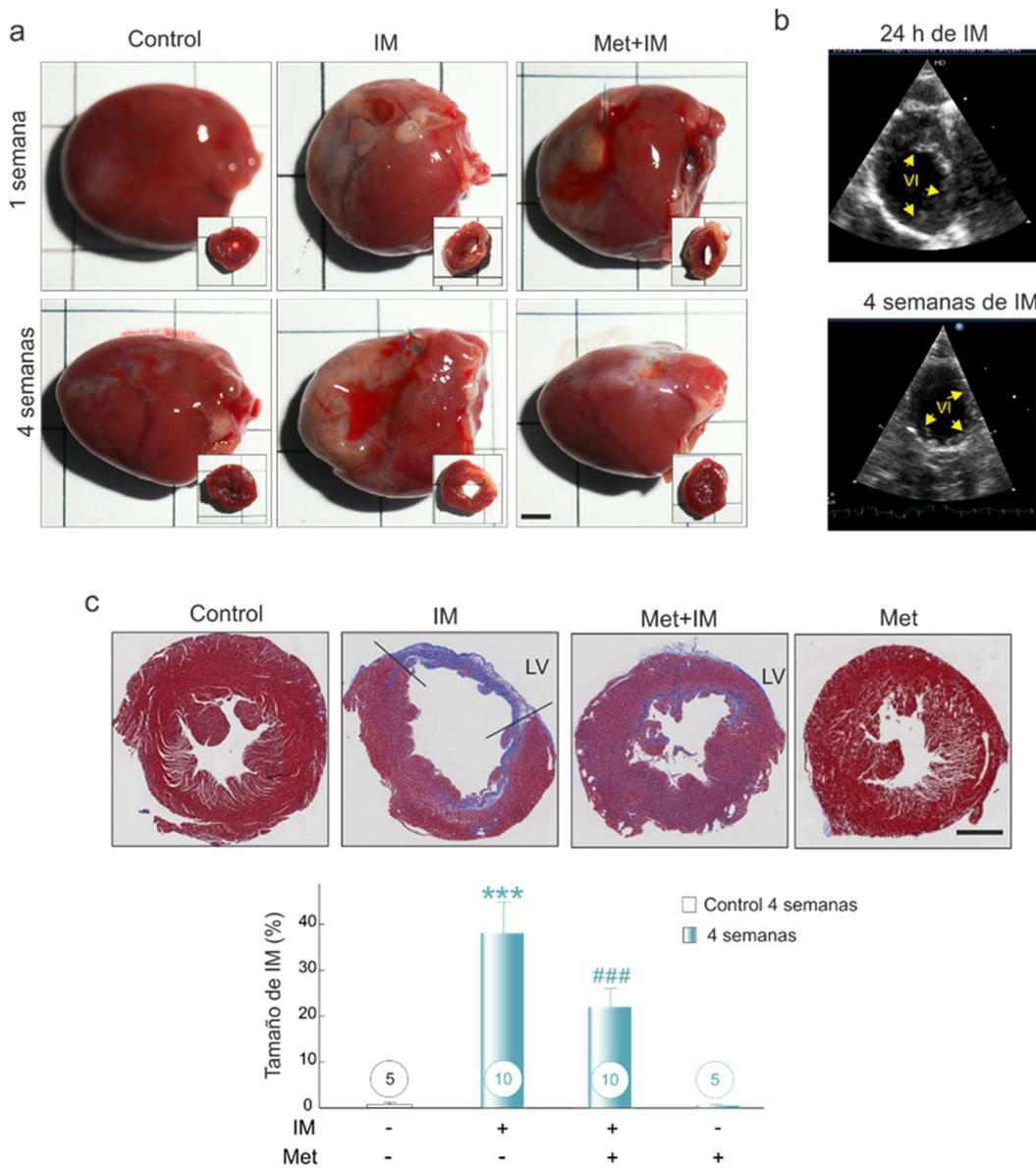


Figura 3.1. Efecto de metformina sobre el tamaño del IM. (a) Imágenes representativas de un corazón de rata completo y secciones del VI infartado captadas a 1 ó 4 semanas después de la cirugía y tratadas o no, con metformina. (b) Ecocardiogramas bidimensionales de eje corto del VI de ratas infartadas. El panel superior corresponde a 24 h de infarto—se muestra un adelgazamiento de la pared e hiperecogenicidad del miocardio (flechas amarillas). Finalmente, el panel inferior corresponde a ratas con IM de 4 semanas de evolución —el miocardio infartado aparece delgado e hiperecoico (flechas amarillas) con una cicatriz en la pared libre del VI. (c) Secciones transversales de miocardio teñido con tricrómico de Masson para cuantificación del tamaño de IM a 4 semanas. Las áreas ricas en colágeno (cicatriz) aparecen en color azul mientras que el miocardio sano aparece de color rojo. La barra de escala equivale a 0,5 cm. (Inferior). Cuantificación del tamaño del infarto (porcentaje del tamaño del infarto circunferencial (tamaño

del IM) dividido por el tejido total del VI). En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo IM.

IM: infarto de miocardio; Met: metformina; VI: ventrículo izquierdo.

Tabla 3.1. Estudio eco-cardiográfico a ratas infartadas de 4 semanas de evolución.

<i>Parámetros</i>	<i>Control (n=10)</i>		<i>IM (n=10)</i>		<i>IM+Met (n=10)</i>	
	<i>24 h</i>	<i>4 semanas</i>	<i>24 h</i>	<i>4 semanas</i>	<i>24 h</i>	<i>4 semanas</i>
<i>Peso (g)</i>	239±13	310±22*	232±15	309±39*	269±24	340±29*
<i>FC (latidos/min)</i>	250±24	235±27*	345±56	200±50*	279±42	204±24*
<i>VDFVI (ml)</i>	0,20±0,01	0,36±0,03	0,22±0,02	0,49±0,05*	0,27±0,04	0,50±0,03*
<i>VSFVI (ml)</i>	0,10±0,02	0,17±0,04	0,14±0,06	0,31±0,01*	0,17±0,02	0,26±0,04*#
<i>FEVI (%)</i>	50±5	52±3	36±5	36±7	37±4	49,3±6*#
<i>ACC (%)</i>	45±9	45±5	35±4	36±3	40±5	46±2*#
<i>IS</i>	1,50±0,50	1,70±0,10	1,80±0,05	1,40±0,07	1,61±0,05	1,70±0,1*#
<i>TIM (%)</i>	----	----	27,40±3	27,20±5	31,20±6	15,40±7*#

Tabla 3.1. *Efecto de metformina sobre diferentes parámetros ecocardiográficos en ratas a 24 h y 4 semanas después de la inducción del IM y en ratas control.* Los datos se muestran como el valor medio \pm error estándar de la media. FC: Frecuencia cardíaca; ACC: área de acortamiento circunferencial; VDFVI: volumen diastólico final del ventrículo izquierdo; VSFVI: volumen sistólico final del ventrículo izquierdo; FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo; IS: índice de esfericidad; TIM: Tamaño del infarto de miocardio; * $p < 0,05$; se compara la magnitud de la diferencia de medias que hay entre los parámetros evaluados tras 24 h y 4 semanas, dentro de cada uno de los grupos (control, IM e IM+Met). # $p < 0,05$; se compara las diferencias medias de cada uno de los parámetros evaluados tras 24 h y 4 semanas, entre el grupo IM+Met y el grupo IM.

El tratamiento con metformina mejoró la función del VI tras 4 semanas de IM, preservando la función sistólica —según el análisis de los parámetros eco-cardiográficos evaluados: FEVI, ACC y IS (Tabla 3.1) ($p < 0,05$)—. Sin embargo, cuando analizamos y comparamos los datos obtenidos en el grupo IM+Met —tras

24 h y los obtenidos después de 4 semanas de IM—, no encontramos diferencias significativas. Resultados similares se observaron cuando se evaluó el efecto de metformina sobre el tamaño del IM mediante análisis histológico (Fig. 3.1, panel c).

Al estudiar el efecto de la terapia con metformina sobre la fibrosis cardíaca adversa en la zona del borde del VI infartado, de nuevo evaluamos una mejora significativa en todos los parámetros analizados. En este sentido, mientras que el IM de 1 y 4 semanas de evolución estuvo asociado con un incremento significativo de los niveles de ARNm de TGF- β , smad-2 y smad-3 (Fig. 3.2, paneles a-c), la terapia con metformina por 4 semanas se asoció con una reducción significativa de los niveles de todos los marcadores analizados: TGF- β , smad-2 y smad-3 ($p < 0.001$, para todos los casos).

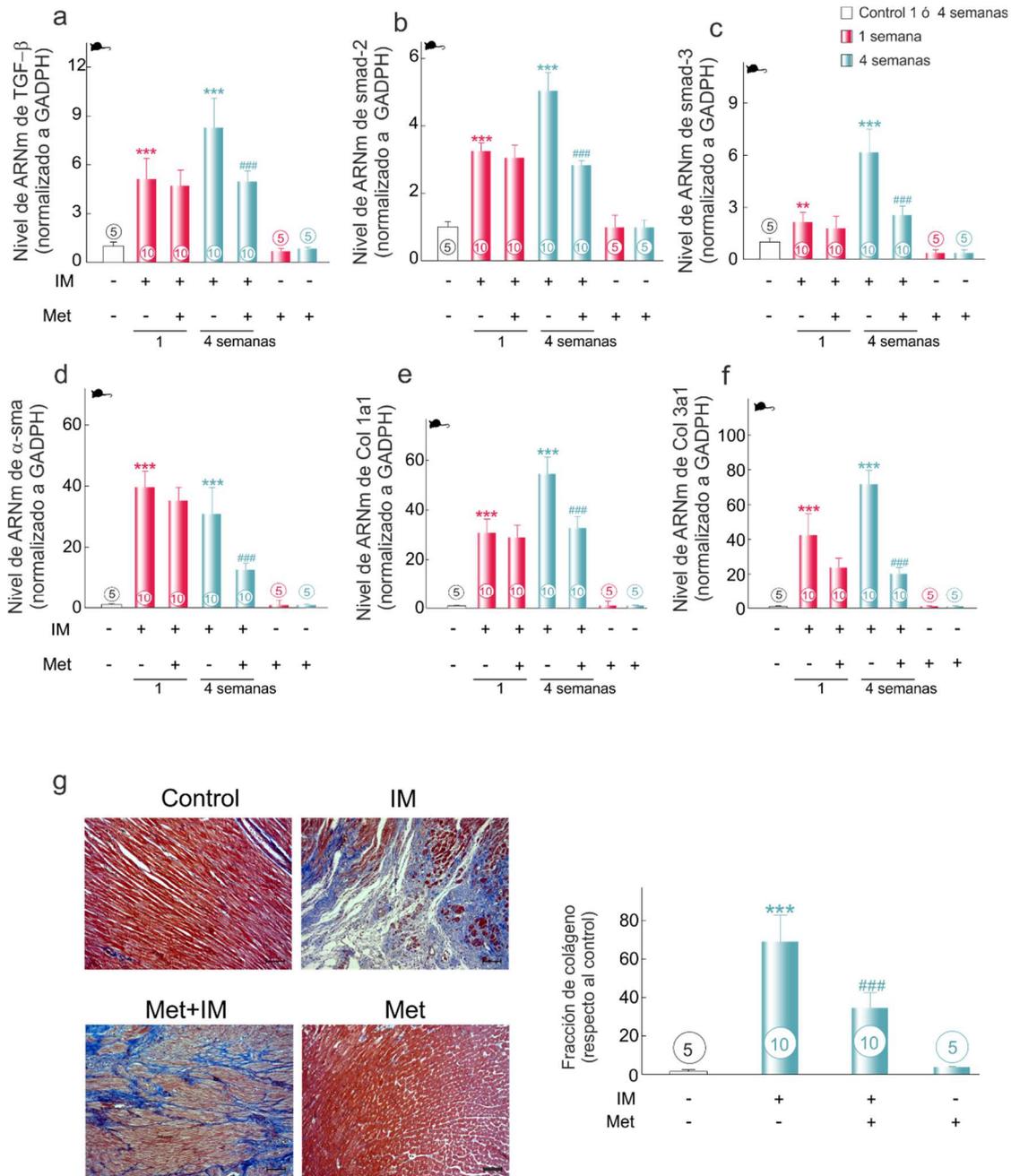


Figura 3.2. *Metformina* previene la fibrosis cardíaca adversa en la zona del borde del VI infartado. (a-f) Niveles de ARNm de diferentes marcadores fibróticos: TGF-β, smad-2 y smad-3, α-sma, col 1a1 y col 3a1; los niveles de ARNm para cada uno de los marcadores evaluados fueron normalizados respecto a los niveles de ARNm de GADPH y representados respecto al ensayo control. (g) (izquierda) Secciones representativas de cortes transversales de la zona del borde del VI infartado teñidas con tricrómico de Masson tras 4 semanas de IM. La barra de escala que aparece en la imagen inferior derecha equivale a 100 μm; (derecha) Análisis cuantitativo de la fibrosis intersticial (el nivel de contenido en colágeno se evaluó como porcentaje del área de sección teñida en color azul normalizada al control). En la parte inferior de cada cilindro se detalla

el número de animales analizados por grupo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo IM. Col: colágeno; GADPH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Otras abreviaturas se describen en el apartado correspondiente de esta memoria.

Nuestros datos también mostraron un incremento en el nivel de ARNm de α -sma, Col 1a1 y Col 3a1 tras 1 semana de IM ($p < 0,001$, en todos los casos); niveles que permanecieron elevados después de 4 semanas ($p < 0,001$, en todos los casos) (Fig. 3.2, paneles d-f). De nuevo, el tratamiento con metformina durante 4 semanas se asoció con una disminución significativa del nivel de ARNm de todos los marcadores evaluados ($p < 0,001$, en todos los casos), pero no cuando el tratamiento se administró solo durante 1 semana. En ausencia de IM, y en comparación con el grupo tratado con placebo, el tratamiento con metformina no indujo ningún cambio en el nivel de ARNm de los marcadores fibróticos evaluados (Fig. 3.2, paneles a-f). En paralelo, el marcaje de la zona del borde del VI infartado con tricrómico de Masson mostró que la fracción de volumen de colágeno en esta zona, disminuyó significativamente cuando metformina fue administrada por un periodo total de 4 semanas ($p < 0,001$) (Fig. 3.2, panel g).

Cuando evaluamos el efecto preventivo de la terapia con metformina sobre la fibrosis adversa en la zona infartada del VI (Fig. 3.3), los resultados fueron similares a los obtenidos y previamente descritos en la zona del borde del VI infartado. De hecho, mientras que a 1 y 4 semanas después del IM los niveles de TGF- β , smad-2 y smad-3 aumentaron de forma significativa (Fig. 3.3, paneles a-c), la terapia con metformina por 4 semanas se asoció de nuevo con una reducción significativa de los niveles de todos los marcadores analizados: TGF- β , smad-2 y smad-3 ($p < 0.001$, para todos los casos).

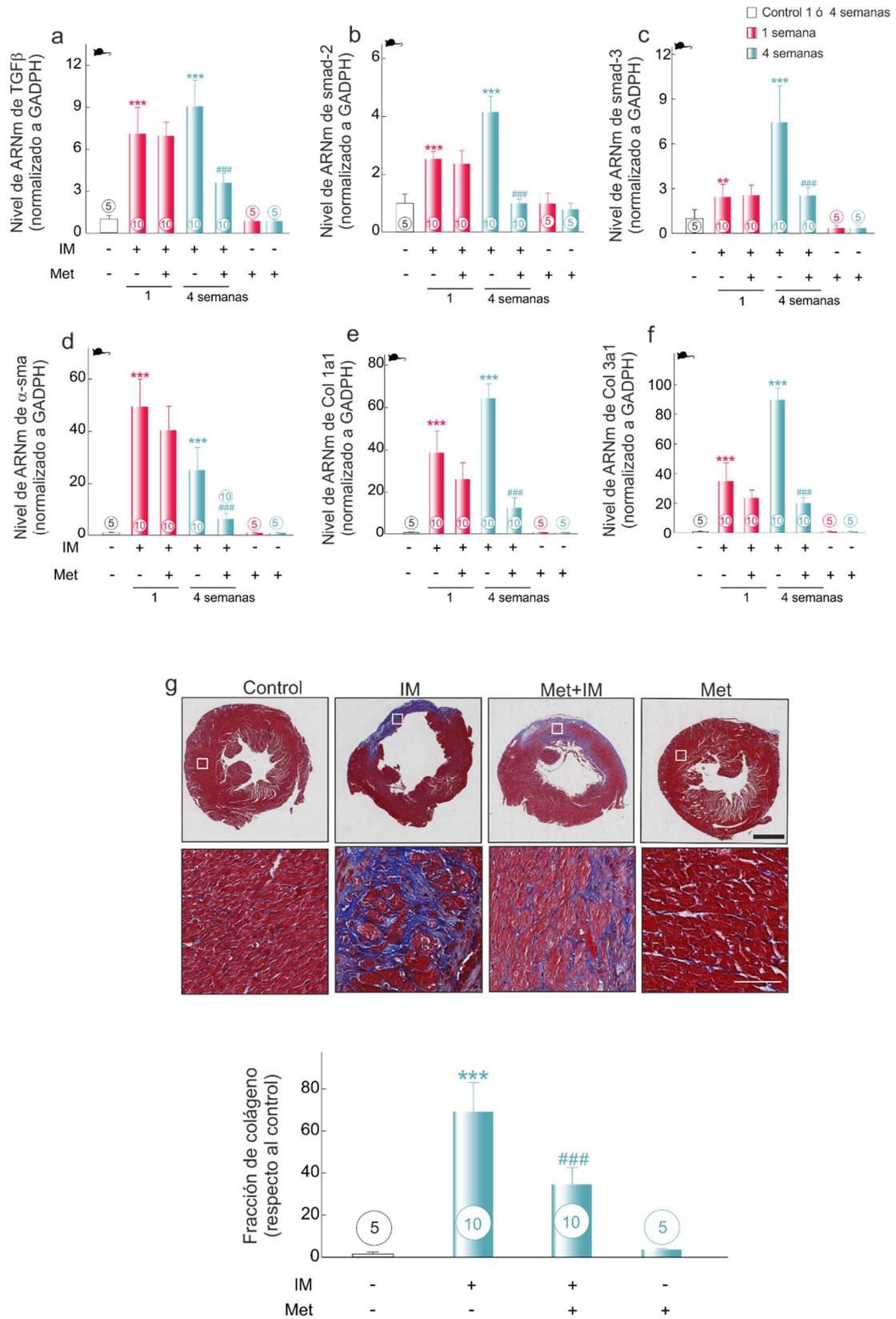


Figura 3.3. *Metformina* previene la fibrosis adversa en la zona infartada del VI. (a-f) Niveles de ARNm de diferentes marcadores fibróticos: TGF-β, smad-2 y smad-3, α-sma, col1a1

y col 3a1; los niveles de ARNm para cada uno de los marcadores evaluados fueron normalizados respecto a los niveles de ARNm de GAPDH y se representaron respecto al ensayo control. (g) (Arriba) Secciones representativas de cortes transversales teñidos con tricrómico de Masson (4 semanas tras IM); (Abajo) Análisis cuantitativo de la fibrosis intersticial (el nivel de contenido en colágeno se evaluó como porcentaje del área de sección teñida en color azul normalizada al control). Mientras que la barra de escala que aparece en el panel superior derecho equivale a 0,5 cm, la barra que se muestra a este lado, pero en el panel inferior equivale a 100 μ m. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo IM. Las abreviaturas que aparecen se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

De forma similar, valoramos un incremento significativo en el nivel de ARNm de α -sma, Col 1a1 y Col 3a1 tras 1 semana de IM ($p < 0,001$); niveles que permanecieron elevados también después de 4 semanas ($p < 0,001$) (Fig. 3.3, paneles d-f). De nuevo, el tratamiento con metformina se asoció con una disminución significativa del nivel de ARNm de todos los marcadores evaluados ($p < 0,001$) solo cuando el tiempo de tratamiento fue prolongado por 4 semanas (Fig. 3.3, paneles a-f). En paralelo, el marcaje de la zona infartada del VI con tricrómico de Masson mostró que la fracción de volumen de colágeno en esta zona, disminuyó de forma significativa cuando metformina fue administrada por un periodo total de 4 semanas ($p < 0,001$) (Fig. 3.3, panel g).

A continuación, evaluamos el nivel de expresión de Gal-3 en la zona del borde del VI infartado por PCR cuantitativa, western blot e inmunohistoquímica (Fig. 3.4). En comparación con el grupo control, la evolución del IM por 1 y 4 semanas indujo un incremento significativo del nivel ARNm y proteína de Gal-3 ($p < 0,001$, en todos los casos). Nuestros datos demostraron que el tratamiento con metformina durante 4 semanas tras el IM es capaz de reducir de forma significativa el nivel de ARNm de Gal-3 ($p < 0.001$) (Fig. 3.4, panel a). El análisis de los resultados obtenidos por western blot confirmó el efecto preventivo de metformina. De hecho, en comparación con el grupo IM, observamos que el nivel de Gal-3 en el borde se redujo de forma significativa cuando los animales fueron tratados con metformina por 4 semanas ($p < 0,001$) (Fig. 3.4, panel b). Todos estos resultados fueron también confirmados *in situ* por inmunohistoquímica (Fig. 3.4, paneles c, d).

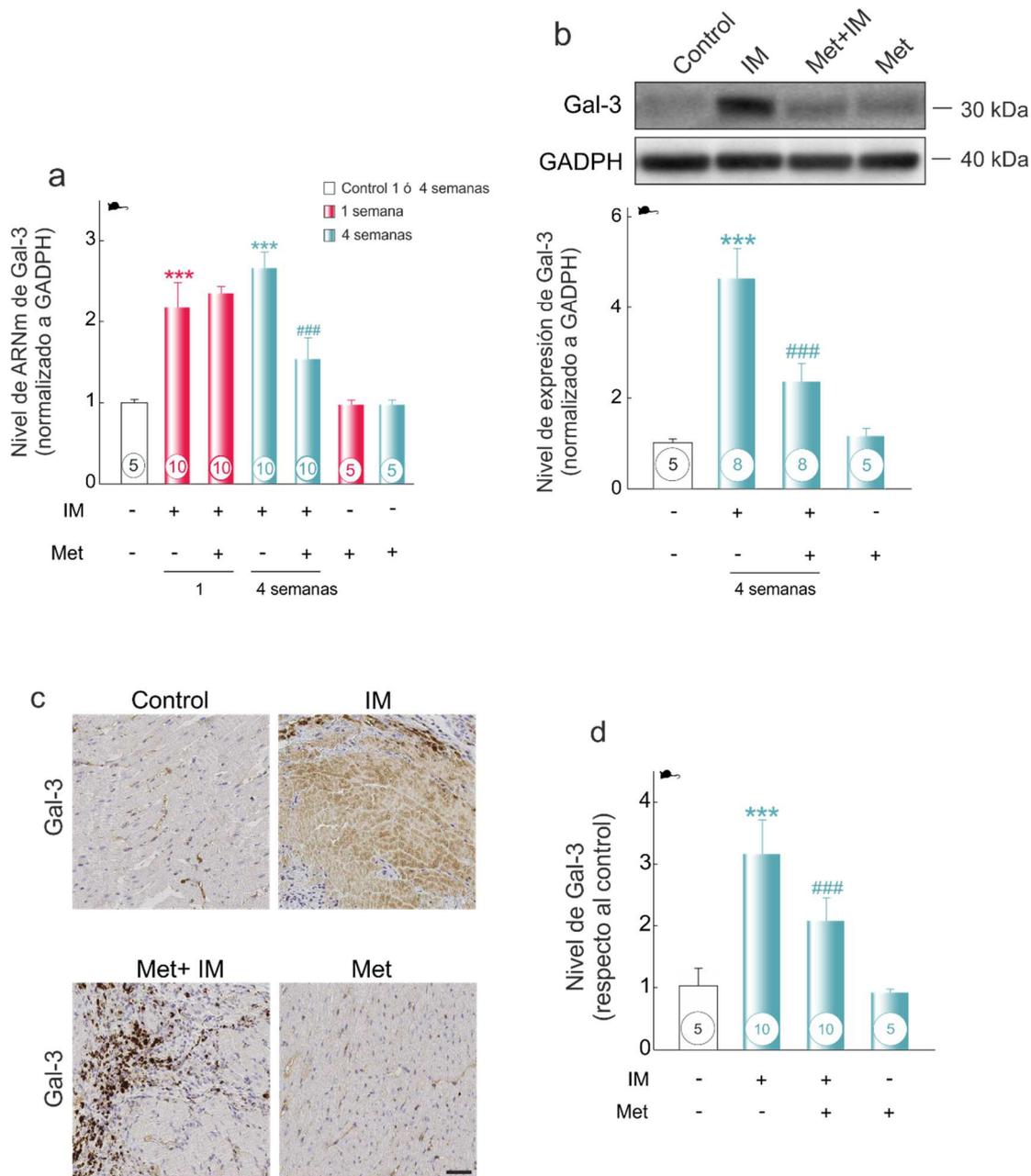


Figura 3.4. *Metformina modula la expresión de Gal-3 en la zona del borde del VI infartado.* (a) Nivel de ARNm de Gal-3; los datos han sido normalizados al nivel de ARNm de GADPH y representados respecto al ensayo control. (b) Imagen representativa de western blot y análisis de la expresión de Gal-3. (c) Imágenes representativas de inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de Gal-3. La barra de escala que se muestra en la imagen inferior derecha equivale a 25 μ m. (d) Análisis cuantitativo de la expresión de Gal-3 en la zona del borde normalizado al control. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control; ### $p < 0,001$ comparado

con el grupo IM. Gal-3: galectina-3. Otras abreviaturas aparecen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Cuando evaluamos su expresión, pero en la zona infartada del VI por PCR cuantitativa, western blot e inmunohistoquímica, de nuevo los resultados fueron similares a los obtenidos en la zona del borde. De hecho, independientemente del método empleado, la expresión de Gal-3 aumento de forma significativa después de 1 y 4 semanas de IM ($p < 0,001$) (Fig. 3.5) y el tratamiento con metformina por 4 semanas disminuyó el nivel de ARNm y su expresión. Estos resultados fueron también confirmados por inmunohistoquímica (Fig. 3.5, panel c). Además, nuestros datos determinan una alta infiltración de macrófagos, que fue prevenida también cuando a los animales se les trató con metformina durante 4 semanas tras el IM ($p < 0,001$) (Fig. 3.5, panel c).

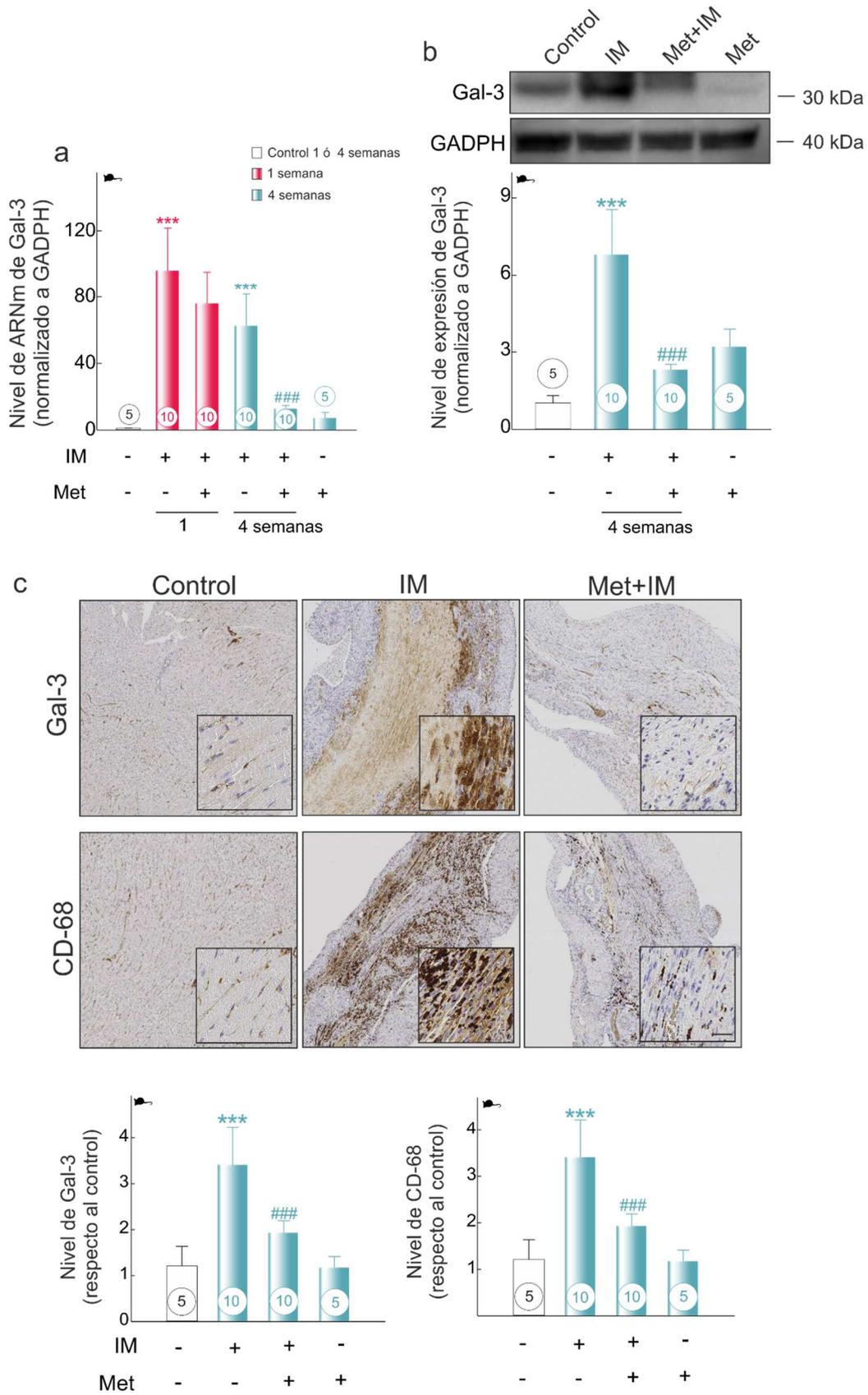


Figura 3.5. Metformina modula la expresión de Gal-3 en la zona infartada del VI. (a) Nivel de ARNm de Gal-3; los datos se normalizan respecto al nivel de ARNm de GAPDH y se

expresan respecto al ensayo control. (b) Imagen representativa de western blot de la expresión de Gal-3. (c) (Arriba) Imagen por inmunohistoquímica de la expresión de Gal-3 y CD-68. La barra de escala que aparece en la imagen inferior derecha equivale a 1 mm. (abajo) Análisis cuantitativo del volumen de Gal-3 y CD-68 normalizado al ensayo control. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control; ### $p < 0,001$ comparado con el grupo IM. Las abreviaturas aparecen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

El aumento en el nivel y actividad de AMPK por metformina previene la activación de las enzimas mitoNox y PKC α tras un IM

Con el objetivo global de caracterizar la ruta molecular a través de la cual metformina es capaz de prevenir la fibrosis cardiaca tras el IM en primer lugar, se estudió si la dosis de metformina usada en este estudio era capaz de incrementar el estado de fosforilación, el nivel de ARNm así como la actividad de las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del AMPK, en la zona del borde del VI infartado. La modulación espaciotemporal de ambas isoformas se analizó mediante PCR cuantitativa, transferencia western y ensayos de espectrofluorimetría (Fig. 3.6, paneles a-d). Aunque el nivel de ARNm de AMPK $\alpha 1$ y $\alpha 2$ no cambió en la zona borde después de 1 semana de IM, mostró una tendencia creciente pero no significativa a las 4 semanas de IM. Por el contrario, cuando los animales se trataron con metformina durante 4 semanas tras el IM los niveles de ARNm de ambas isoformas incrementaron de forma significativa ($p < 0,001$) (Fig. 3.6, paneles a, b). En línea con estos hallazgos, la terapia con metformina —y en comparación con el grupo IM— incrementó de forma significativa el estado de fosforilación de AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ en su sitio de activación Thr¹⁷², aumentando también su actividad tras 4 semanas de IM ($p < 0.001$, en todos los casos) (Fig. 3.6, paneles c, d).

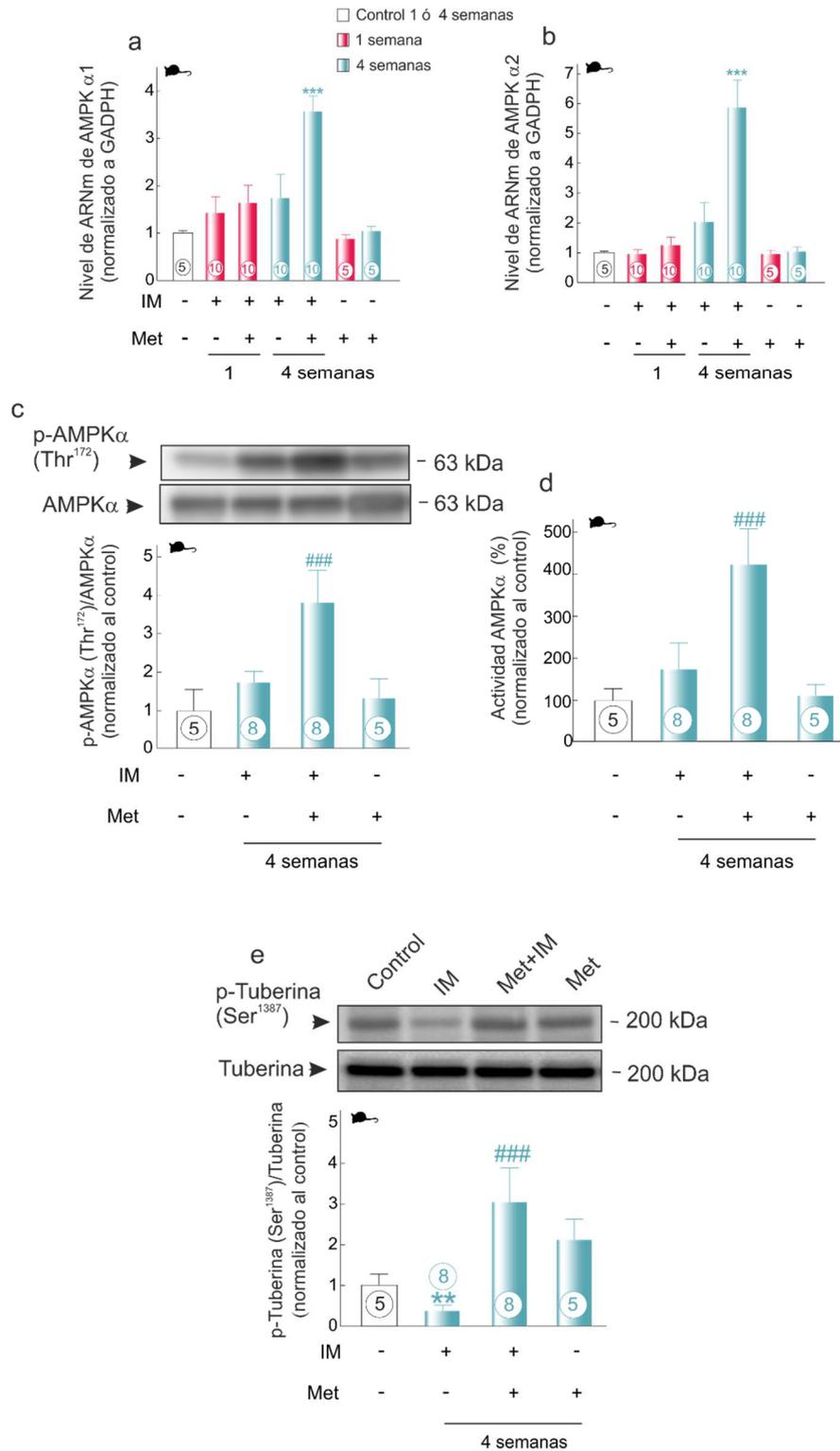


Figura 3.6. La terapia con metformina durante 4 semanas tras el IM incrementa la actividad de AMPK y aumenta el nivel de fosforilación de tuberina. (a, b) Niveles de ARNm de AMPK α 1 y α 2; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GAPDH y se expresan con

respecto al ensayo control. (c) Imagen representativa de western blot y análisis cuantitativo de la relación p-AMPK(Thr¹⁷²)/AMPK. (d) Actividad AMPK. (e) Imagen representativa de western blot y análisis de la relación p-tuberina (Ser¹³⁸⁷)/tuberina. Los datos se expresan respecto al control. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. **p<0,01, *** p<0,001 comparado con el grupo control; ### p<0,001 comparado con el grupo IM. AMPK: proteína quinasa activada por AMP. Otras abreviaturas aparecen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

En esta ventana de tiempo, nuestros datos mostraron también una disminución significativa del estado de fosforilación del residuo de activación Ser¹³⁸⁷ de la proteína tuberina en la zona del borde del VI infartado (p<0.01), un efecto que fue revertido cuando la terapia con metformina se prolongó hasta 4 semanas después del IM (p<0.001) (Fig. 3.6, panel e).

En experimentos paralelos, también evaluamos el nivel de ARNm, niveles proteicos y las actividades enzimáticas de mitoNOX y de la enzima PKC α (Fig. 3.7, paneles a-f). En la zona del borde del VI infartado, el nivel de ARNm y la actividad enzimática de la enzima mitoNOX, en comparación con el grupo control, aumentó tras 1 semana y permaneció elevada después de 4 semanas de IM (p<0,001) (Fig. 3.7, panel a). La terapia con metformina, se asoció con una disminución del nivel de ARNm (Fig. 3.7, panel a) y actividad de la enzima mitoNOX (Figura 3.4, panel b) después de 4 semanas de IM (p<0,001, en ambos casos). El análisis de los datos obtenidos por western blot, confirmó la disminución del nivel de expresión de mitoNox cuando metformina se administra durante 4 semanas tras el IM (p<0,001) (Fig. 3.7, panel c).

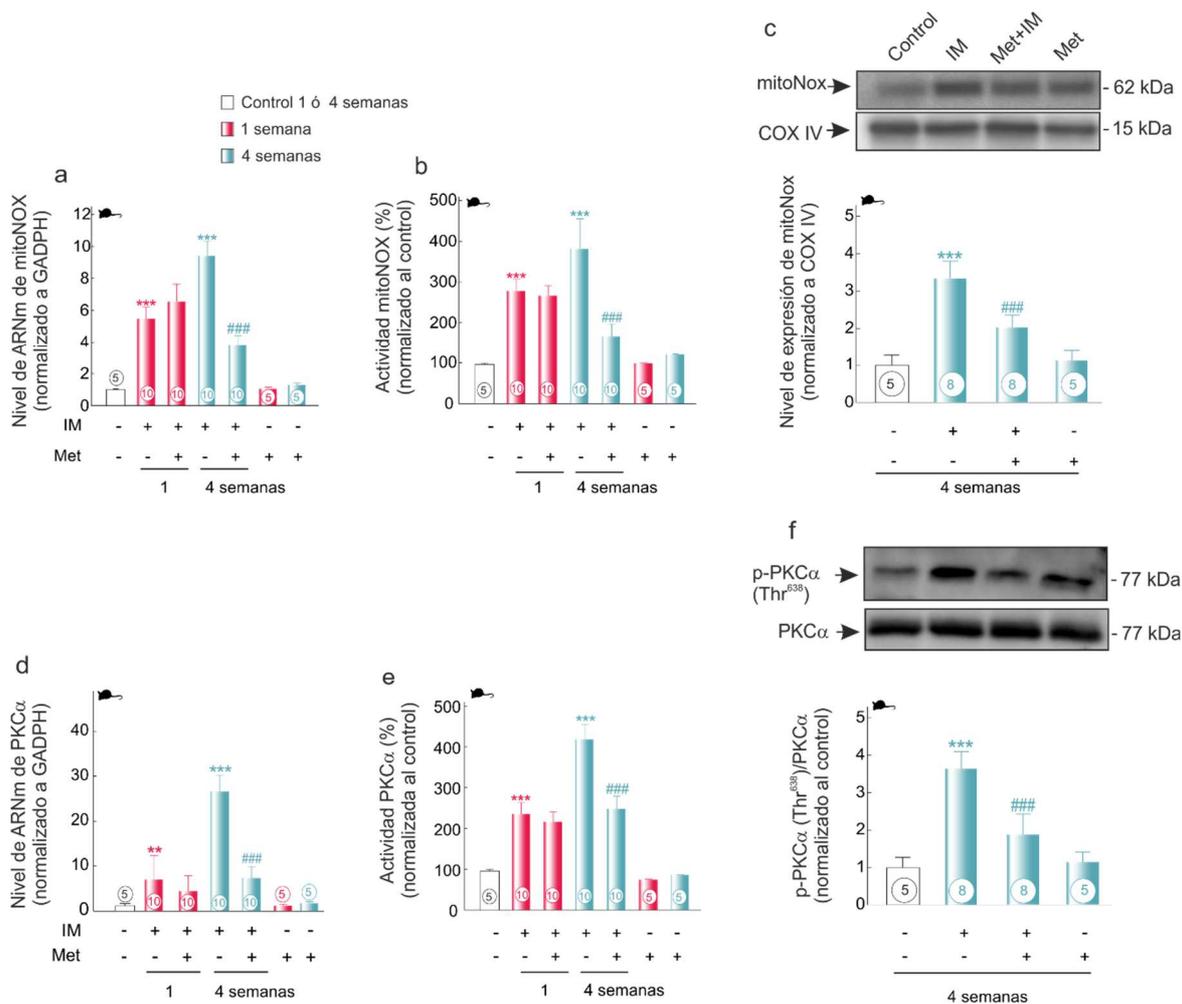


Figura 3.7. *Metformina reduce la expresión de la enzima mitoNox y previene la expresión y actividad de PKCα en la zona del borde del VI infartado.* (a) Nivel de ARNm de mitoNox; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al ensayo control. (b) Actividad mitoNox. (c) Imagen representativa de western blot de la expresión de mitoNox; los datos se normalizan respecto a COX IV. (d) Nivel de ARNm de PKCα; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al control. (e) Actividad PKCα; los datos se normalizan respecto al control. (f) Imagen representativa de western blot y análisis de la relación p-PKCα(Thr⁶³⁸)/PKCα; los datos se normalizan respecto al ensayo control. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. **p<0,01, *** p<0,001 comparado con el grupo control; #### p<0,001 comparado con el grupo IM. mitoNox: NADPH oxidasa mitocondrial 4; PKCα: proteína quinasa C-alfa. Otras abreviaturas aparecen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Cuando evaluamos el efecto de metformina sobre el nivel de ARNm, la actividad, y el estado de fosforilación del residuo Thr⁶³⁸ de la enzima PKC α , los resultados obtenidos fueron similares (Fig. 3.7, paneles d-f) a los mencionados anteriormente. En ausencia de IM, la terapia con metformina no afectó ni a la expresión ni a las actividades de ambas enzimas (Fig. 3.7).

Al estudiar el efecto de metformina sobre los parámetros citados, pero en el área infartada del VI, los resultados obtenidos fueron similares a los anteriormente descritos. De nuevo, la terapia con metformina indujo un incremento significativo de los niveles de AMPK α 1 y AMPK α 2 cuando fue adicionada durante 4 semanas tras el IM ($p < 0,001$). Además, —al igual que observamos en el área del borde del VI infartado— los niveles de ARNm de mitoNox y PKC como sus actividades enzimáticas incrementaron tras 1 y 4 semanas de IM y de nuevo el tratamiento con metformina redujo los niveles de ARNm y actividad solo cuando los animales fueron tratados durante 4 semanas tras el IM ($p < 0,001$, en todos los casos) (Fig. 3.8).

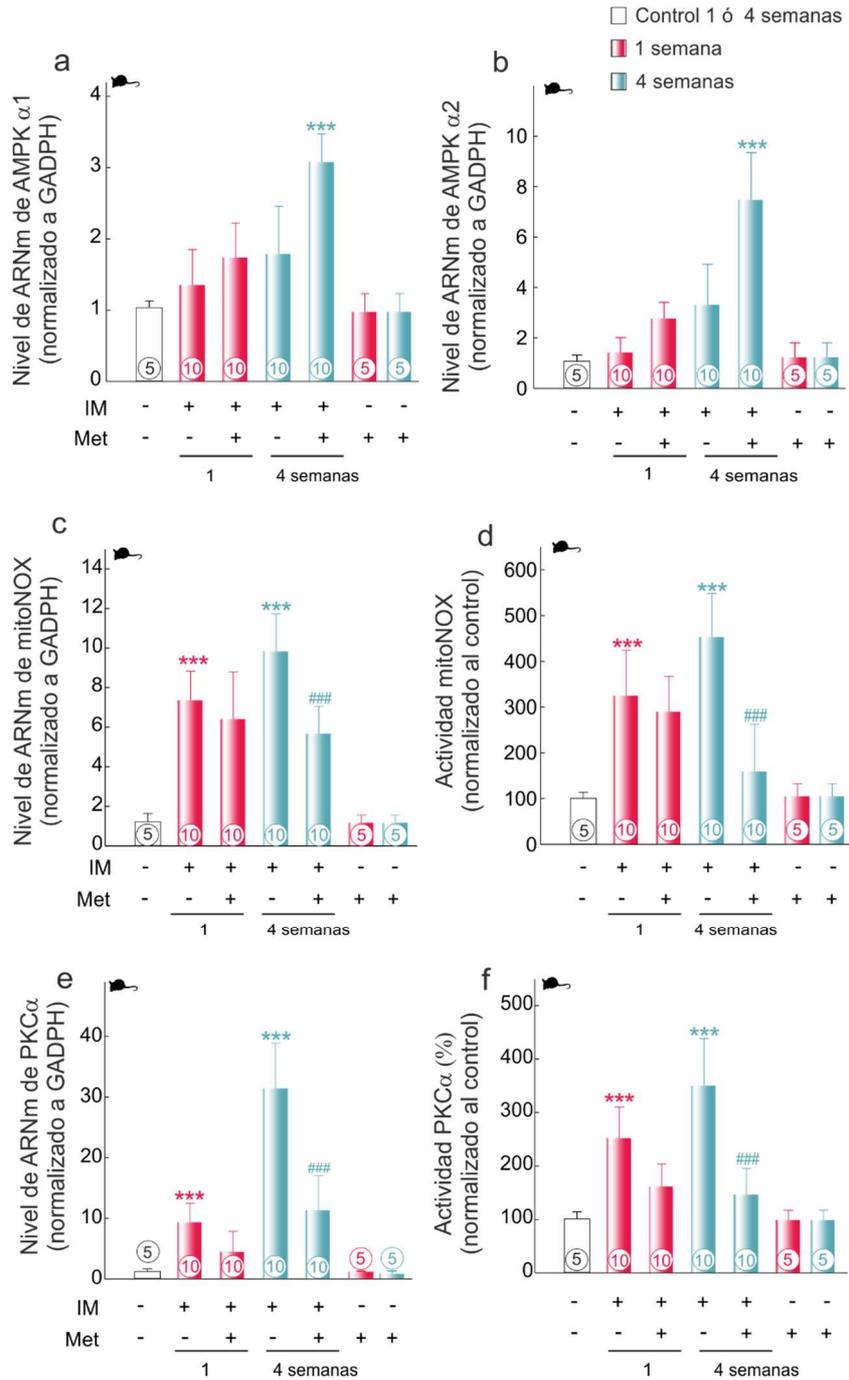


Figura 3.8. La terapia con metformina incrementa el nivel de ARNm de AMPK y reduce el nivel y actividad de las enzimas mitoNox y PKC α en la zona infartada del VI. (a-c y e). Niveles de ARNm AMPK α 1, AMPK α 2, mitoNox y PKC α ; los datos se han normalizado respecto al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al ensayo control. (d) Actividad enzimática mitoNox y (f) actividad PKC α en el área infartada del VI. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. *** p<0,001 comparado con el grupo control; ### p<0,001 comparado con el grupo IM. Las abreviaturas aparecen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Por otro lado, el aumento observado tanto en la expresión como en la actividad de mitoNox y PKC α en las áreas del borde y del infarto del VI se asoció con un incremento de la peroxidación lipídica en los tejidos evaluados (Fig. 3.9, paneles a, d) y con la activación de un programa de muerte apoptótica, caracterizado por la activación de la caspasa 9 (Fig. 3.9, paneles b, e) y de la caspasa 3 (Fig. 3.9, paneles c, f). El análisis de los datos obtenidos mostró que esta respuesta adversa —que es activada tras la inducción del IM— era significativa en la fase aguda del IM y se mantuvo significativamente elevada 4 semanas después del IM ($p < 0,001$, en todos los casos). De nuevo, el tratamiento con metformina durante 4 semanas tras el IM se asoció con una disminución de la peroxidación lipídica ($p < 0,001$, en todos los casos) y con un grado de activación de caspasas más bajo ($p < 0,001$, en ambos casos). Como se muestra en figura 3.9, la administración de metformina en ausencia de infarto no tuvo efecto sobre los parámetros estudiados.

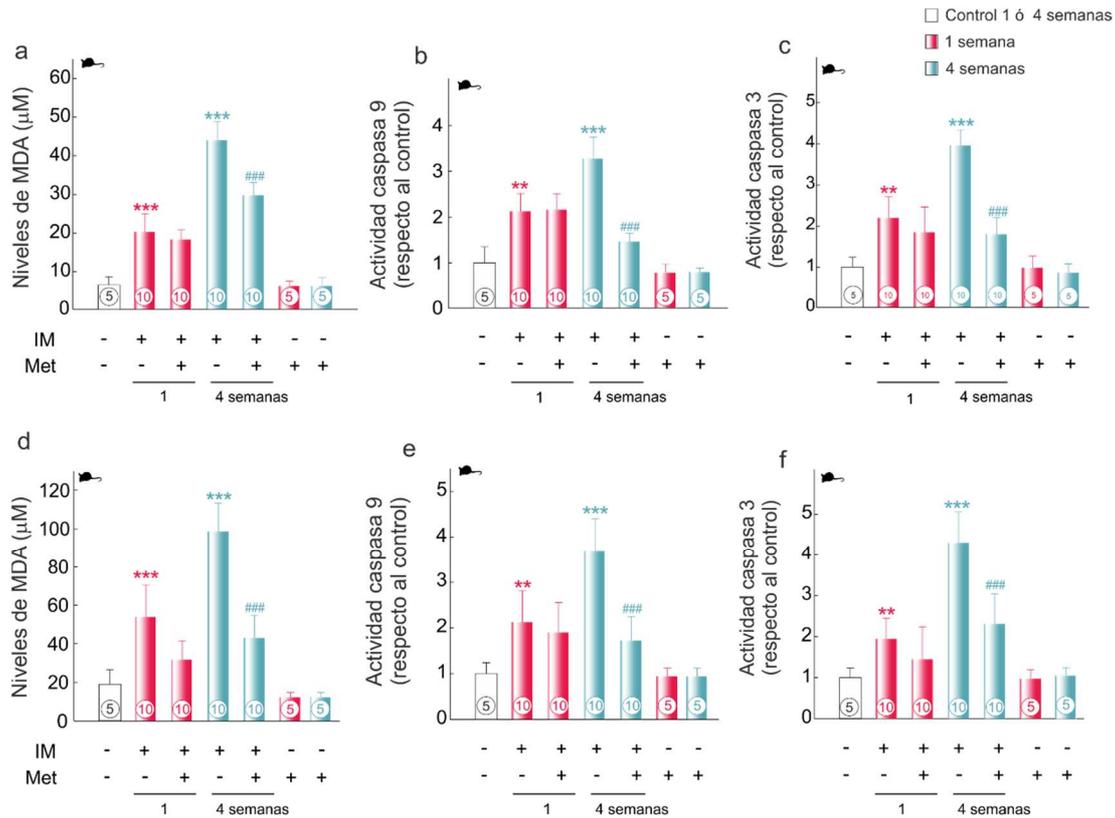


Figura 3.9. Metformina mejora al daño oxidativo y previene la muerte celular por apoptosis en la zona del borde del VI infartado (a-c) y en la zona infartada del VI (d-f). (a, d) Acumulación de niveles de MDA. (b, e) Actividad de la caspasa -9. (c, f) Actividad de la caspasa -3. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. **p<0,01, *** p<0,001 comparado con el grupo control; ### p<0,001 comparado con el grupo IM. Las abreviaturas aparecen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Metformina modula la vía de señalización intracelular mitoNOX/PKCα/Gal-3

Con el objetivo de evaluar si el efecto antifibrótico asociado al tratamiento con metformina está relacionado con la inhibición de las enzimas mitoNox y PKCα —a través de la modulación de la actividad de la enzima AMPK— y caracterizar su relación y jerarquía en el remodelado adverso cardíaco, usamos un modelo experimental de deformación celular (véase *Capítulo 2*). El procedimiento

experimental se realizó sobre cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos aislados a partir del miocardio de ratones no infartados C57BL6/J (véase *Capítulo 2*).

Nuestro primer objetivo, antes de iniciar el protocolo de deformación celular, fue valorar la pureza de cada una de las fracciones celulares que fueron aisladas. Comparado con la fracción de fibroblastos cardíacos aislados, el nivel de ARNm de c-TnT, β -MHC y α -actinina fue significativamente más alto en la fracción de cardiomiocitos ($p < 0,001$, para todos los marcadores) (Fig. 3.10, paneles a-c). Cuando procedimos a evaluar la pureza de la fracción de fibroblastos cardíacos, el nivel de ARNm de vimentina, FSP-1 y DDR2 fue significativamente mayor ($p < 0,001$, para todos los marcadores) (Fig. 3.10, paneles d-f) en comparación con la fracción de cardiomiocitos. Los datos mostrados indican una elevada pureza de cada una de las fracciones celulares aisladas y determinan la fiabilidad del procedimiento experimental usado para su aislamiento.

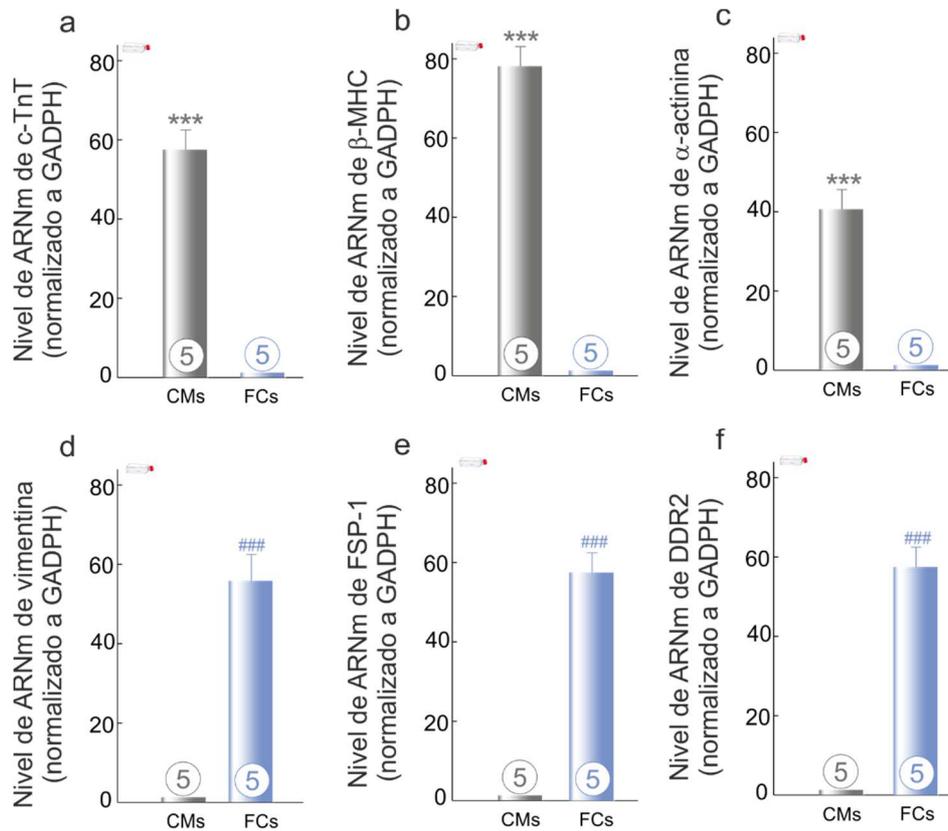


Figura 3.10. *Pureza de las fracciones de cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos.* Los niveles de ARNm de c-TnT, β -MHC y α -actinina, —como marcadores específicos de cardiomiocitos— y de vimentina, FSP-1 y DDR2, —como marcadores específicos de fibroblastos cardíacos— fueron analizados por PCR cuantitativa. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con fibroblastos cardíacos; ### $p < 0,001$ en comparación con cardiomiocitos. c-TnT: troponina T cardíaca; β -MHC: cadena pesada de miosina beta; FSP-1: proteína 1 específica de fibroblasto; DDR2: dominio del receptor de discoidina 2 tirosin quinasa; CMs: cardiomiocitos; FCs: fibroblastos cardíacos.

A continuación, una vez determinada la pureza de cada una de las fracciones celulares, y con el objetivo de poder discernir la relación y jerarquía existente entre las enzimas AMPK, mitoNox, y PKC α con la modulación de la expresión de Gal-3 en el cardiomiocito, usamos una mezcla comercial de 3 secuencias de ARN de interferencia de pequeño tamaño (siRNAs), diseñadas para bloquear la expresión

de AMPK α 1 ó AMPK α 2. En primer lugar, la eficiencia de estos siRNAs, en forma combinada o individual, fue confirmada en cardiomiocitos bajo deformación celular mediante PCR cuantitativa y western blot (Fig. 3.11, paneles b-d). Un esquema representativo del diseño experimental se muestra en la figura 3.11, panel a. Nuestros datos confirmaron que el incremento en la expresión de AMPK α 1 y AMPK α 2 que indujo metformina tras la deformación celular, fue completamente bloqueada cuando la expresión de cada una de las isoformas del AMPK fue previamente silenciada por la mezcla formada por una combinación de los tres siRNAs específicos para AMPK α 1 ó para AMPK α 2 ($p < 0,001$, en todos los casos) (Fig. 3.11, paneles b, c). De forma análoga, cuando silenciamos la expresión de AMPK α 1 ó de AMPK α 2 usando de forma individual cada uno de los siRNAs de la mezcla, —nombrados en la figura como a, b y c—, el resultado fue similar al obtenido cuando se usan en combinación ($p < 0,001$, en todos los casos) (Fig. 3.11, paneles b, c). Además, el análisis de nuestros resultados mostró que el silenciamiento de AMPK α 1 no tuvo efecto sobre la expresión de AMPK α 2 (Fig. 3.11, panel c) y *viceversa* (Fig. 3.11, panel b). En este contexto, es importante señalar que el silenciamiento del AMPK α 1/ α 2 bloqueó la fosforilación de tuberina sobre su sitio de activación Ser¹³⁸⁷, —tuberina es una proteína diana del AMPK— (Fig. 3.11, panel d). Este resultado nos indica por un lado la eficiencia del silenciamiento del AMPK y además confirma que tuberina está en la misma secuencia de eventos y aguas abajo del AMPK.

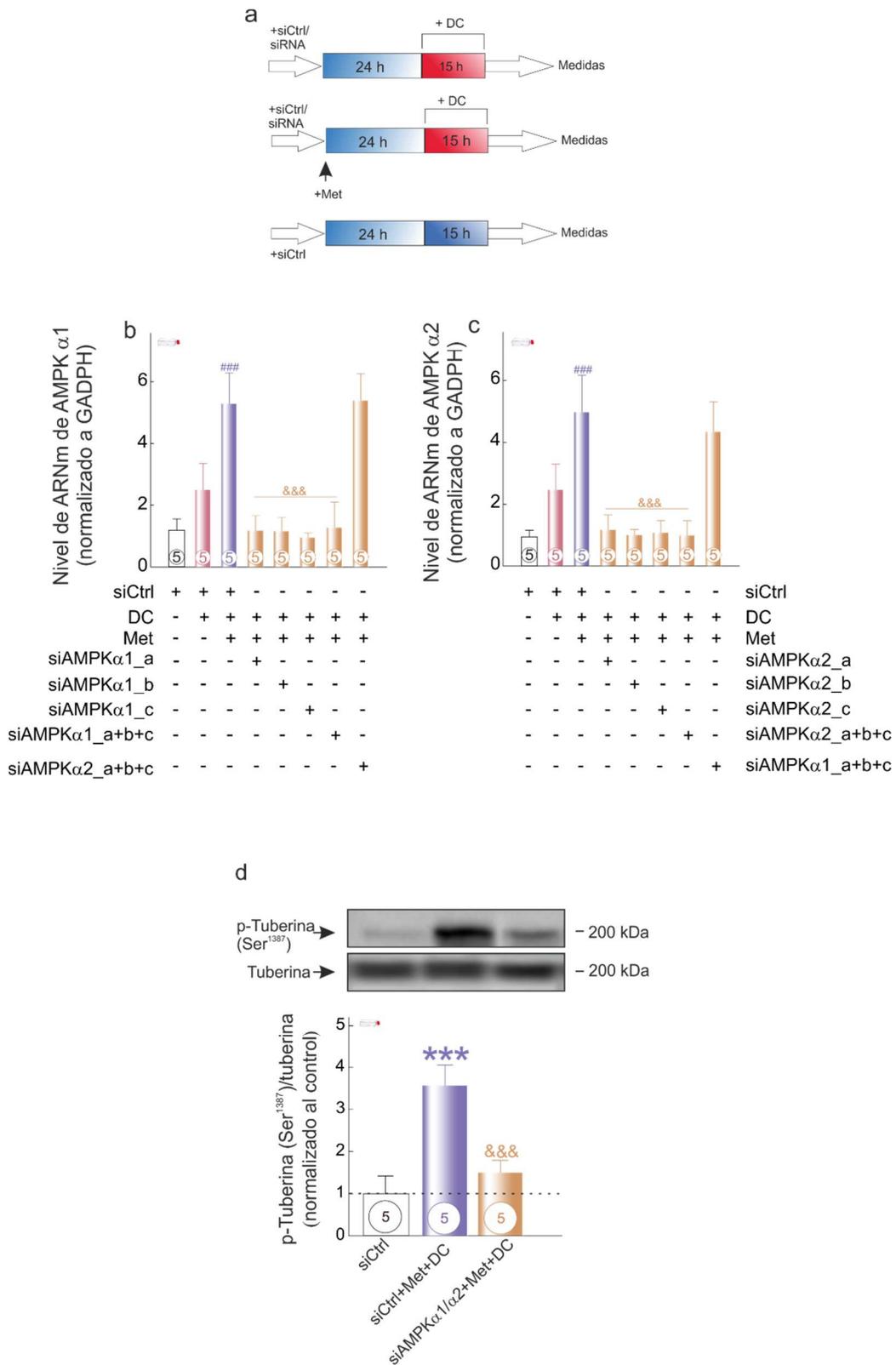


Figura 3.11. Los cardiomiocitos se preincubaron con siRNA-Control (siCtrl), con una combinación de tres siRNAs para silenciar a AMPKα1 (siAMPKα1_a+b+c), AMPKα2 (siAMPKα2_a+b+c) o con las secuencias citadas de siRNAs de forma individual, antes de

iniciar el protocolo de deformación celular. (a) Esquema representativo del procedimiento experimental; (*Esquema superior*) tras la transfección, y después de 48 h en condiciones de cultivo estándares, los cardiomiocitos se mantuvieron otras 24 h en medio MEM. Las células fueron sometidas después a un protocolo de deformación celular durante 15 h antes de proceder a las medidas; (*Esquema medio*) los cardiomiocitos se trataron como se ha descrito antes, pero en este caso, las células fueron pretratadas con metformina durante 24 h antes de iniciar el protocolo de deformación; (*Esquema inferior*) ensayo control; el protocolo experimental es similar a los anteriores pero el último periodo de 15 h se realizó sin inducir deformación. (b, c) Nivel de ARNm de AMPK α 1 y de AMPK α 2, respectivamente. (d) Imagen representativa de western blot y análisis cuantitativo de la relación entre p-tuberina(Ser¹³⁸⁷)/tuberina. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC; &&& p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+Met+DC. siCtrl: siRNA-control; DC: deformación celular. Otras abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

En base a los resultados obtenidos, en adelante los ensayos de transfección se realizaron con la combinación de tres siRNAs (siAMPK α 1_a+b+c), para silenciar a AMPK α 1 y/o con la combinación de los tres siRNAs (siAMPK α 2_a+b+c) para silenciar a AMPK α 2.

En cardiomiocitos sometidos a deformación celular, el efecto preventivo observado en presencia de metformina sobre las actividades enzimáticas mitoNox y PKC α (Figs. 3.12, paneles a, b) o sobre el nivel de ARNm de Gal-3 (Fig. 3.12, panel c) fue bloqueado en células donde previamente la expresión de AMPK α 1 (p<0,001), AMPK α 2 (p<0,001) o ambos (p<0,001) fue silenciada (Fig. 3.12, paneles a-c). El análisis de estos resultados indica que la enzima AMPK es una proteína clave en el efecto inhibitorio que ejerce metformina sobre las actividades enzimáticas mitoNox y PKC α en cardiomiocitos sometidos a deformación celular.

A continuación, mediante la utilización de inhibidores selectivos para mitoNox o para PKC α procedimos a caracterizar su organización jerárquica y evaluar el efecto que tiene su activación, sobre la modulación de la expresión de Gal-3 por deformación celular (Fig. 3.12, barras de color gris y verde). El tratamiento de los cardiomiocitos en cultivo con GKT137831, un inhibidor selectivo de mitoNox, revirtió el efecto observado al silenciar la expresión del AMPK sobre las actividades enzimáticas mitoNox (Fig. 3.12, panel a; comparar barras grises con marrones), PKC α (Fig. 3.12, panel b; comparar barras grises con marrones), así como el efecto preventivo de metformina sobre la expresión de Gal-3 (Fig. 3.12, panel d; comparar la barra que aparece en color gris con la de color rosa). Por otro lado, el uso de Queleritrina, un inhibidor específico de la enzima PKC α , redujo por un lado de forma significativa la actividad PKC α (Fig. 3.12, panel b; comparar barrar que aparecen de color verde con las que se muestran en marrón) ($p < 0,001$) —en cardiomiocitos previamente silenciados en AMPK $\alpha 1$ y $\alpha 2$ —, no tuvo efecto sobre la actividad mitoNox (Fig. 3.12, panel a; comparar barrar que aparecen en color verde con las que aparecen de color marrón) y, como se esperaba, bloqueó la expresión de Gal-3 (Fig. 3.12, panel d). Tomados en conjunto, el análisis de los datos obtenidos demostró que la enzima PKC α es activada por mitoNox y que su activación induce el aumento de la expresión de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular.

Como control del procedimiento se usaron fibroblastos cardíacos sometidos al mismo procedimiento experimental de deformación celular. En este modelo celular sometido a nuestras condiciones experimentales, las enzimas mitoNox y PKC α no se activaron (dato no mostrado).

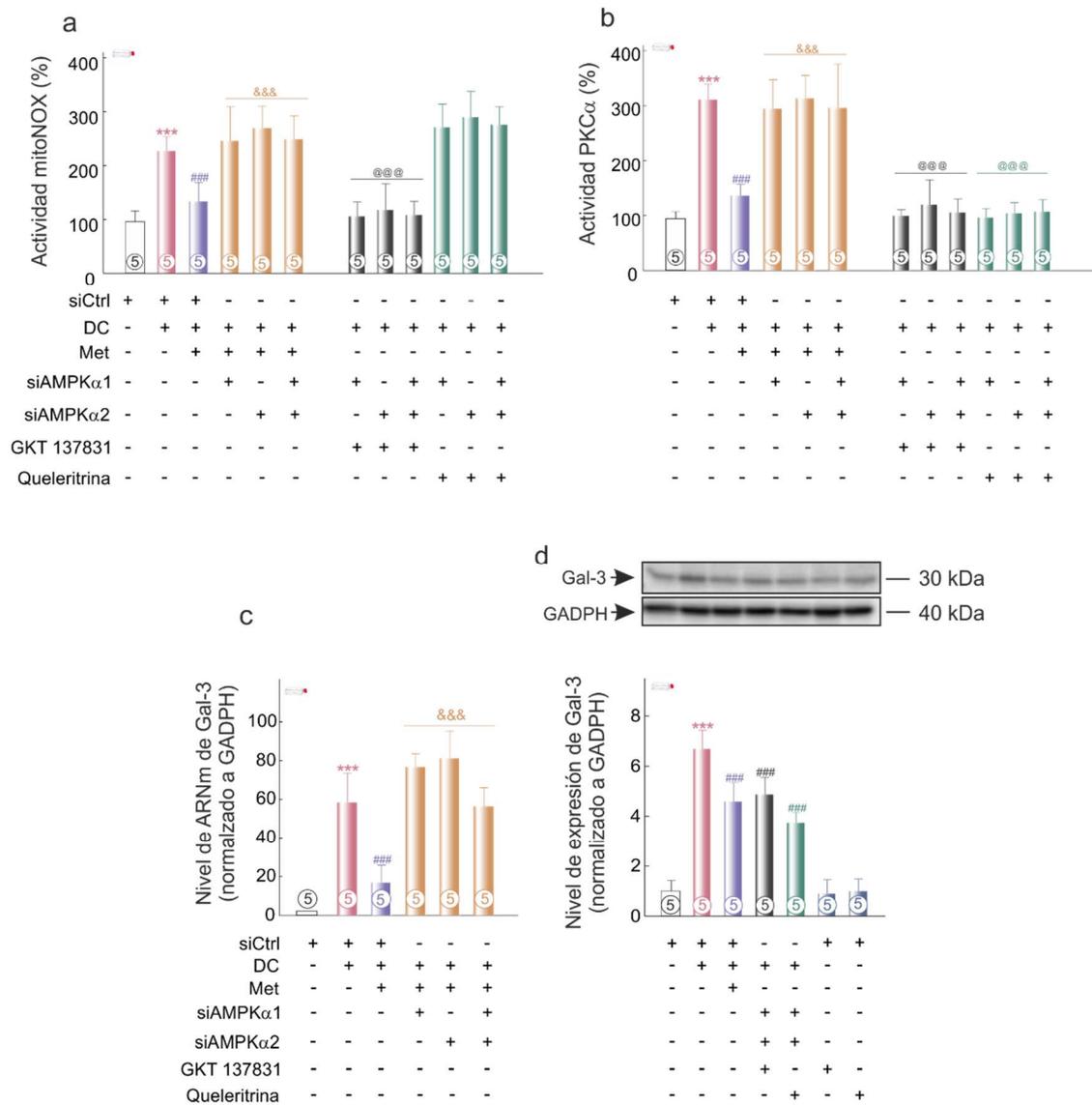


Figura 3.12. El incremento de la expresión de AMPK por metformina previene la activación de las enzimas mitoNox y PKCα así como la expresión de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular. (a-b) Actividades enzimáticas mitoNox y PKCα en cardiomiocitos; los datos se expresan en % respecto al ensayo control. (c) Nivel de ARNm de Gal-3; los datos se normalizaron respecto al nivel de ARNm de GADPH y se expresaron con respecto al ensayo control. (d) Imagen representativa de western blot y análisis cuantitativo de la expresión de Gal-3. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC; &&& p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+Met+DC; @@@ p<0,001 en comparación con el grupo siAMPKα1/α2+Met+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Para disponer de un mayor soporte a esta afirmación y demostrar esta organización jerárquica entre estas dos enzimas, procedimos a silenciar la expresión de mitoNox o PKC α , mediante el uso de una mezcla comercial tipo ON-TARGETplus[®] obtenida de Dharmacon[™] (mitoNox (L-058509-00); PKC α (L-040348-00)) usando el procedimiento experimental de transfección detallado en el *Capítulo 2*. Como se puede observar en la figura 3.13, paneles a-c, en cardiomiocitos sometidos a deformación celular el silenciamiento endógeno de mitoNox previno por un lado su activación (Fig. 3.13, panel a), la activación de PKC α (Fig. 3.13, panel b) así como el aumento de Gal-3 en el sobrenadante celular (Fig. 3.13, panel c) ($p < 0,001$, en todos los casos). Por otro lado, el silenciamiento de PKC α significativamente redujo la actividad evaluada de PKC α (Fig. 3.13, panel b), no tuvo efecto sobre la actividad mitoNox (Fig. 3.13, panel a) ($p < 0,001$) y como era de esperar, bloqueo también la acumulación de Gal-3 en el sobrenadante celular (Fig. 3.13, panel c) ($p < 0,001$). Tomados en conjunto, nuestros resultados indican que mitoNox está situada aguas arriba de PKC α y que su activación conduce al aumento de la expresión y secreción de Gal-3 por el cardiomiocito.

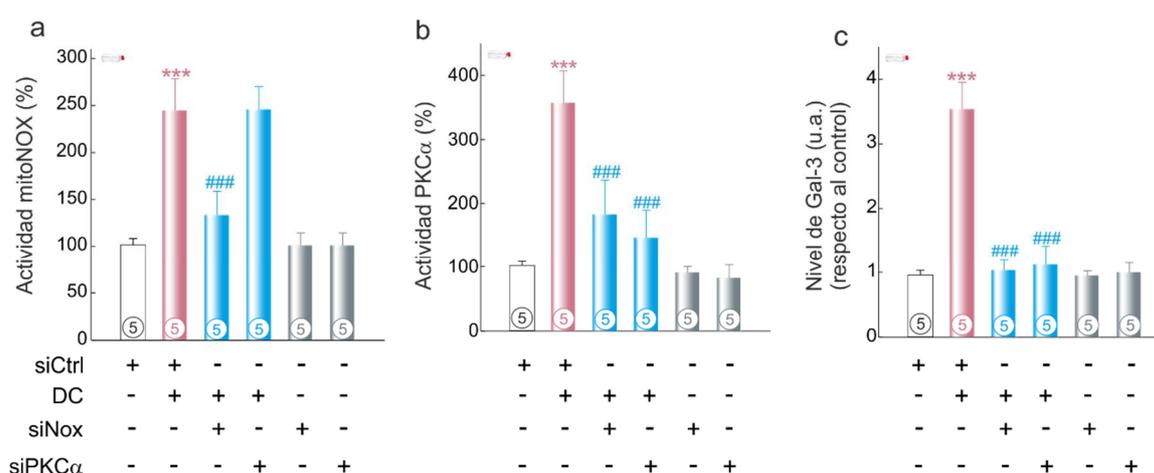


Figura 3.13. La enzima mitoNox a través de la activación de PKC α aumenta la expresión y secreción de Gal-3 por cardiomiocitos sometidos a deformación celular. Los cardiomiocitos se preincubaron con siCtrl, siRNAs específicos para mitoNox (siNox) o para PKC α (siPKC α) antes

de iniciar el protocolo de deformación celular. (a-b) Actividades enzimáticas mitoNox y PKC α , respectivamente; los datos se expresan en % respecto al ensayo control. (c) Nivel de Gal-3 en el sobrenadante de cardiomiocitos bajo deformación celular. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo siCtrl; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo siCtrl+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

El incremento de AMPK inducido por metformina previene del daño cardíaco

Los ensayos realizados hasta ahora determinan la implicación de las enzimas mitoNox y PKC α en la expresión y secreción de Gal-3 por el cardiomiocito bajo deformación celular. Además, nuestros datos establecen un orden jerárquico entre estas dos enzimas y la expresión de Gal-3 por el cardiomiocito. Los ensayos que siguen tratan de caracterizar la vía de señalización que conecta la activación del AMPK inducido por metformina con la inhibición de mitoNox y por *ende* la expresión y secreción de Gal-3 y el bloqueo del programa fibrótico adverso.

En primer lugar, valoramos el efecto de la deformación celular sobre el estado funcional de los cardiomiocitos. En este sentido, los cardiomiocitos que fueron sometidos a deformación celular mostraron valores de viabilidad celular y proliferación significativamente menores a los medidos en células control ($p < 0,001$, en ambos casos) —células sembradas y mantenidas en las mismas condiciones de cultivo pero sin someterlas a deformación celular (véase *Capítulo 2*)— (Fig. 3.14, paneles a, b).

De nuevo, el tratamiento con metformina redujo estos efectos deletéreos ($p < 0,001$, en ambos casos) y el silenciamiento —previo a la deformación— de AMPK α 1, AMPK α 2 o de ambos, bloqueo de forma significativa el efecto preventivo de metformina ($p < 0,001$, en ambos casos). Cuando evaluamos el

efecto preventivo de metformina sobre la acumulación de especies con oxígeno reactivo, el análisis de los resultados obtenidos fue similar (Fig. 3.14, panel c). De nuevo, el silenciamiento de AMPK α 1, α 2 ó de ambos bloqueó el efecto de metformina (Fig. 3.14, panel c) y la adición de los inhibidores específicos de mitoNox o de PKC α , revirtió el efecto obtenido del silenciamiento (Fig. 3.14).

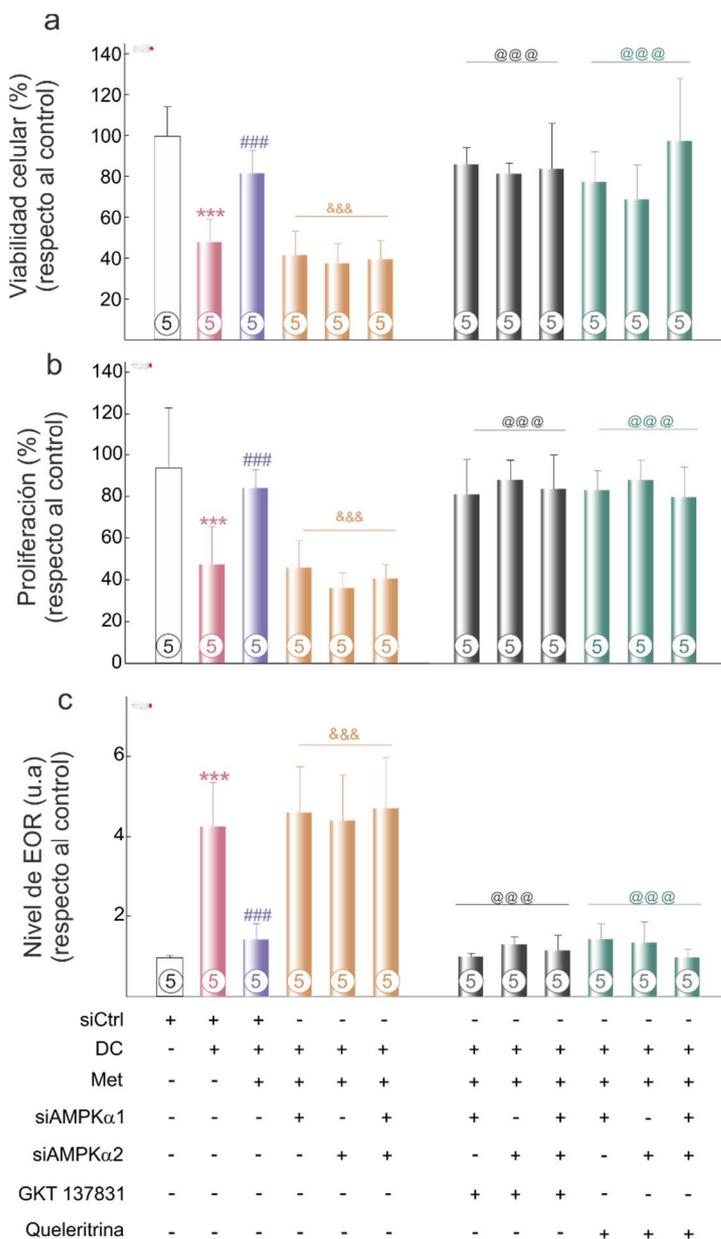


Figura 3.14. El aumento de la expresión del AMPK inducida por metformina previene el daño celular asociado con la deformación. (a) Cuantificación de la viabilidad celular usando MTT. (b) Medida de la proliferación celular. (c) Cuantificación del nivel de especies con oxígeno reactivo (EOR) en cardiomiocitos tratados según se indica. Los datos se normalizan respecto al ensayo control. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. ***p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ###p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC; &&&p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+Met+DC; @@@p<0,001 en comparación con el grupo siAMPK α 1/ α 2+Met+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

La disminución en la fosforilación de la enzima AMPK inactiva a tuberina y activa la vía intracelular mTORC1/p70S6K, lo que conduce a la activación de mitoNox.

Con el fin de estudiar el mecanismo a través del cual AMPK es capaz de modular la actividad de mitoNox, evaluamos el papel regulador de la quinasa AMPK sobre la activación del eje molecular mTORC1/p70S6K que es activado tras la deformación celular.

Mientras que cardiomiocitos sometidos a deformación celular, y en comparación con el grupo control, mostraron una tendencia al alza, pero no significativa en el nivel de fosforilación del residuo Thr¹⁷² de la proteína AMPK α 1/ α 2 (Fig. 3.15, panel a, b), su pre-incubación con metformina bajo deformación celular, hizo que su estado de fosforilación incrementará de forma significativa ($p < 0,001$) (Fig. 3.15, panel a, b). Además, nuestros datos mostraron como el tratamiento de los cardiomiocitos con rapamicina, un inhibidor específico de mTORC1, no influyó en el efecto que la deformación celular causó en el estado de fosforilación de la proteína AMPK (Fig. 3.15, paneles a, b).

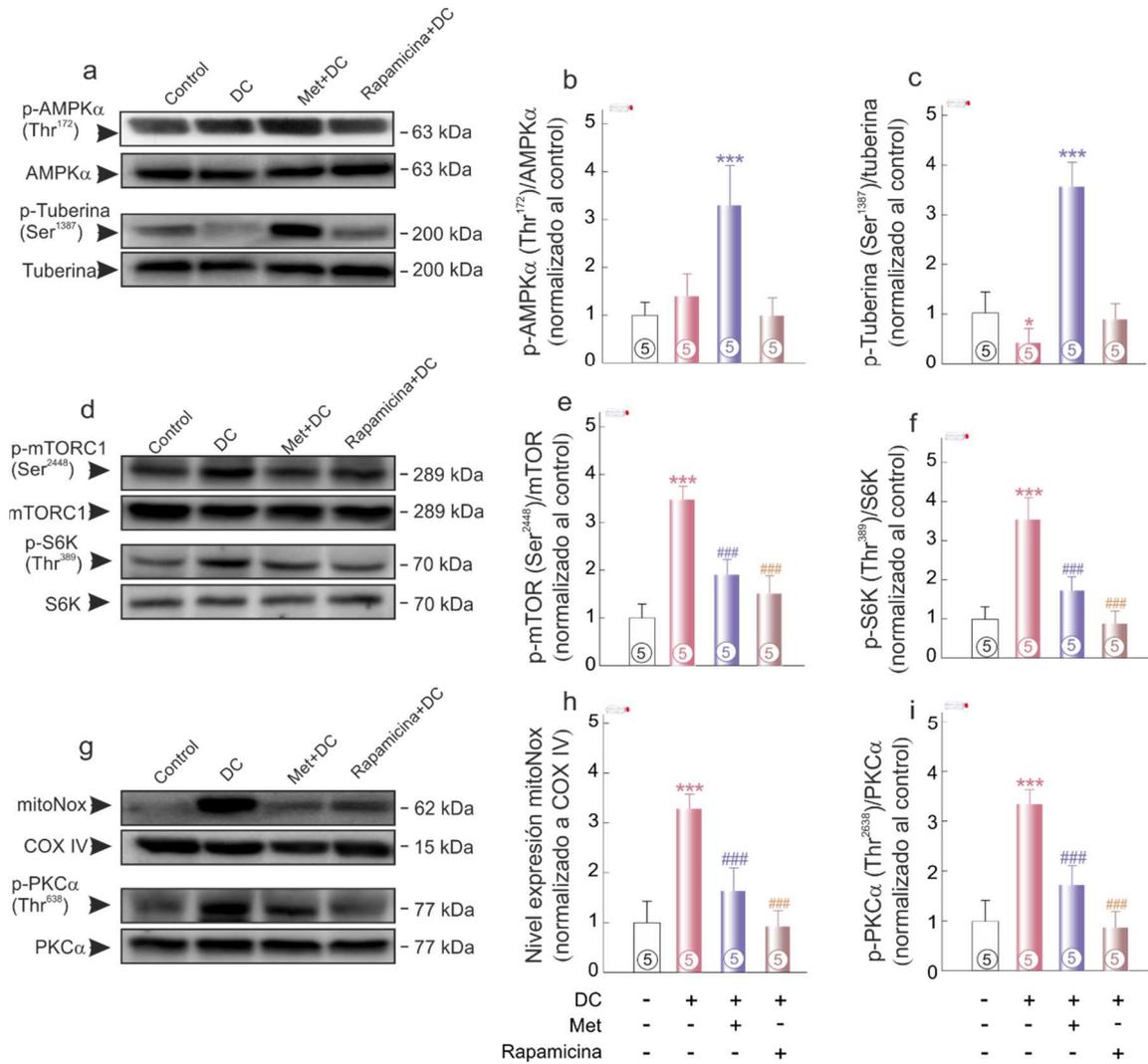


Figura 3.15. La disminución en la fosforilación de AMPK inactiva a tuberina y activa la vía *mTORC1/p70S6K* lo que conduce a la secreción de Gal-3. (a-c) Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la relación p-AMPK(Thr¹⁷²)/AMPK; p-tuberina (Ser¹³⁸⁷)/tuberina. (d-f) Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la relación p-mTORC1(Ser²⁴⁴⁸)/mTORC1; p-S6K (Thr³⁸⁹)/S6K. (g-i) Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la relación mitoNox/COX IV; p-PKC α (Thr⁶³⁸)/PKC α . En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. * p<0,05, *** p<0,001 en comparación con el grupo control; ### p<0,001 en comparación con el grupo DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Por otra parte, el análisis de los resultados determinó que el estado de fosforilación de la proteína tuberina sobre su sitio de activación Ser¹³⁸⁷ (Fig. 3.15, paneles a, c) disminuyó en cardiomiocitos sometidos a deformación celular, un efecto que fue revertido cuando las células se pre-incubaron en presencia de metformina. Cuando estudiamos el estado de fosforilación de la proteína mTORC1 sobre su residuo de activación Ser²⁴⁴⁸, el análisis de los datos obtenidos mostró un incremento que fue significativo en cardiomiocitos sometidos a deformación celular ($p < 0,001$) (Fig. 3.15, paneles d, e). Además, nuestros resultados determinaron que el tratamiento de cardiomiocitos, bajo condiciones de deformación, con metformina o con rapamicina fue capaz de prevenir el incremento en el estado de fosforilación del residuo Ser²⁴⁴⁸ de mTORC1. Como esperábamos, obtuvimos resultados similares cuando evaluamos el estado de fosforilación de la proteína p70S6K sobre su sitio de activación Thr³⁸⁹ (Fig. 3.15, paneles d, f), así como al evaluar el nivel de expresión de la enzima mitoNox (Fig. 3.15, paneles g, h) o el estado de fosforilación de PKC α (Fig. 3.15, paneles g, i).

En experimentos paralelos, y con el objetivo de identificar la jerarquía molecular entre mTORC1 y p70S6K, procedimos a transfectar cardiomiocitos con la mezcla comercial SMART pool[®] contra p70S6K antes de inducir la deformación celular. A continuación, evaluamos el efecto del silenciamiento endógeno de p70S6K sobre el estado de fosforilación de mTORC1, el nivel de expresión de mitoNox y la acumulación de Gal-3 (Fig. 3.16, paneles a-c). El análisis de los datos obtenidos mostró que, aunque el silenciamiento de p70S6K no afectó al estado de fosforilación de mTORC1, —lo cual demuestra el hecho de que p70S6K se sitúa aguas abajo de mTORC1— fue capaz de prevenir el incremento del nivel de expresión de mitoNox, así como la acumulación de Gal-3 asociada al daño por deformación celular (Fig. 3.16, panel d).

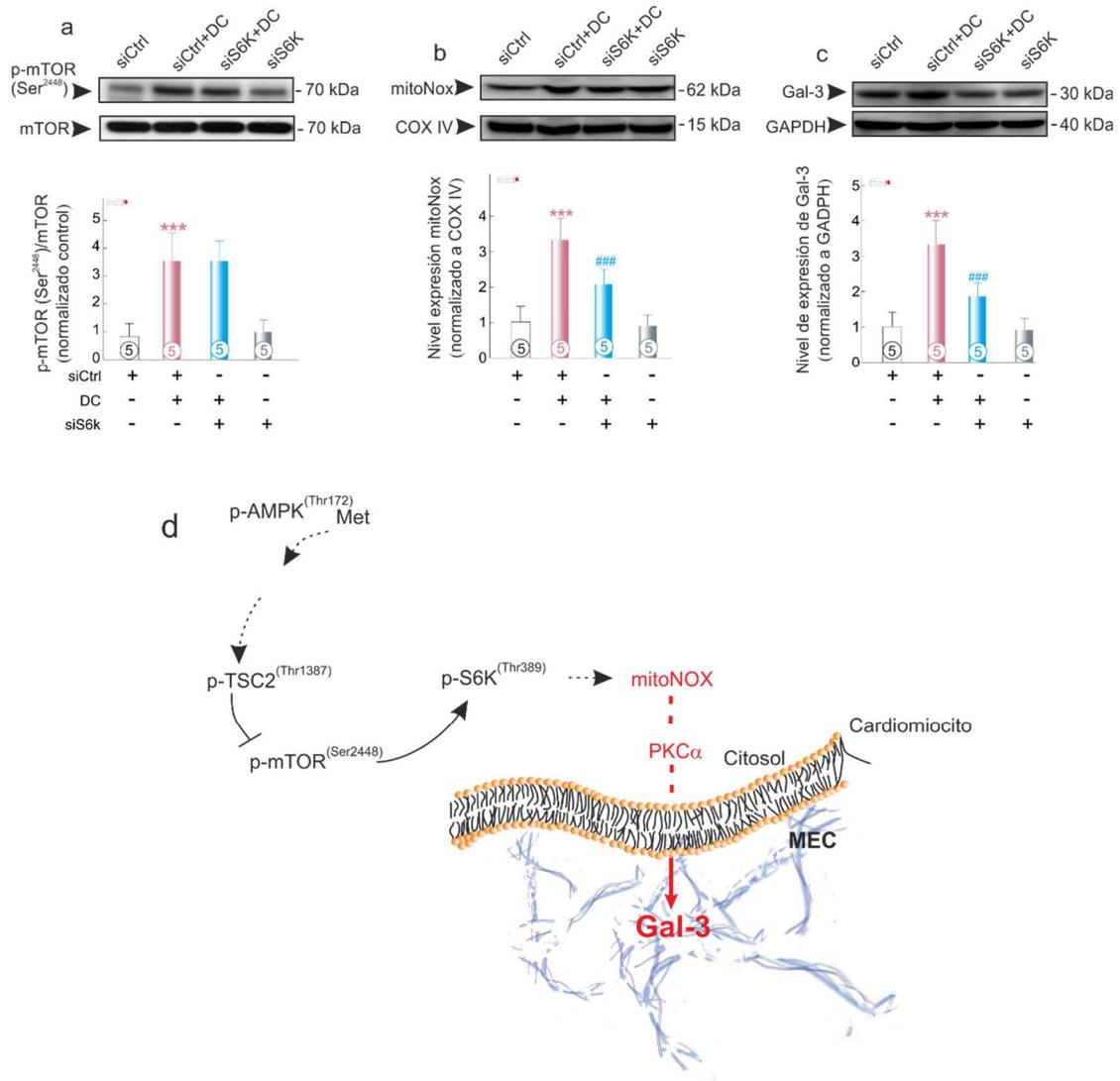


Figura 3.16. *P70S6K*, situado aguas abajo de *mTORC1*, induce la activación de *mitoNox*. (a-c) Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la relación p-mTORC1(Ser²⁴⁴⁸)/mTORC1; mitoNox/COX IV; y Gal-3/GADPH en cardiomiocitos *knockdown* para p70S6K. (d) Modelo de acción de metformina sobre la actividad mitoNox. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. ***p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+ DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

La Gal-3 que es secretada por cardiomiocitos sometidos a deformación celular induce la activación de fibroblastos cardíacos

A continuación, procedimos a evaluar si Gal-3 —nuestros resultados determinaron que puede ser secretada por el cardiomiocito cuando se le somete a un estado de deformación celular— tiene algún efecto sobre los fibroblastos cardíacos. Con este fin, desarrollamos un novedoso sistema de co-cultivo que nos permitió valorar plausibles interacciones entre ambos tipos celulares al someterlos a deformación celular (Fig. 3.17, panel a). Los datos obtenidos a partir de este sistema experimental nos proporcionaron evidencias de que cardiomiocitos sometidos a un estado de deformación celular expresan y secretan altos niveles de Gal-3 al medio extracelular ($p < 0,001$) (Fig. 3.17, panel b), un efecto que fue prevenido de forma significativa en presencia de metformina ($p < 0,001$). Por otro lado, nuestros datos demostraron que el silenciamiento en cardiomiocitos de la expresión endógena de AMPK α 1, AMPK α 2 ó de ambos bloqueó el efecto preventivo de metformina ($p < 0,001$). Además, y como era de esperar, el tratamiento de los cardiomiocitos con los inhibidores GKT137831 ó Queleritrina fue capaz de disminuir la secreción de Gal-3 en el medio extracelular (Fig. 3.17, panel b) ($p < 0,001$).

El efecto del medio extracelular obtenido de cardiomiocitos sometidos a deformación celular, —citado en adelante como medio condicionado—, también se estudió al añadirlo sobre cultivo de fibroblastos cardíacos (Fig. 3.18). En primer lugar, cuando los fibroblastos cardíacos fueron sometidos al mismo protocolo experimental de deformación celular que los cardiomiocitos, no mostraron signos de activación (véanse cilindros negros en figura 3.18, paneles a-c) ni expresaron Gal-3 (dato no mostrado).

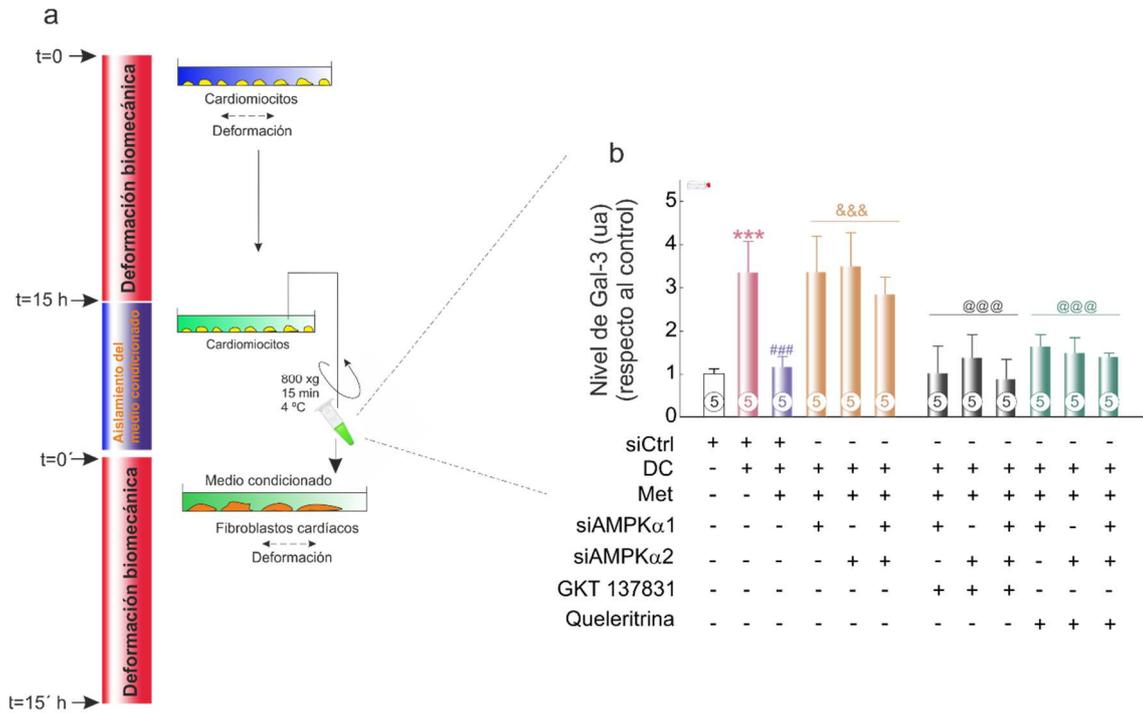


Figura 3.17. Los cardiomiocitos sometidos a deformación celular secretan Gal-3 al medio condicionado. (a) Esquema donde se muestra el protocolo experimental del estudio. (b) Nivel de Gal-3 en el medio condicionado procedente de cardiomiocitos sometidos a una deformación biomecánica celular por 15 h. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC; &&& p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+Met+DC; @@@ p<0,001 en comparación con el grupo siAMPK α 1/ α 2+Met+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Por el contrario, la adición del medio condicionado sobre un cultivo de fibroblastos cardíacos sometidos a un protocolo similar de deformación celular, indujo su activación que fue caracterizada por un incremento significativo en el nivel de ARNm de Col 1a1, Col 3a1 y del marcador de activación FAP1 α (p<0,001, para todos los casos) (Fig. 3.18, paneles a-c).

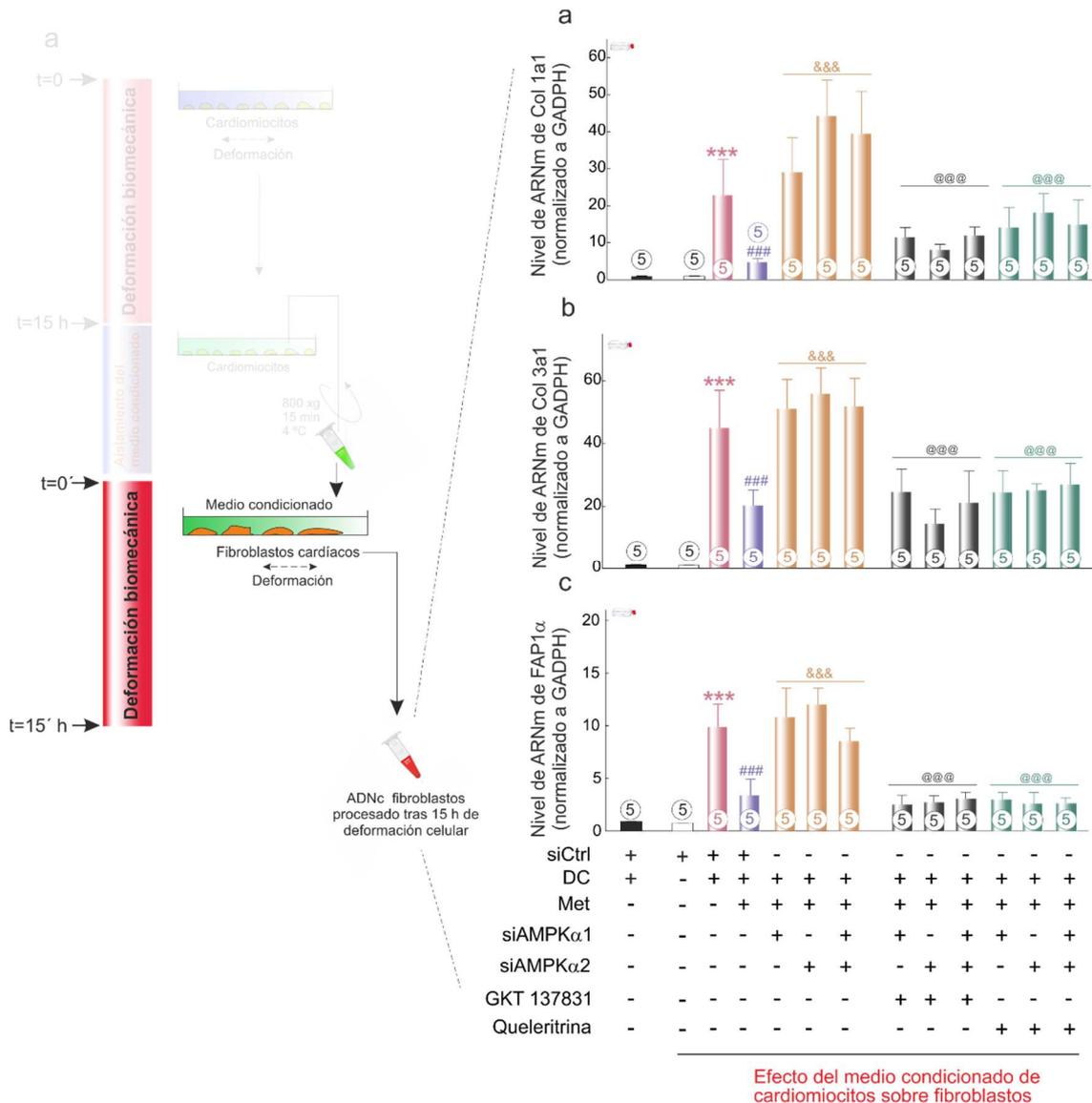


Figura 3.18. El medio condicionado aislado de cardiomiocitos sometidos a deformación celular induce su activación. (a) Nivel de ARNm de Col1a1, (b) Nivel de ARNm de Col3a1, (c) Nivel de ARNm de FAP1α; los datos se han normalizado al nivel de ARNm de GAPDH y se representan respecto al ensayo control. La barra negra a la izquierda de cada uno de los paneles representa el valor de cada uno de los marcadores evaluados en fibroblastos sometidos a deformación, pero a los que no se adiciona el medio condicionado de cardiomiocitos. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC; &&& p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+Met+DC; @@@ p<0,001 en comparación con el grupo siAMPKα1/α2+Met+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Sin embargo, mientras que el uso del medio condicionado de cardiomiocitos tratados con metformina previno este efecto ($p < 0,001$), el silenciamiento endógeno de la expresión de AMPK α 1 ó de AMPK α 2 en cardiomiocitos bloqueó el efecto preventivo de metformina ($p < 0,001$, en todos los casos). Es interesante señalar que el medio condicionado aislado de cardiomiocitos tratados con GKT137831 ó con Queleritrina produjo sobre los fibroblastos cardíacos un efecto similar al obtenido con metformina (Fig. 3.18, paneles a-c) ($p < 0,001$).

Para determinar la implicación de Gal-3 —que es secretada por los cardiomiocitos sometidos a deformación— sobre el estado de activación de los fibroblastos, se procedió a generar un modelo *knockdown* para Gal-3 en cardiomiocitos. La efectividad del silenciamiento se estudió en primer lugar evaluando su efecto sobre el aumento del nivel de ARNm y secreción de Gal-3 por cardiomiocitos sometidos a deformación celular. Como se puede observar en la figura 3.19, el aumento del nivel de ARNm de Gal-3 inducido por la deformación celular sobre cardiomiocitos fue prevenido cuando su expresión fue previamente silenciada (Fig. 3.19, panel a). Cuando evaluamos el efecto del silenciamiento sobre los niveles de Gal-3 secretados por el cardiomiocito tras el protocolo de deformación, los resultados obtenidos fueron similares (Fig. 3.19, panel b).

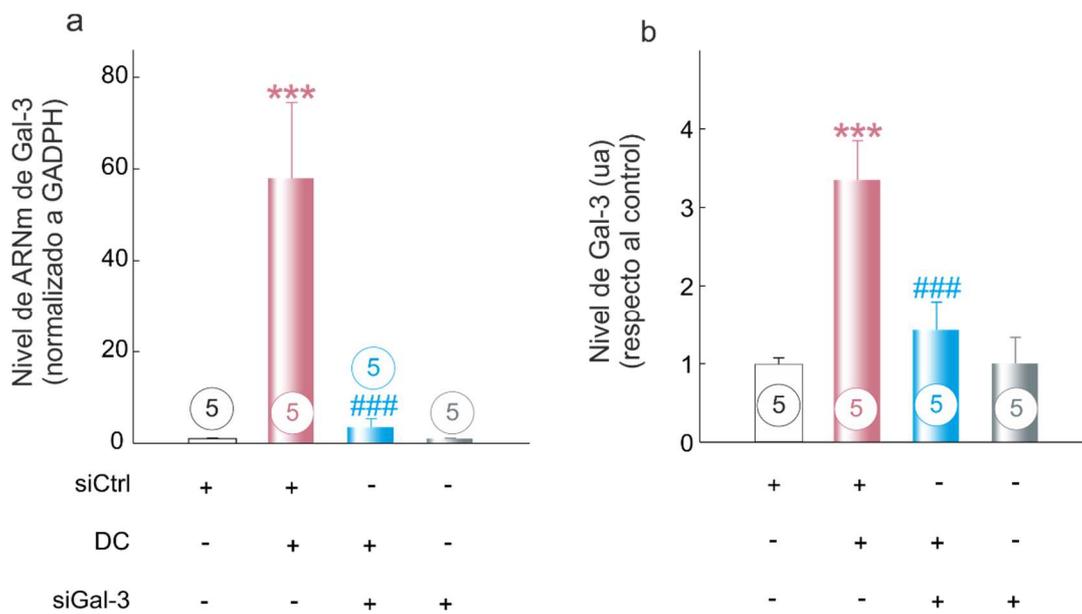


Figura 3.19. *Eficiencia del silenciamiento de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular.* (a) Nivel de ARNm de Gal-3. (b) Nivel de Gal-3 en el sobrenadante celular. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo siCtrl; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo siCtrl+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Una vez evaluada la efectividad del silenciamiento de Gal-3 en los cardiomiocitos, procedimos a estudiar el efecto que producía el medio condicionado de estos cardiomiocitos sobre fibroblastos cardíacos. Los experimentos se realizaron sometiendo primero a cardiomiocitos *knockdown* para Gal-3 a un protocolo de deformación celular y adicionando después el medio condicionado aislado sobre fibroblastos cardíacos, que también estaban sometidos al mismo protocolo de deformación celular. En este caso el uso del medio condicionado aislado de cardiomiocitos *knockdown* para Gal-3 no indujo la activación de los fibroblastos cardíacos (Fig. 3.20, paneles a-c). Experimentos análogos se realizaron usando el medio condicionado aislado de cardiomiocitos

knockdown para mitoNox o para PKC α —un medio condicionado donde previamente describimos la ausencia de Gal-3 (véase Fig. 3.13)—. El análisis de los datos proporcionó resultados similares a los obtenidos cuando se silenció la expresión endógena de Gal-3. Por lo tanto, nuestros datos indican que es Gal-3 secretada por los cardiomiocitos bajo deformación celular la responsable de la activación celular de los fibroblastos cardíacos, porque su ausencia del medio extracelular previene esta activación (Fig. 3.20, panel d).

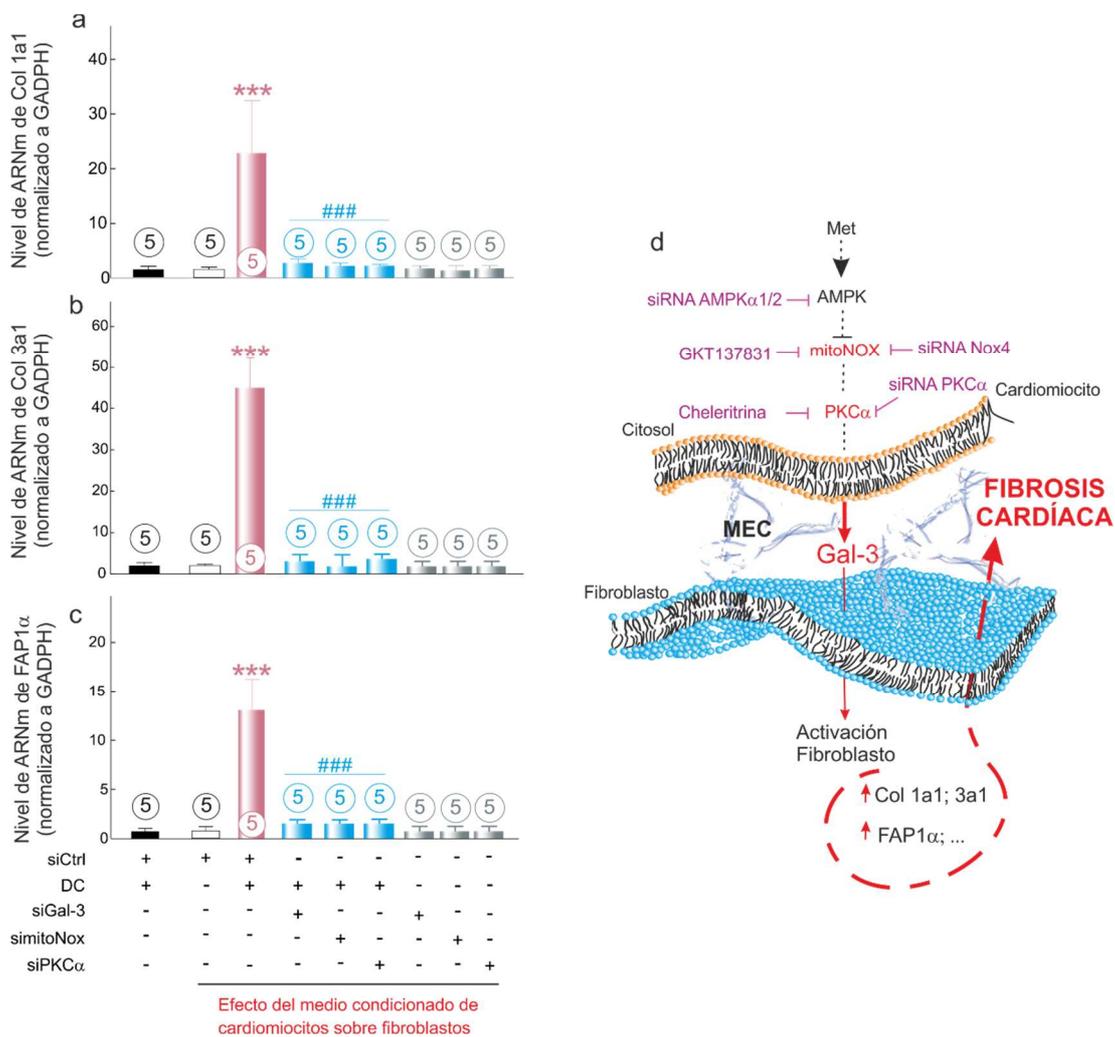


Figura 3.20. La Gal-3 secretada por los cardiomiocitos sometidos a deformación celular está implicada en la activación de los fibroblastos cardíacos. (a) Nivel de ARNm de Col1a1, (b) Nivel de ARNm de Col3a1, (c) Nivel de ARNm de FAP1 α ; los datos se han normalizado al nivel de ARNm de GADPH y se representan respecto al control (siCtrl). La barra negra a la izquierda

de cada uno de los paneles representa el valor de cada uno de los marcadores evaluados en fibroblastos sometidos a deformación, pero a los que no se adiciona el medio condicionado de cardiomiocitos. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de experimentos analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo siCtrl; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo siCtrl+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y se detallan en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

DISCUSIÓN

Los datos presentados en este estudio defienden la primera evidencia que relaciona el efecto cardioprotector de metformina con una disminución en la expresión de Gal-3 tras el IM. Nuestro estudio demuestra que la fosforilación del AMPK inducida por metformina activa a tuberina e inactiva la ruta de señalización intracelular mTORC1/p70S6K. Como resultado de este proceso se produce la inhibición de la enzima mitocondrial NADPH oxidasa 4 (mitoNox) y finalmente una disminución de la expresión y liberación de Gal-3 por el cardiomiocito. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que Gal-3, que es secretada por los cardiomiocitos en la fase aguda tras el IM, induce la activación de los fibroblastos.

Un conjunto cada vez mayor de evidencias sugieren que el tratamiento con metformina mejora la fibrosis adversa asociada al IM^{116,151,152}. Los datos presentados en nuestro estudio respaldaron este efecto y mostraron como el tratamiento con metformina a largo plazo es capaz de disminuir la expresión de diferentes marcadores pro-fibróticos en el miocardio infartado —tanto en la zona del borde del VI infartado como en la zona infartada del VI—. Además, nuestros resultados evaluaron un efecto inhibitorio de metformina sobre la proliferación de los fibroblastos, la formación de la cicatriz o la fibrosis intersticial —de nuevo tanto en el tejido de la zona del borde como del infarto— (Fig. 3.2 y 3.3). No obstante, a pesar de que las evidencias avalan el carácter antifibrótico de metformina tras el IM, el conocimiento de los mecanismos moleculares o de las

vías de señalización que podrían estar implicadas en este efecto antifibrótico, es bastante limitado. La originalidad del estudio que aquí se presenta reside en la caracterización de la base molecular que subyace al efecto beneficioso de metformina sobre la fibrosis cardíaca tras el IM, estableciendo la vía de señalización molecular involucrada en la modulación de la expresión de Gal-3 en la zona del borde del miocardio infartado. Además, el análisis de los datos obtenidos identificó una respuesta paracrina de la Gal-3 que es secretada por los cardiomiocitos sometidos a una deformación celular sobre los fibroblastos cardíacos adyacentes.

Sabemos que metformina al inhibir al complejo I de la cadena de transporte mitocondrial¹⁵³ favorece la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK α 1/ α 2), a través de un aumento en el grado de fosforilación del residuo Thr¹⁷² de la subunidad catalítica α ^{154,155}. Esta activación mejora la disfunción ventricular izquierda y la supervivencia en IC¹⁵¹ y previene la progresión de la IC en modelo experimental canino¹¹⁶. De hecho, algunos autores han descrito como la deficiencia de la enzima AMPK α 2 en ratones sometidos a una sobre-carga de presión induce un aumento de la hipertrofia ventricular izquierda¹⁵⁶. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de AMPK reduce la fibrosis cardíaca tras el IM¹⁵⁷. A pesar del interés e importancia que la activación de AMPK suscita como diana terapéutica, los estudios publicados hasta la fecha no han evaluado las vías de señalización relacionadas con el efecto antifibrótico asociado con su activación. Los resultados del presente estudio revelaron por primera vez una relación directa entre la activación farmacológica de AMPK por metformina y la inhibición de la expresión de Gal-3, lo que condujo a una mejora de la fibrosis cardíaca adversa tras el IM. De hecho, nuestros datos indicaron que el silenciamiento de AMPK en cardiomiocitos sometidos a un protocolo de deformación celular, bloqueaba la

activación de los fibroblastos cardíacos (Fig. 3.18); un efecto relacionado con una regulación negativa de la expresión y secreción de Gal-3 (véanse Figs. 3.17 y 3.20). Además, el presente estudio amplió nuestra comprensión del efecto cardioprotector de metformina al revelar la primera evidencia de que la fosforilación de AMPK por metformina induce la activación de tuberina, inactiva la vía mTORC1/p70S6K, lo que conduce a la inhibición de la enzima mitocondrial NADPH oxidasa 4 (mitoNox) y finalmente a una disminución de la expresión y secreción de Gal-3 (Figs. 3.15 y 3.16).

Un gran número de evidencias subrayan la implicación de las especies con oxígeno reactivo (EOR) en la fibrosis cardíaca tras un IM¹⁵⁸. Así varios trabajos incluido el publicado por Matsushima y cols. en 2006, destacan el papel fundamental de la enzima mitoNox como una de las principales fuentes productoras de EOR tras el IM^{158,159}. De hecho sabemos que un aumento en la expresión de la enzima mitocondrial mitoNox incrementa el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial; lo que promueve la fuga de electrones de la cadena respiratoria y consecuentemente un incremento en la liberación de EOR¹⁴⁷. Wang y cols., en 2014 mostraron como los niveles de ARNm y expresión de la enzima mitoNox estaban incrementados tras la inducción de un proceso de I/R, lo que contribuía a un aumento de la generación de EOR¹⁵⁹. De forma similar, Zhao y cols., describieron como un aumento en la expresión de la enzima mitoNox estaba asociado con un incremento en la producción de EOR y un empeoramiento del remodelado cardíaco inducido por Ang-II¹¹⁷. Los datos presentados en este estudio están en buena concordancia con los estudios anteriormente citados. De hecho, nuestros resultados mostraron que tras el IM se produce un aumento del nivel de ARNm y actividad de la enzima mitoNox, y un incremento del daño oxidativo en las áreas del borde y del infarto del VI (véanse Figs. 3.7, 3.8 y 3.9); efectos que

fueron prevenidos en presencia de metformina. Cabe destacar que este efecto cardioprotector de metformina ocurrió en el intervalo de tiempo donde el antidiabético indujo un incremento de los niveles de AMPK (Figs. 3.6 y 3.8) así como un descenso del nivel de ARNm y expresión de Gal-3 (Figs. 3.4 y 3.5).

Ciertamente, aunque existen dos estudios que relacionan la modulación de la expresión de AMPK con la actividad mitoNox, éstos lo hacen en el seno de la fibrosis pulmonar y renal y no en el IM^{160,161}. Bajo nuestro conocimiento, los datos presentados en este estudio son la primera demostración de una relación funcional entre la activación de AMPK, la vía de señalización tuberina/mTORC1, la activación de la enzima mitoNox y la secreción de Gal-3 tras el IM. De hecho, el análisis de nuestros resultados relacionó el incremento de la fosforilación de AMPK por metformina con una disminución de la expresión de la enzima mitoNox a través de la activación de tuberina, lo que bloqueó la señalización a través de la vía intracelular mTORC1/p70S6k (Figs. 3.15 y 3.16). Por otro lado, nuestros resultados demostraron que tuberina se sitúa aguas abajo de AMPK porque el silenciamiento génico de AMPK previno la fosforilación de tuberina. Además, el uso de rapamicina o el silenciamiento de p70S6K causó una disminución de la expresión de mitoNox y previno la secreción de Gal-3 (Figs. 3.15, 3.16). Estos resultados indican que la expresión de Gal-3 está en la misma secuencia de eventos y aguas abajo de la ruta de señalización mTORC1/p70S6K y mitoNox. Por otra parte, la sensibilidad de la activación de p70S6K a Rapamicina, un inhibidor selectivo para mTORC1, (Fig. 3.15) soporta el hecho de que p70S6K se sitúa aguas abajo de mTORC1.

Sabemos que mTORC1 participa en diferentes acciones intracelulares dentro de la biología celular¹⁶² y su actividad está fuertemente controlada por tuberina, —citada anteriormente como una diana de AMPK, y que actúa como

represor de mTORC1¹⁶³—. Datos publicados recientemente demuestran el papel que la señalización a través de la activación de mTORC1, juega en el sistema cardiovascular^{164,165}. Así por ejemplo, hay datos que determinan su activación en el IM y su contribución al remodelado ventricular^{166,167}. De forma similar, el análisis de nuestros resultados demostraron que bajo condiciones de estrés la ruta de señalización mTORC1/p70S6K está activada (Fig. 3.15, paneles d-f), mientras que tuberina se inactiva (Fig. 3.15, paneles a-c); lo que contribuye a la expresión de citocinas, la super-regulación de mitoNox (Fig. 3.15, paneles g-h) y la acumulación de MEC¹⁶⁸. Varias aproximaciones genéticas y farmacológicas han revelado que la inhibición de mTORC1 podría convertirse en una potente estrategia terapéutica para limitar no solo el tamaño de infarto sino también paliar el remodelado adverso del VI tras el IM^{166,167}. En nuestro estudio mostramos como metformina bloqueó la ruta de señalización a través de mTORC1 lo cual se asoció con una inhibición en la secreción de Gal-3 por cardiomiocitos sometidos a deformación (Fig. 3.16, panel c) y una disminución de la fibrosis cardíaca adversa tras el IM.

En concordancia con el estudio publicado por Berlin y cols., en 2007, nuestros datos determinaron un incremento del nivel de ARNm y actividad de PKC α tras el IM¹⁶⁹, un efecto que fue prevenido en presencia de metformina (Fig. 3.7, paneles d-f). Por otra parte, Song y cols., en 2015, usando un modelo *in vitro* de estrés biomecánico, aunque evaluaron la existencia de una relación entre la activación de PKC α con el aumento de la expresión de Gal-3, los autores no identificaron el mecanismo molecular asociado¹³⁵. Nuestro estudio describe la relación entre la modulación del AMPK inducida por metformina, el incremento de la expresión de mitoNox, la activación de la enzima PKC α y el aumento de la expresión de Gal-3 tras el IM. Así nuestros datos demostraron que el efecto

antifibrótico de metformina parece estar relacionado con la modulación de las actividades mitoNox y PKC α a través de la regulación de los niveles de AMPK ya que metformina previene su activación tras 4 semanas de tratamiento. Para confirmar esta hipótesis, usamos un cultivo primario de cardiomiocitos sometido a un procedimiento experimental de deformación celular¹⁴¹. En este modelo experimental el incremento del AMPK inducido por metformina previno la activación de mitoNox y PKC α , mientras que el silenciamiento del AMPK bloqueó el efecto preventivo de metformina sobre estas actividades enzimáticas; lo que condujo a un incremento del nivel de expresión de Gal-3 (Fig. 3.12), un aumento de EOR así como un descenso de la viabilidad y proliferación celular (Fig. 3.14). Además, el uso de inhibidores específicos para mitoNox (GKT137831) o PKC α (Quelerritrina) nos permitió reproducir el efecto preventivo de metformina (Fig. 3.12 y 3.14), lo cual confirma el papel de ambas enzimas en la modulación de la expresión de Gal-3 y en el daño oxidativo.

Aunque mitoNox y PKC α están involucradas en la regulación de la expresión de Gal-3, la jerarquía molecular no está clarificada. De hecho, en un modelo de cardiomiopatía diabética Thallas-Bonke y cols., mostraron como mitoNox esta involucrada en la activación de PKC α ¹⁷⁰. Por el contrario, Cosentino-Gomes y cols., en un trabajo publicado en 2012, propusieron que PKC α modula el remodelado del miocardio a través de la activación de mitoNox¹⁷¹. El estudio que aquí se presenta defiende que la expresión de Gal-3 se bloquea tanto por la inhibición de mitoNox, como también por la inhibición de PKC α (Fig. 3.12). Estos datos indican que la expresión de Gal-3 está en la misma secuencia de eventos y aguas abajo de mitoNox y PKC α . Por otra parte, la sensibilidad de PKC α a un inhibidor selectivo de mitoNox (Fig. 3.12, paneles a, b) indica que PKC α se sitúa aguas abajo de mitoNox. Para apoyar este argumento, procedimos primero a

silenciar la expresión génica de la enzima mitoNox o PKC α y a evaluar después sus actividades enzimáticas así como la expresión de Gal-3 (Figs. 3.13). De nuevo, los resultados obtenidos confirman la jerarquía molecular previamente descrita. Mientras que la ausencia de mitoNox bloqueó la activación de PKC α , el silenciamiento de PKC α no tiene efecto sobre la actividad mitoNox y como esperamos en ambos casos se bloqueó la secreción de Gal-3 al medio extracelular.

Aunque la relación entre metformina/AMPK y la enzima mitoNox también ha sido recientemente evaluada en un modelo de hipertensión¹⁷², particularmente en fibroblastos cardíacos, nuestros datos demostraron que bajo un protocolo de deformación celular —el cual simula experimentalmente las condiciones de deformación celular que aparece en el infarto de miocardio— ni mitoNox ni PKC α se activan en fibroblastos cardíacos (datos no mostrados). Por lo tanto, los fibroblastos cardíacos no son los responsables de disparar ninguno de los eventos descritos, al menos inicialmente. Los datos presentados en nuestro estudio sugieren un efecto temprano de los propios cardiomiocitos sobre los fibroblastos cardíacos.

Mediadores solubles que son secretados por los cardiomiocitos bajo estrés biomecánico activan a los fibroblastos cardíacos.

Con el objetivo de identificar la existencia de una plausible acción paracrina entre cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos, diseñamos un modelo experimental que nos ha permitido co-cultivar ambos tipos celulares. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados en este sistema experimental nos permiten defender la existencia de una acción directa de la Gal-3 secretada por los cardiomiocitos en la activación de los fibroblastos (Figs. 3.17 y 3.18). En este contexto es importante citar como otros estudios, usando un modelo experimental de fibrosis hepática, también han evaluado la implicación de Gal-3 en la activación de fibroblastos^{129,173}. Cabe señalar en este punto que nuestras condiciones

experimentales de estrés biomecánico producen una acción diferenciada sobre ambos tipos celulares. De hecho, mientras que nuestras condiciones de deformación celular sobre los cardiomiocitos indujeron su activación no lo hicieron sobre los fibroblastos cardíacos. Nuestros resultados mostraron que el cocultivo de los fibroblastos cardíacos con el sobrenadante obtenido de cardiomiocitos sometidos a estrés biomecánico, el cual contiene altos niveles de Gal-3 (Fig. 3.17), indujo su activación en términos de un aumento en la expresión de los niveles de Col 1a1, Col 3a1 y FAD1 α (Fig. 3.18). El sobrenadante que contiene bajos niveles de Gal-3 no causa ningún efecto sobre los fibroblastos cardíacos. Bajo nuestro conocimiento nuestros resultados son los primeros que muestran que la Gal-3 secretada por los cardiomiocitos induce la activación de los fibroblastos cardíacos. De hecho, cuando usamos medio condicionado procedente del cultivo de cardiomiocitos donde la expresión de Gal-3 había sido silenciada genéticamente antes de inducir la deformación celular, los fibroblastos cardíacos no se activaron (Fig. 3.19). Por tanto, nuestros resultados avalan el hecho de que Gal-3 que se secreta por los cardiomiocitos en respuesta a una deformación celular, es la responsable del efecto paracrino observado sobre los fibroblastos cardíacos. Como era de esperar, el uso del medio condicionado procedente de cardiomiocitos bajo deformación celular, donde la expresión de mitoNox o PKC α fue silenciada, tampoco indujo la activación de los fibroblastos (Fig. 3.20). Este resultado avala de nuevo el hecho de que Gal-3, que está en la misma secuencia de eventos y aguas abajo de mitoNox y PKC α , es la responsable de la activación de los fibroblastos cardíacos.

Por otra parte y basándonos en un estudio publicado recientemente donde usan un modelo de hipertensión¹⁷⁴, otra cuestión importante fue evaluar si bajo nuestras condiciones experimentales de deformación celular los fibroblastos

pueden expresar y liberan Gal-3 al medio extracelular. Los datos del presente estudio indican que los fibroblastos no expresan ni liberan Gal-3 al medio extracelular (dato no mostrado) ni tampoco son activados (Figs. 3.18 y 3.20) bajo nuestras condiciones experimentales. Extrapolando estos resultados a la zona del borde del miocardio infartado, podemos afirmar que los cardiomiocitos sometidos a una deformación celular liberan Gal-3 al medio, al menos en la etapa más aguda del daño, lo que conduce a la activación de los fibroblastos y al desarrollo consecuente de la fibrosis adversa tras el IM.

En resumen, nuestro estudio demuestra que el aumento de la expresión y actividad de AMPK inducido por metformina inhibe la fibrosis adversa cardíaca tras el IM al bloquear la expresión de Gal-3 a través de la inhibición de la vía de señalización mitoNox/PKC α lo que conduce a un bloqueo en la activación de los fibroblastos. Nuestros datos proporcionan además un conocimiento novedoso sobre el mecanismo molecular asociado al efecto cardioprotector de metformina. En este sentido, nuestros resultados permiten avalar la vía mitoNox/PKC α /Gal-3 como una de las principales contribuyentes al desarrollo de la fibrosis adversa en la remodelación cardíaca tras el IM. Por otra parte, nuestro estudio defiende que los cardiomiocitos se establecen como uno de los elementos principales en la activación de los fibroblastos cardíacos en la zona del borde del VI infartado. La expresión y liberación de Gal-3 por el cardiomiocito activa a los fibroblastos e induce el programa fibrótico adverso en la zona del borde. Por lo tanto, defendemos que la manipulación genética o farmacológica específica de la vía de señalización intracelular mitoNox/PKC α /Gal-3 en cardiomiocitos puede ser una nueva diana terapéutica para prevenir el remodelado adverso tras el IM.

Perspectivas clínicas y conclusiones

Diversos estudios clínicos proporcionan numerosas pruebas del valor de Gal-3 como biomarcador en la IC. En la población general, se ha observado que una elevación sostenida de los niveles de Gal-3 puede contribuir a un mayor riesgo cardiovascular, mortalidad e IC. Nuestros datos aportan valor al papel de Gal-3 en el remodelado cardíaco adverso, así como a su papel potencial como objetivo terapéutico. En la actualidad, se están diseñando nuevos estudios cuyo objetivo es caracterizar que papel tienen los inhibidores de Gal-3 en la IC. Debido a que los altos niveles de Gal-3 pueden predisponer al desarrollo de IC, es imprescindible el desarrollo de nuevas terapias que estén dirigidas a disminuir la expresión de Gal-3 en el miocardio infartado. Tomados en conjunto nuestros resultados, sugerimos que metformina posiblemente a través de su inhibición de la enzima NADPH oxidasa 4, bloquea la activación de PKC α , lo que lleva a una disminución de la expresión de Gal-3 y a bloquear la activación de los fibroblastos. Postulamos que la terapia dirigida contra la expresión de Gal-3 en cardiomiocitos, podría potencialmente servir como un apéndice útil en el tratamiento de la IC. Además, el hecho de que los resultados obtenidos en las zonas del borde y del infarto sean similares sugiere la participación de un mecanismo similar en el proceso evaluado, aunque clínicamente los resultados obtenidos en la zona del borde del miocardio infartado tienen mayor relevancia.

Este estudio tiene varias limitaciones que deben señalarse. Primero, aunque nuestro estudio ha evaluado un efecto de metformina sobre los niveles de ARNm de AMPK, se necesitan estudios adicionales que nos permitan determinar los mecanismos involucrados en este proceso. Además, datos recientes han demostrado que metformina mejora el daño cardíaco por estrés del retículo sarcoplásmico¹⁷⁵. Nuestro estudio no ha evaluado la participación del retículo

sarco-endoplásmico en el daño observado ni su relación con metformina. Finalmente, la inhibición específica de la enzima PKC α previene la producción de EOR sin afectar mitoNox; también en este caso son necesarios estudios adicionales para evaluar los mecanismos moleculares involucrados.



Cours la Reine, Paris (France). Michael Kenna

4



El factor de transcripción Yin-yang 1 modula la expresión de la isoforma circulante soluble del ST2 durante el remodelado adverso tras el infarto de miocardio



RESUMEN

Antecedentes. Las vías de señalización relacionadas con el efecto cardioprotector de metformina no están bien definidas. Datos publicados recientemente demuestran como la señalización intracelular a través del eje IL-33/ST2L es cardioprotectora, la cual se bloquea en presencia de altas concentraciones de la isoforma soluble y circulante del ST2 (sST2). Actualmente, no hay datos que hayan evaluado los mecanismos implicados en la regulación del gen responsable de la expresión del sST2. El objetivo global de este estudio ha sido evaluar la implicación fisiopatológica del factor de transcripción Yin-yang-1 (Yy1) sobre el remodelado cardíaco adverso atendiendo a su efecto sobre la expresión de la isoforma soluble sST2 en el miocardio infartado.

Métodos y resultados. La inducción del infarto de miocardio se realizó sobre ratas SD que fueron aleatoriamente distribuidas en grupos para el tratamiento con metformina o con solución salina. En paralelo, se usó un modelo de deformación celular para inducir un estado simulado de hipertrofia sobre cardiomiocitos en cultivo. La administración de metformina mejoró el remodelado cardíaco adverso tras el infarto de miocardio, un efecto que se asoció con un incremento de los niveles de IL-33 y una disminución de la expresión de la isoforma soluble sST2 en el miocardio infartado. Este efecto cardioprotector de metformina se asoció también con una disminución de los niveles intranucleares del factor de transcripción Yy1 y con una disminución de la forma fosforilada de la deacetilasa HDAC4 en el citosol. Esta respuesta cardioprotectora se observó también en el modelo de deformación celular, donde el silenciamiento del factor de transcripción Yy1 ó la inhibición de HDAC4 bloqueó la expresión y secreción de la isoforma sST2. La terapia con metformina bloqueó la fosforilación de HDAC4 inducida por el infarto de miocardio, impidiendo el transporte de esta proteína desde núcleo

hasta el citosol. La forma desfosforilada de HDAC4 en el núcleo actúa como un co-represor del factor Yy1 reprimiendo la expresión de sST2.

Conclusiones. El factor de transcripción Yy1 regula la expresión de la isoforma soluble sST2 y el efecto represor de metformina sobre la expresión de Yy1 tiene como resultado una disminución de los niveles de sST2, lo que se asocia con una mejora en el remodelado cardíaco adverso tras el infarto de miocardio. La manipulación de la expresión génica del factor de transcripción Yy1 ó de su co-represor HDAC4 emerge como nuevas dianas para modular la señalización IL-33/ST2L y prevenir el remodelado cardíaco adverso tras el infarto de miocardio.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares causan la muerte de al menos uno de cada tres pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)¹⁷⁶. Debido a este hecho, el control de los factores de riesgo cardiovascular es de vital importancia para el tratamiento de este grupo de pacientes, más allá del control glucémico. La terapia con metformina se sigue considerando en la actualidad como uno de los tratamientos más seguros, eficaces y coste-efectivo como primer escalón terapéutico frente a la DM2^{177,178}. Además de tener pocos efectos adversos, metformina posee propiedades adicionales que van más allá del control glucémico. Un estudio experimental publicado por Yin y cols., en 2011 utilizando un modelo de rata no diabética, demostró que la terapia con metformina limita el tamaño del IM y previene la remodelación cardíaca adversa⁸⁷. Sin embargo, a pesar de los efectos cardioprotectores asociados al tratamiento con metformina, los mecanismos moleculares asociados con estos efectos beneficiosos sobre el miocardio son controvertidos y limitados.

ST2 (*Supresor de la Tumorigenicidad 2*) es un miembro de la familia de receptores de la interleucina (IL)-1 que tiene cuatro isoformas identificadas, de las que dos están directamente implicadas en la enfermedad cardíaca: un receptor unido a la membrana (ligando ST2 [ST2L]) y una isoforma soluble circulante del ST2 (sST2)¹⁷⁹. La interleucina (IL)-33 es una citocina sintetizada en respuesta a estrés biomecánico, cuya unión con el receptor ST2L⁷⁶ desencadena una respuesta cardioprotectora¹⁸⁰ asociada con el bloqueo de la fosforilación de la proteína IκBα así como la inactivación del factor NF-κB, en términos de translocación de su subunidad p65 desde el citosol al espacio intranuclear¹⁸¹. Sabemos que la isoforma soluble y circulante del ST2 (sST2) actúa como un receptor señuelo, debido a que puede unirse directamente a IL-33 bloqueando su unión con el receptor de

membrana ST2L y con ello impidiendo la señalización intracelular cardioprotectora activada por la interacción IL-33/ST2L¹⁸⁰. Diversos estudios *in vitro* han mostrado como la expresión de la isoforma sST2 está incrementada en cardiomiocitos sometidos a estrés biomecánico celular¹⁰², y dicha expresión está relacionada con hipertrofia cardíaca, fibrosis, así como con disfunción ventricular izquierda¹⁸⁰⁻¹⁸². Debido a que la señalización a través del eje molecular IL-33/ST2L está asociada con múltiples enfermedades, esta vía se ha convertido en un nuevo objetivo terapéutico¹⁸³.

La expresión diferencial de las isoformas ST2L y sST2 es el resultado de la modulación de la actividad de una región promotora dual presente en el gen *IL1RL1*, que es dependiente del tipo celular. A pesar de que este promotor dual contiene secuencias que pueden ser reconocidas por múltiples factores de transcripción¹⁰², actualmente se desconocen los elementos moleculares implicados en la regulación de la expresión específica de la isoforma soluble sST2 en el miocardio infartado. En este sentido, datos bibliográficos nos han permitido seleccionar a Yin-yang 1 (Yy1) como un factor de transcripción con capacidad para interactuar con el promotor del gen *IL1RL1* y de esta forma modular de forma específica la expresión del sST2¹⁸⁴. Yy1 es una proteína de dedo de zinc versátil y multifuncional, que pertenece a la familia humana de proteínas nucleares *GLI-Kruppel* con un papel fundamental en los procesos biológicos normales, como el desarrollo, diferenciación, replicación y proliferación celular¹⁸⁵, y está cada vez más vinculada con condiciones patológicas. De hecho, varios estudios han evaluado el papel de Yy1 en la remodelación cardíaca adversa^{186,187}. Yy1 puede iniciar, activar o reprimir la transcripción génica, dependiendo de su interacción con otros cofactores disponibles^{188,189}. De esta forma, se ha demostrado que su

interacción con la histona deacetilasa HDAC4 al promotor, reprime la transcripción del gen diana¹⁹⁰.

El aumento de la concentración de Ca²⁺ en el citosol del cardiomiocito tras el IM activa la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina (CaMKII), la cual fosforila a la histona HDAC4. El aumento del estado de fosforilación de esta histona facilita su exportación desde el núcleo hasta el citosol donde permanece retenido^{191,192}. En condiciones basales —el estado de fosforilación de HDAC4 es bajo— la histona permanece desfosforilada en el núcleo y actúa como un co-represor del factor de transcripción Yy1 reprimiendo la transcripción del gen diana¹⁹³.

A pesar de lo anteriormente expuesto, la implicación del factor de transcripción Yy1 en la modulación de la expresión específica de la isoforma soluble sST2 tras el IM no se ha estudiado. El objetivo de este estudio ha sido por un lado evaluar si los efectos cardioprotectores asociados al tratamiento con metformina están relacionados con la activación de la vía de señalización IL-33/ST2L y caracterizar los factores que regulan la expresión diferencial de la isoforma soluble sST2, centrándonos en el factor de transcripción Yy1 y su co-represor HDAC4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones éticas del estudio y modelo animal

El estudio se realizó en ratas adultas *Sprague-Dawley* (SD) macho de 6 semanas de edad, adquiridas de ENVIGO RMS, SL (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron —en el animalario de la Universidad de Murcia, edificio CEIB— en condiciones constantes de temperatura ~22 °C, ciclo de luz/oscuridad de 12 h, humedad relativa del 60 % y alimentados *ad libitum* con dieta de pienso

especial para animales de laboratorio y con libre acceso al agua destilada. Tras su llegada a nuestras instalaciones los animales permanecieron siete días en adaptación, antes de su manejo. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Experimental de la Universidad de Murcia (número de permiso: A13150105), y todos los experimentos se desarrollaron siguiendo la normativa vigente para el uso y cuidado de animales de experimentación.

Modelo experimental animal

Tal y como se ha detallado en el *Capítulo 2* y descrito en el *Capítulo 3* de esta memoria de Tesis Doctoral, el IM se indujo sobre ratas macho de 6 semanas mediante ligación de la arteria Coronaria Anterior Descendente Izquierda (CADI). A los animales del grupo control se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico excepto que la arteria CADI no fue ocluida. La monitorización electrocardiográfica se utilizó para confirmar la elevación del segmento ST, tras la ligación de la arteria CADI. Tal como se citó en el *Capítulo 2* de esta memoria, la mortalidad postoperatoria fue del 22 % durante las primeras 48 h, después de la cual no falleció ningún animal.

Grupos y diseño experimental

Tras la realización del proceso quirúrgico, los animales que sobrevivieron se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales: (1) un grupo control tratado con placebo (NaCl al 0,9 % (p/v)), en bloques de gelatina) (grupo control, n =10); (2) un grupo infartado tratado con placebo (grupo IM, n = 20); (3) un grupo infartado tratado con metformina (metformina a una dosis diaria oral de 250 mg/kg, en bloques de gelatina) (grupo IM+Met, n = 20); y (4) un grupo control

tratado con metformina (grupo control+Met, n=10). La pauta y tiempo de administración de metformina —adquirida de *Merck* con referencia comercial (D150959)— y una justificación de la dosis usada se detallan en el *Capítulo 3* de esta memoria. Al sacrificio y con el animal anestesiado (1 % de isoflurano suplementado con 100 % de O₂), la zona del borde del VI infartado se aisló de forma cuidadosa y se procesó para su posterior análisis. En el *Capítulo 2* se detalla el procedimiento experimental realizado para su aislamiento. La concentración de metformina en plasma se cuantificó por HPLC en el momento del sacrificio (1,0 ± 0,05 nM a la semana 1 y 1,3 ± 0,06 mM a las 4 semanas tras el IM).

Preparación de las secciones del corazón y medida del tamaño del infarto

En diástole, los corazones fueron tratados para evaluar el tamaño del infarto —siguiendo el desarrollo experimental descrito en el *Capítulo 2*— medido como el porcentaje del tamaño del infarto circunferencial (tamaño del IM) dividido por el tejido total del VI: % del tamaño del infarto = (área del infarto/área total del VI) ×100.

Inmunohistoquímica

Los niveles de expresión de las proteínas sST2 y Yy1 en la zona del borde del VI infartado se evaluaron por inmunohistoquímica siguiendo el procedimiento experimental descrito con detalle en el *Capítulo 2*. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4 °C y sin agitación. La dilución para los anticuerpos contra sST2 (11920-1-AP; *Proteintech, Chicago, IL, EEUU*) así como para Yy1 (sc- 7341; *Santa Cruz Biotechnology*) fue 1:500. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Se usó un solo tipo de anticuerpo secundario —teniendo en cuenta la especie de la que

procede el anticuerpo primario usado— anti-IgG de conejo biotinilado (*Dako EnVision*) que se usa a una dilución 1:200. Las proteínas de interés fueron identificadas mediante reacción con 2-2´diaminobencidina (DAB). La inmunotinción positiva se identificó como un precipitado citoplasmático de color marrón oscuro. Se obtuvieron imágenes de alta resolución a través de microscopio Leica SN400F (*Leica Microsystems, Gateshead, Reino Unido*).

Cultivo y modelo de deformación celular

La línea celular H9c2 procedente de miocitos embrionarios de corazón de rata^{100,194}, se usó como modelo *in vitro* por mostrar respuestas hipertróficas similares a las observadas en cardiomiocitos primarios adultos y neonatales¹⁹⁵. Esta línea celular [H9c2 (2-1) (ECACC 88092904)] fue adquirida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (www.ecacc.org.uk). El cultivo celular se mantuvo a 37 °C y atmósfera húmeda con un contenido en CO₂ ajustado al 5 % (véase *Capítulo 2*). El medio de cultivo completo fue: DMEM suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 µg/ml¹⁹⁶. Las células se subcultivan o se utilizan para realizar los experimentos al alcanzar una confluencia aproximada del 70-80 %.

La inducción de un estado experimental de hipertrofia simulada —que nos permita conseguir un estado de deformación celular sostenido en el tiempo— se realizó en ausencia de suero fetal bovino y antibióticos y en presencia de 0,2 µM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) y 0,4 µM del ionóforo de Ca²⁺ A23187 durante 6 h, tal como se ha descrito en otros estudios experimentales¹⁰²⁻¹⁰⁶. Los cardiomiocitos en DMEM se preincubaron con metformina 4 mM durante 24 h ó con KN-93 1 µM por 30 min, y se mantuvieron a 37 °C en un incubador de CO₂ antes de la co-estimulación con la mezcla PMA+A23187.

Silenciamiento con siRNA

Con el fin de silenciar la expresión endógena del factor de transcripción Yy1 ó de la deacetilasa HDAC4 se sembraron $\sim 2 \times 10^5$ células H9c2 por pocillo en una placa de 6 pocillos —en las condiciones estándares de cultivo celular—, 2 días antes de iniciar el protocolo de silenciamiento. Se utilizaron ON-TARGET plus™ SMARTpool® siRNAs (*GE Dharmacon, Thermo Fisher Scientific*), que son una mezcla comercial de 4 siRNAs dirigidos contra secuencias distintas del mismo ARNm y que permiten por un lado una mayor eficiencia de reducción de los niveles de ARNm diana, así como un menor efecto *off-target*.

De forma específica, las células fueron transfectadas con *ON-TARGET plus™ SMARTpool® siRNAs* (*Dharmacon, Lafayette, CO*) contra: (1) Yy1 (L-091624-02-0005)¹⁹⁷ (siYy1); (2) HDAC4 (L-084748-02) (siHDAC4); ó (3) con *ON-TARGETplus™ Non-targeting pool* como control negativo (D-001810-10-05) (siCtrl), a una concentración final de 20 nM usando Lipofectamina 2000 como reactivo de transfección —de acuerdo con las instrucciones del fabricante—. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 8 h, tras las cuales se adicionó medio de cultivo completo en ausencia de antibióticos durante otras 48 h. Las células transfectadas se lavaron tres veces con DPBS a 37 °C antes de ser co-estimuladas con la mezcla PMA+A23187 durante 6 h (véase página 186; protocolo de hipertrofia descrito anteriormente).

Medida del tamaño del cardiomiocito mediante el uso de ³H-Leucina

Para medir el tamaño de los cardiomiocitos, se calculó el área de la superficie celular utilizando el software *ImageJ*, y seleccionando 20 cardiomiocitos por campo de forma aleatoria (n=5/experimento). Para evaluar el efecto de la incorporación de [³H]-leucina, las células fueron tratadas con 1 μCi/ml [³H]-Leucina (*PerkinElmer*) durante 24 h, lavadas después con DPBS a 37 °C y fijadas con ácido tricloroacético al 10 % (p/v) durante 45 min a 4 °C en agitación orbital. La señal de radiactividad se evaluó mediante el uso de un contador de centelleo líquido (*Beckman Coulter*). Como controles para el anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra ST2L y para la proteína de fusión sST2-Fc —obtenidos de *R&D Systems* y con referencias MAB10041 y 1004-MR-050, respectivamente—, se usó una IgG2a sin modificar de rata y la proteína de fusión *IL1-1R-related protein 2-Fc* —obtenidos de *R&D Systems* o *abcam* y con referencias MAB006 y ab83575, respectivamente—.

Protocolo de inmunofluorescencia para evaluar la forma activa de Yy1

Las células fueron sembradas a una densidad de $\sim 4 \times 10^5$ células/placa en placas de cultivo de vidrio de 35 mm de Ø —en medio de cultivo completo a 37 °C en el incubador de CO₂—, 2 días antes de iniciar el protocolo experimental. El medio de cultivo de cada una de las placas de retiró antes de lavar las células tres veces con DPBS a 37 °C, antes de inducir la deformación celular. Células tratadas y células no tratadas —control— se fijaron con formaldehído al 4 % (p/v) durante 15 min antes de permeabilizarlas con TX-100 al 0,1 % (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente y se expusieron al intensificador de señal *Image-iT™ FX* (véase *Capítulo 2*). A continuación, las células se incubaron a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo anti-Yy1 (dilución 1:100) y el anticuerpo anti-γ-Tubulina

(dilución 1:100) y posteriormente a 37 °C durante 1 h con anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor® 488 (dilución 1:200) y anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 593 (dilución 1:200). La señal de fluorescencia de las células se analizó con un equipo de microscopía confocal de Leica *Microsystems* formado por microscopio invertido DM IRE II acoplado a una cabeza de barrido confocal modelo TCS SP2. Se usó un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO de 63× con una apertura numérica de 1,32. Alexa Fluor® 488 se excitó con un laser de argon mientras que para Alexa Fluor® 593 se empleó el laser GreNe. Los rangos correspondientes de longitud de onda de emisión fueron 508-550 nm y 610-650 nm, respectivamente. La apertura confocal fue de 140 µm, lo que proporcionó un plano z de 1,1 µm de espesor. Los núcleos se marcaron usando DAPI como sonda fluorescente (véase *Capítulo 2*).

Extracción de ARN y PCR cuantitativa

Sobre una placa de Petri y en baño de hielo ~30 mg de tejido —procedente de la zona del borde del VI infartado—, se lavó primero con DPBS frío antes de ser cortado en pequeños fragmentos. De forma similar, cardiomiocitos en cultivo fueron lavados primero tres veces con DPBS en cámara fría, y concentrados por centrifugación a 16.000 ×g durante 1 min a 4 °C. En el *Capítulo 2* se detalla el procedimiento experimental de extracción tanto de tejido como de células. El ARNm se aisló mediante el uso del kit comercial *Dynabeads mRNA Direct* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EEUU). El cDNA se sintetizó utilizando el kit comercial *GeneAmp® RNA PCR Core Kit* (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la RT-PCR se usó la sonda fluorescente *SYBR Premix Ex Taq* (Takara Biothecnology, Dalian, China) en un sistema *LightCycler* (Roche). La eficiencia

de cada par de primers fue evaluada usando diluciones seriadas de cDNA. En este sentido, 0,5-2 μ l de cDNA se amplificaron usando un protocolo establecido de 40 ciclos de PCR cuantitativa (10 s a 95 °C, 10 s a 60 °C y 15 s a 72 °C), seguido de un periodo de disociación para estar seguros de que solo se amplifica un solo producto. Las secuencias de los *primers* utilizados se describen en la tabla 2.8 del *Capítulo 2*.

Aislamiento de la fracción proteica total

Para el aislamiento de la fracción proteica total, ~30 mg de tejido procedente de la zona del borde del VI infartado o del precipitado aislado de $\sim 8 \times 10^6$ células tratadas o células no tratadas, fueron homogeneizados por sonicación y centrifugados a 20.000 $\times g$ a 4 °C durante 20 min en medio de extracción de proteínas totales (véase *Capítulo 2*). El sobrenadante fue alicuotado y congelado de forma inmediata a - 80 °C. La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico¹⁰⁷.

Fraccionamiento subcelular

Los procedimientos experimentales llevados a cabo con el objetivo de aislar la fracción nuclear y citosólica de los tejidos procedentes la zona del borde del VI infartado o de células tratadas o células no tratadas, se basó en el procedimiento descrito por Dimauro y cols. con algunas modificaciones¹⁹⁸ (véase *Capítulo 2*).

Co-inmunoprecipitación de los complejos Yy1-HDAC4 a partir de extractos nucleares y western blot

Para la co-inmunoprecipitación del complejo Yy1-HDAC4, 400 µg de proteína —procedente de extractos nucleares aislados a partir de tejido de la zona del borde del miocardio infartado o de extractos nucleares de cardiomiocitos en cultivo—, fue incubada con anti-HDAC4 (5392; *Cell signaling Tech.*) a 4 °C durante toda la noche y con agitación suave por balanceo. Al día siguiente se añadieron 20 µl de suspensión de bolitas de sefarosa recubiertas de proteína A y las muestras se incubaron a 4 °C durante 4 h con agitación suave. A continuación, las bolas se lavaron tres veces con medio de inmunoprecipitación (IP) compuesto por: HEPES 20 mM, pH 7,4, EDTA 0,5 mM, NaCl 150 mM y TX-100 al 0,1 % (v/v) —para eliminar posibles componentes reactivos no específicos—. Para cada lavado, las bolitas se mezclaron suavemente con medio IP y se centrifugaron a 4 °C. El complejo formado antígeno-anticuerpo se separa de las bolitas por calentamiento de las muestras en 25 µl de medio de desnaturalización durante 4 min. Para analizar el inmunoprecipitado mediante transferencia *western*, las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE continuo al que se le aplicó una corriente constante de 30 mA durante 2 h. La interacción entre ambas proteínas se analizó mediante western blot usando un anticuerpo primario contra Yy1 (sc-7341; *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). Como controles positivos, utilizamos: (1) proteína Yy1 recombinante purificada (*NOVUS Biologicals (NBP2-51866)*); y (2) lisado nuclear procedente de células *knockdown* para Yy1 y tratadas con metformina antes de la co-estimulación con PMA+A23187. Como control negativo las bolitas se mezclaron con lisado proteico, en ausencia de anticuerpos.

Detección de proteínas por Western blot

La separación y detección de proteínas de las muestras previamente aisladas se llevó a cabo mediante el desarrollo de ensayos western blot (véase *Capítulo 2*). Las bandas de proteína se detectaron mediante reacción de quimioluminiscencia con el reactivo *ECL Primer de Amersham Biosciences* (RPN2232) utilizando un equipo para análisis y documentación de geles ChemiDoc XRS+ acoplado al software *Image Lab* de Bio-Rad (*Berkeley, CA, EEUU*). Para el análisis cuantitativo de las bandas de proteína se usó el software *Gel-Pro Analyzer v3.1* (*Merck KGaA, Alemania*). La eficacia de la transferencia se comprobó usando marcadores preteñidos de peso molecular: (1) *See Blue™ Plus2* (LC5925) de *Life technologies* —para seguimiento de proteínas de bajo/medio peso molecular—; o (2) *Precision Plus Protein™ Dual Color Standars* (1610374) de *BioRad* —para el seguimiento de proteínas de alto peso molecular—. Como control de carga se utilizó: (1) para la fracción proteica total y citosólica el anticuerpo primario anti-GADPH; y (2) para la fracción proteína nuclear el anticuerpo primario anti-TBP. Las referencias, casa comercial y las diluciones para los anticuerpos primarios usados, se resumen en la tabla 2.4 del *Capítulo 2*.

Protocolo de stripping de Western Blot

Para la detección de una segunda proteína con otro anticuerpo primario diferente, las membranas se lavaron cuatro veces a temperatura ambiente durante 5 min cada vez con TBST y se incubaron en agitación durante 30 min a 50 °C en medio de *stripping* formado por: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS al 2 % (p/v) y 700 µl de β-mercaptoetanol. A continuación, las membranas se lavaron seis veces durante 5 min cada vez con TBST antes de iniciar el procedimiento de bloqueo de la membrana.

Determinación de la concentración extracelular de sST2 y NT-proBNP

La concentración de la isoforma soluble sST2 y de NT-proBNP tanto en suero como en el sobrenadante celular, se midieron usando los *kits* de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de MyBioSource.com (*San Diego, California, EEUU*) con referencia MBS031741 y MBS9425692, respectivamente. El blanco, los estándares diluidos y las muestras se adicionaron a una placa de 96 pocillos que se mantuvo a 37 °C durante 90 min. La absorbancia se determinó a 450 nm usando un lector de placas CLARIOstar®, (*BMG Labteck, Ortenberg, Alemania*). En ambos casos, la precisión intraensayo y la precisión entre ensayos fueron inferiores al 10 %.

Análisis estadístico

Los datos se han presentado como media \pm error estándar de la media. Para evaluar la normalidad de las variables se ha utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias globales entre grupos se han estudiado mediante la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente, para ver diferencias respecto al grupo control, se han realizado comparaciones múltiples con el método de Siegel-Castellan. En el caso de los animales no infartados también se estudiaron correlaciones de forma no paramétrica con el método de Kendall. Todos los análisis se han realizado con el software estadístico SPSS versión 22 (*IBM Corp., Armonk, NY, EEUU*), y todos los gráficos presentados con el software SigmaPlot versión 11.0. La significancia estadística se fijó en 0,05

RESULTADOS*Estudio del efecto protector de metformina sobre el miocardio infartado*

Tal como se describió en el *Capítulo 3* de esta memoria de Tesis Doctoral, el IM estuvo asociado con una alteración de la estructura y función del miocardio, que se previno cuando los animales fueron tratados con metformina durante 1 y 4 semanas después del IM (Fig. 4.1; véase Fig. 3.1 en *Capítulo 3*). En este contexto, estudiamos el efecto de metformina sobre el proceso inflamatorio activado en la zona del borde del VI infartado; evaluando en primer lugar la expresión espacio-temporal de diferentes marcadores pro-inflamatorios mediante PCR cuantitativa e inmunohistoquímica (Fig. 4.2).

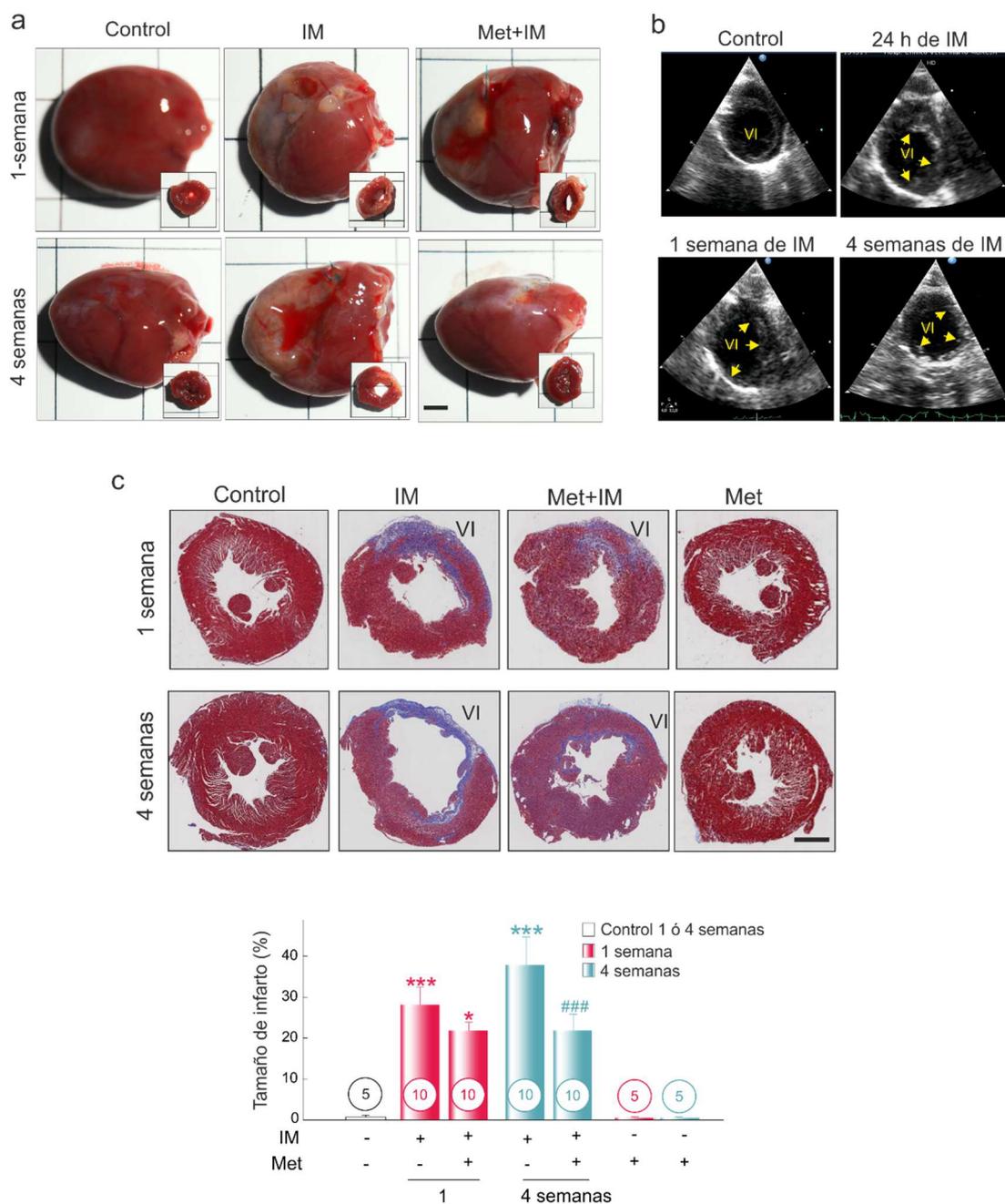


Figura 4.1. Efecto de metformina sobre el tamaño de IM. (a) Imágenes representativas de un corazón de rata completo y secciones del VI infartado captadas a 1 ó 4 semanas después de la cirugía y tratadas, o no, con metformina. (b) Ecocardiogramas bidimensionales de eje corto del VI de ratas control y tras el IM. El panel superior izquierdo corresponde a ratas control, —el VI aparece redondeado con borde endocárdico liso—. Los paneles superior derecho e inferior izquierdo son IM: tras 24 h (superior derecho) y 1 semana después del IM (inferior izquierdo), —se muestra un adelgazamiento de la pared e hiperecogenicidad del miocardio (flechas). Finalmente, el panel inferior derecho corresponde a ratas con IM de 4 semanas de evolución —el miocardio infartado aparece delgado e hiperecoico (flechas) con una cicatriz en la pared libre del

VI. (c) (Arriba) Secciones transversales de miocardio teñido con tricrómico de Masson para cuantificación del tamaño de IM a 1 y 4 semanas; Las áreas ricas en colágeno (cicatriz) aparecen en color azul mientras que el miocardio sano aparece de color rojo. La barra de escala equivale a 0,5 cm. (Inferior) Cuantificación del tamaño del infarto (porcentaje del tamaño del infarto circunferencial (tamaño del IM) dividido por el tejido total del VI). En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0,001$ comparado con el grupo IM. IM: infarto de miocardio; Met: metformina; VI: ventrículo izquierdo.

Al comparar los resultados obtenidos en la zona del borde del VI infartado —procedente de corazones infartados de 1 y 4 semanas de evolución— con los analizados en el VI de animales control, observamos un incremento significativo de los niveles de ARNm de TNF- α , MCP-1 e IL-6 (Fig. 4.2, paneles a-c). Los resultados mostraron una disminución significativa de los niveles de ARNm de estos marcadores cuando los animales fueron tratados con metformina durante 1 ó 4 semanas tras el IM. Además, la inflamación en la zona del borde del VI infartado y en comparación con el grupo control, está caracterizada por una infiltración de macrófagos ($p < 0,001$) que se evaluó como un incremento de la señal CD-68 positiva mediante inmunohistoquímica (Fig. 4.2, panel d). El análisis de los datos obtenidos demostró también que el tratamiento con metformina durante 4 semanas tras el IM estaba asociado con una reducción significativa de la población de macrófagos en la zona del borde del VI infartado ($p < 0,001$). El efecto del tratamiento con metformina durante 1 ó 4 semanas en animales sometidos a cirugía, pero sin causar ligación también se evaluó y no indujo ningún cambio en los parámetros inflamatorios evaluados (Fig. 4.2). Además, y como se describió en el *Capítulo 3* de esta memoria, el tratamiento con metformina durante 4 semanas en ratas infartadas, previno la fibrosis cardíaca y bloqueó la muerte celular por apoptosis —caracterizada por una activación de la caspasa iniciadora -9 y de la ejecutora -3— en el área del borde del VI infartado (véase *Capítulo 3*).

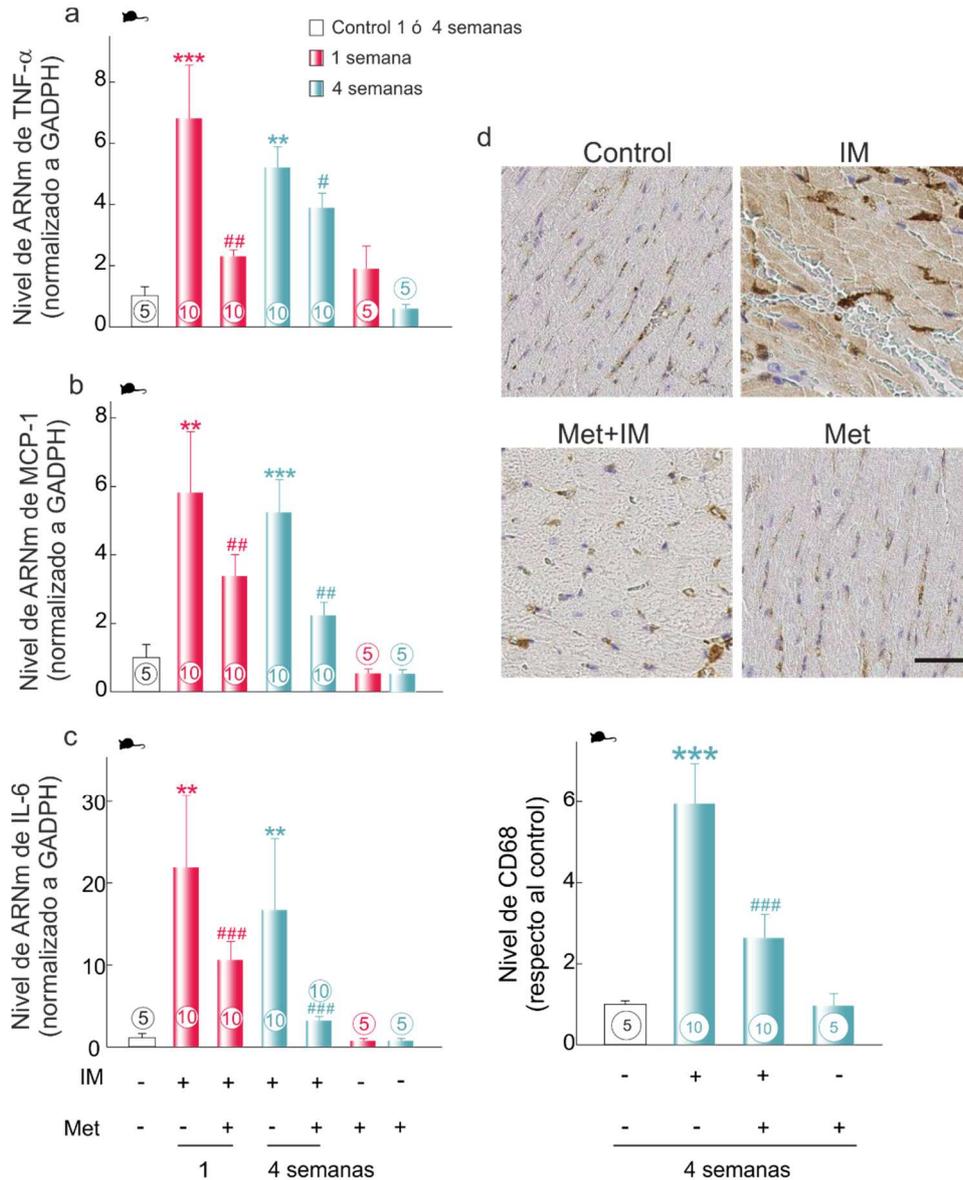


Figura 4.2.- *Metformina* previene la inflamación en la zona del borde del VI infartado. (a-c) Cuantificación de los niveles de ARNm de TNF- α , MCP-1 e IL-6; los datos se han normalizado respecto al nivel de ARNm de GADPH y se representan respecto al ensayo control. (d) (Arriba) Imágenes representativas del marcaje de CD-68 por inmunohistoquímica (40x). La barra de escala en el panel inferior izquierdo equivale a 100 μ m. (Abajo) Análisis cuantitativo del volumen de CD-68 presente respecto al ensayo control. Los datos se representan respecto al ensayo control. En la parte inferior de cada cilindro se detalla el número de animales analizados por grupo. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con el grupo IM. GADPH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; IL-6: interleucina 6; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1; TNF: factor de necrosis tumoral.

Otras abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Los resultados mostrados hasta ahora indican que el tratamiento con metformina en ratas infartadas, mejora de forma significativa los procesos de inflamación, fibrosis cardíaca y muerte celular apoptótica, relacionados todos ellos con la fisiopatología del remodelado cardíaco tras el IM. Los ensayos que siguen tratan de caracterizar la plausible relación entre este efecto cardioprotector de metformina con la modulación del sistema cardíaco IL-33/ST2L.

La disminución de la expresión de sST2 inducida por metformina previene la activación de NF- κ B, tras el IM

En primer lugar, para determinar si el sistema IL-33/ST2L está involucrado en el efecto preventivo de metformina tras el IM, se evaluaron los niveles de ARNm y de proteína de IL-33, ST2L y sST2 en el área del borde del VI infartado mediante PCR cuantitativa y western blot (Fig. 4.3). Independientemente del método empleado, nuestros datos indicaron un aumento significativo de los niveles de ARNm de IL-33, ST2L y sST2 a 1 y 4 semanas de la ligación de la coronaria izquierda (Fig. 4.3, paneles a-c). La terapia con metformina durante 4 semanas se asoció con un aumento del nivel de ARNm de IL-33 y una disminución de los niveles de ARNm de ST2L y de sST2 ($p < 0,001$, en todos los casos) (Fig. 4.3, paneles a-c). El análisis de los resultados obtenidos por transferencia western confirmó estos resultados, cuando la terapia con metformina fue de 4 semanas ($p < 0,001$) (Fig. 4.3, paneles d-f).

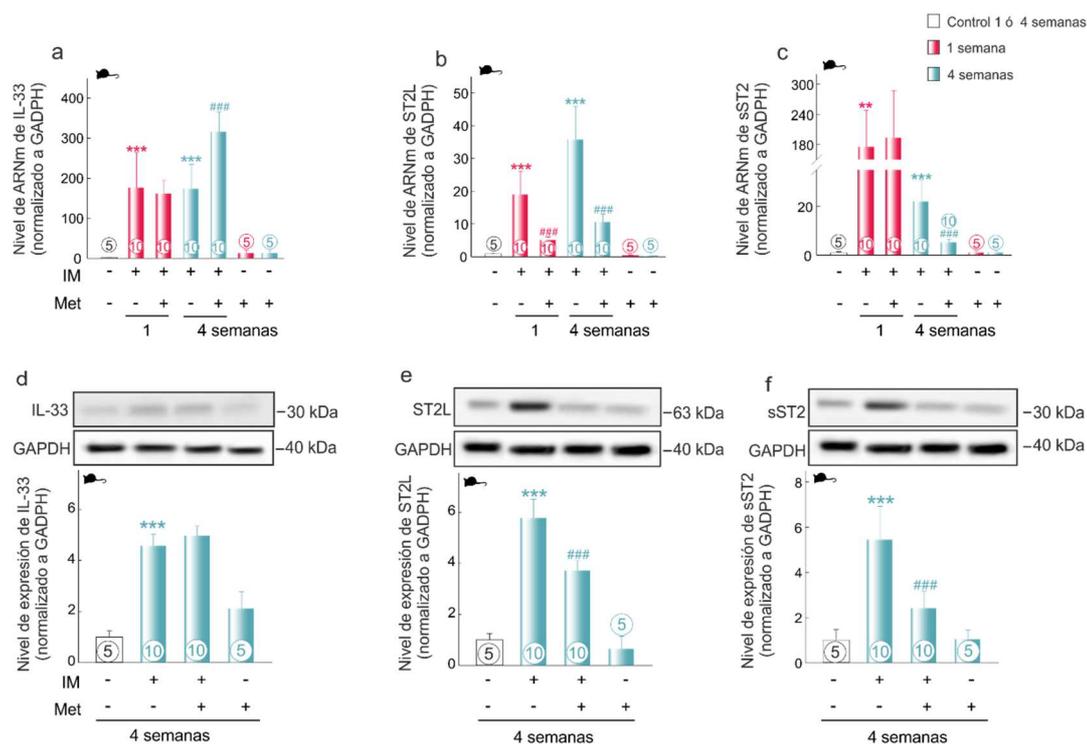


Figura 4.3.- El tratamiento con metformina modula el sistema IL-33/ST2L en la zona del borde del VI infartado. (a-c) Cuantificación de los niveles de ARNm de IL-33, ST2L y sST2; los datos se normalizaron al nivel de ARNm de GAPDH en la muestra y se expresaron respecto al ensayo control. (d-f) Análisis cuantitativo de los resultados obtenidos por western blot de IL-33 (d), ST2L (e) y niveles de proteína sST2 (f) en la zona del borde del VI infartado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo IM. En la parte inferior de cada cilindro se representa el número de animales analizados por grupo. ST2L: receptor de membrana ST2; sST2: isoforma soluble del ST2. Otras abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

La modulación de la expresión de la isoforma soluble sST2 puede valorarse también estudiando su acumulación en el zona del borde del VI infartado por inmunohistoquímica. El análisis de los resultados obtenidos confirmó de nuevo que animales tratados con metformina durante 4 semanas tras el IM presentaban niveles más bajos de sST2 que aquellos que tras sufrir IM no fueron tratados con metformina (Fig. 4.4, paneles a, b). La siguiente cuestión fue determinar si este

efecto que metformina produce sobre el nivel de expresión de sST2 en zona del borde del VI infartado, se traduce en una modulación de los niveles de sST2 a nivel circulatorio.

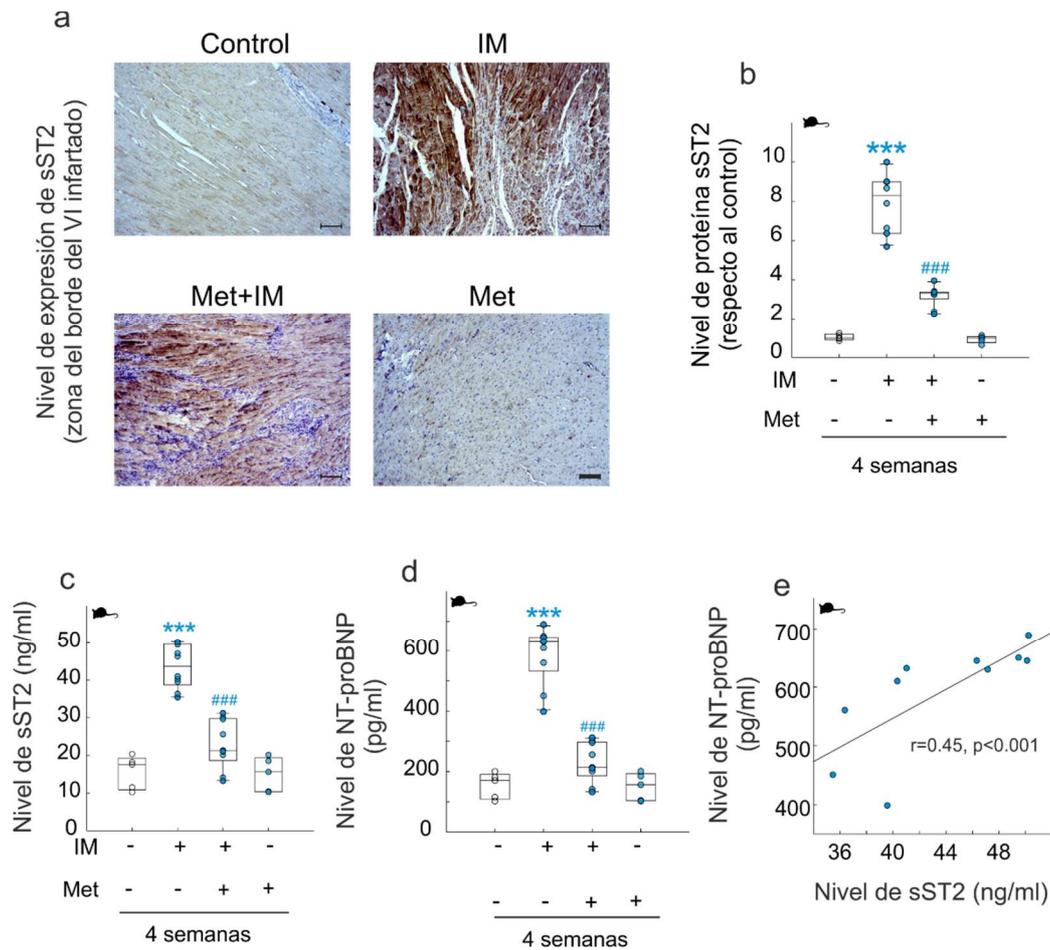


Figura 4.4. *Metformina regula la expresión cardíaca de sST2.* (a, b) Imágenes representativas de la inmunotinción de sST2 en la zona del borde del VI infartado (a) y su cuantificación (b). La barra de escala en el panel inferior derecho equivale a 100 μm . (c, d) Cuantificación de niveles séricos de las proteínas sST2 y NT-proBNP. (e) Datos de correlación entre el nivel de NT-proBNP frente al nivel de sST2. *** $p<0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p<0,001$ en comparación con el grupo IM. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Para ello utilizamos un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima tipo ELISA y evaluamos la concentración en suero de la isoforma soluble sST2 y del péptido natriurético NT-proBNP —un biomarcador cuyo nivel en sangre aumenta como respuesta a distintos procesos fisiopatológicos asociados con la IC, entre los que destacan su secreción por los cardiomiocitos en respuesta a un estiramiento ventricular—. Los datos obtenidos mostraron que animales sometidos a IM durante 4 semanas presentaban valores de sST2 y de NT-proBNP en suero más altos que los obtenidos en el grupo control (Fig. 4.4, paneles c, d). Se encontró además una correlación significativamente positiva entre el nivel de sST2 en suero y el nivel cuantificado de NT-proBNP ($r=0.45$, $p < 0,001$) (Fig. 4.4, panel e). Como puede observarse, el tratamiento de los animales con metformina durante 4 semanas tras el IM redujo de forma significativa el nivel de sST2 y el nivel de NT-proBNP en suero (Fig. 4.4, paneles c, d).

En base a estos resultados, nuestro siguiente objetivo fue valorar si la modulación en el nivel de expresión de la isoforma sST2, afecta a la vía de señalización intracelular activada por el eje IL-33/ST2L. Para ello, evaluamos primero el estado de fosforilación de la proteína I κ B α y la activación del factor NF- κ B en el tejido de la zona borde del VI infartado —la interacción entre IL-33 y el receptor de membrana ST2L activa una respuesta cardioprotectora asociada con una disminución de la fosforilación de la proteína I κ B α y el bloqueo de la activación del factor NF- κ B— (Fig. 4.5, paneles a, b). De este modo, al analizar los resultados obtenidos en la zona del borde observamos que la fosforilación de la proteína I κ B α sobre su sitio de activación Ser³² mostró una tendencia significativa al alza después de 4 semanas de IM ($p < 0,001$) (Fig. 4.5, paneles a, b).

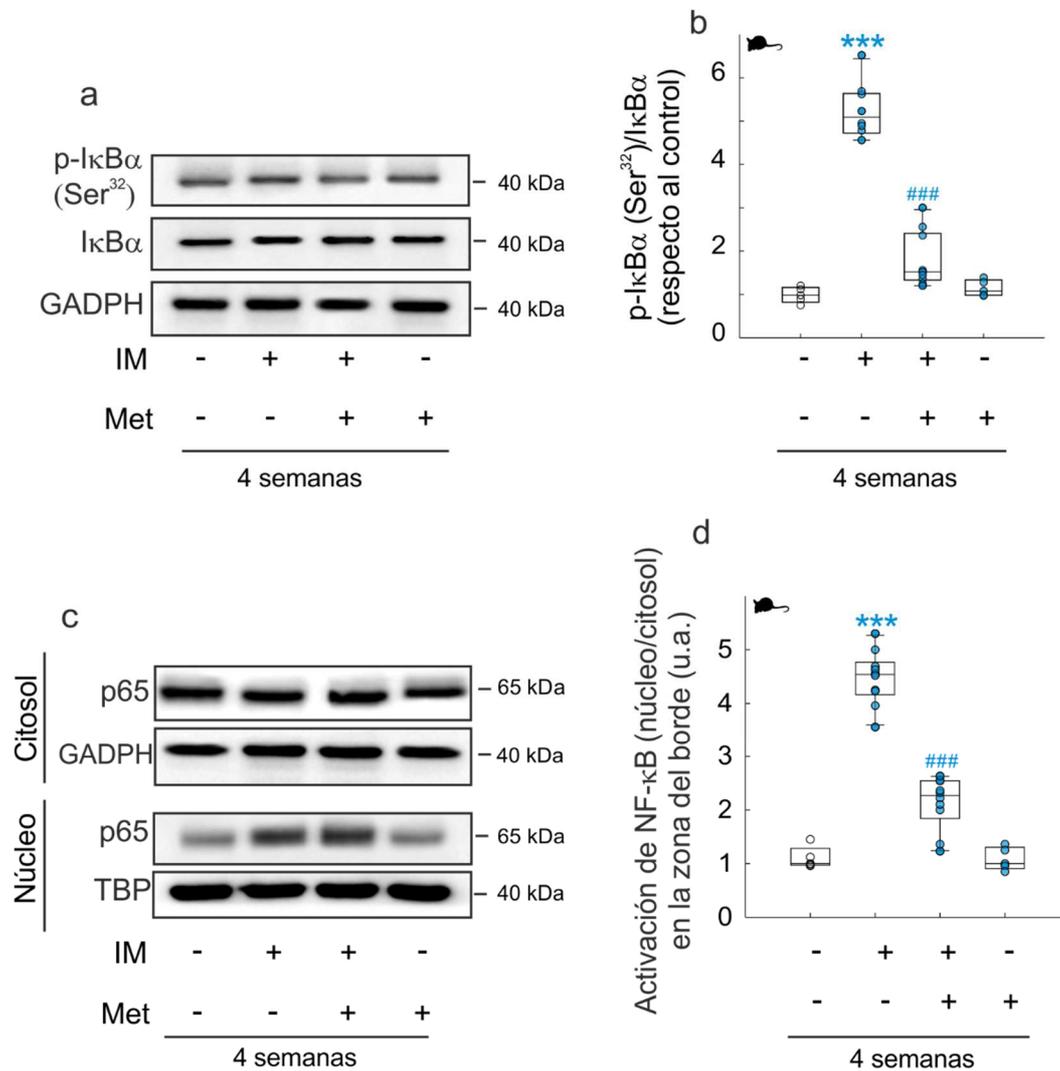


Figura 4.5. El tratamiento con metformina modula la activación de la proteína IκB y del factor NF-κB tras el IM. (a, b) Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de las proteínas: p-IκBα, IκBα y GADPH, en la zona del borde del VI infartado. (c, d) Imágenes representativas de western blot y análisis cuantitativo de la activación del factor NF-κB, representada como relación de p65 (núcleo/citosol) en la zona del borde del VI infartado. *** p<0,001 en comparación con el grupo control; ### p<0,001 en comparación con el grupo IM. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

En cambio, cuando los animales fueron tratados con metformina durante 4 semanas tras el IM este nivel de fosforilación disminuyó (p<0,001) y, como se esperaba, la ausencia de IM no tuvo efecto sobre el estado de fosforilación de

esta proteína. En línea con estos hallazgos, el tratamiento con metformina previno el efecto del IM sobre la activación de NF- κ B al bloquear la translocación de la subunidad p65 desde el citosol al núcleo, un hecho que no ocurrió en el grupo control (Fig. 4.5, paneles c, d).

Por lo tanto, nuestros datos apoyan el hecho de que metformina, a través de la modulación a la baja de la expresión de sST2, puede favorecer la interacción entre IL-33 y el receptor de membrana ST2L y con ello la activación de una respuesta cardioprotectora. Los siguientes experimentos tratan de identificar a través de qué mecanismos metformina es capaz de disminuir la expresión de sST2 y con ello favorecer la interacción de IL-33 al receptor de membrana ST2L.

La terapia con metformina modula la expresión del factor de transcripción Yin yang 1 (Yy1) y de su co-represor HDAC4 tras el IM

El análisis de los datos obtenidos —y de forma similar a los cambios observados en el nivel de expresión de sST2 en la zona del borde— mostró un incremento del nivel de ARNm del factor de transcripción Yy1 después de 1 y 4 semanas de IM (Fig. 4.6, panel a); de hecho, al valorar el grado de correlación entre el factor Yy1 y la isoforma sST2, los resultados mostraron una correlación significativamente positiva ($r_s = 0.362$, $p = 0.02$). El tratamiento de los animales con metformina durante 4 semanas tras el IM redujo de forma significativa el nivel de ARNm de Yy1 en la zona del borde del VI infartado ($p < 0,01$) (Fig. 4.6, panel a).

A continuación, procedimos a valorar la distribución subcelular del factor de transcripción Yy1, analizando el contenido proteico del extracto citosólico y nuclear —previamente aislados de la zona borde del VI infartado— por western blot. El análisis de los resultados obtenidos en las muestras del borde de animales infartados con 4 semanas de evolución, mostró una acumulación mayor del factor de transcripción Yy1 en la fracción nuclear ($p < 0,001$) (Fig. 4.6, paneles b, c) con respecto a la valorada en la fracción citosólica. En animales infartados y tratados con metformina durante 4 semanas observamos una reducción significativa de los niveles del factor Yy1 en la fracción nuclear ($p < 0,001$). De nuevo, nuestros datos establecieron que en ausencia de IM la distribución subcelular del factor Yy1 fue similar a la observada en el grupo control, independientemente del tratamiento con metformina. Estos resultados fueron confirmados posteriormente mediante la realización de ensayos de inmunohistoquímica en la zona del borde del VI infartado (Fig. 4.6, paneles d, e).

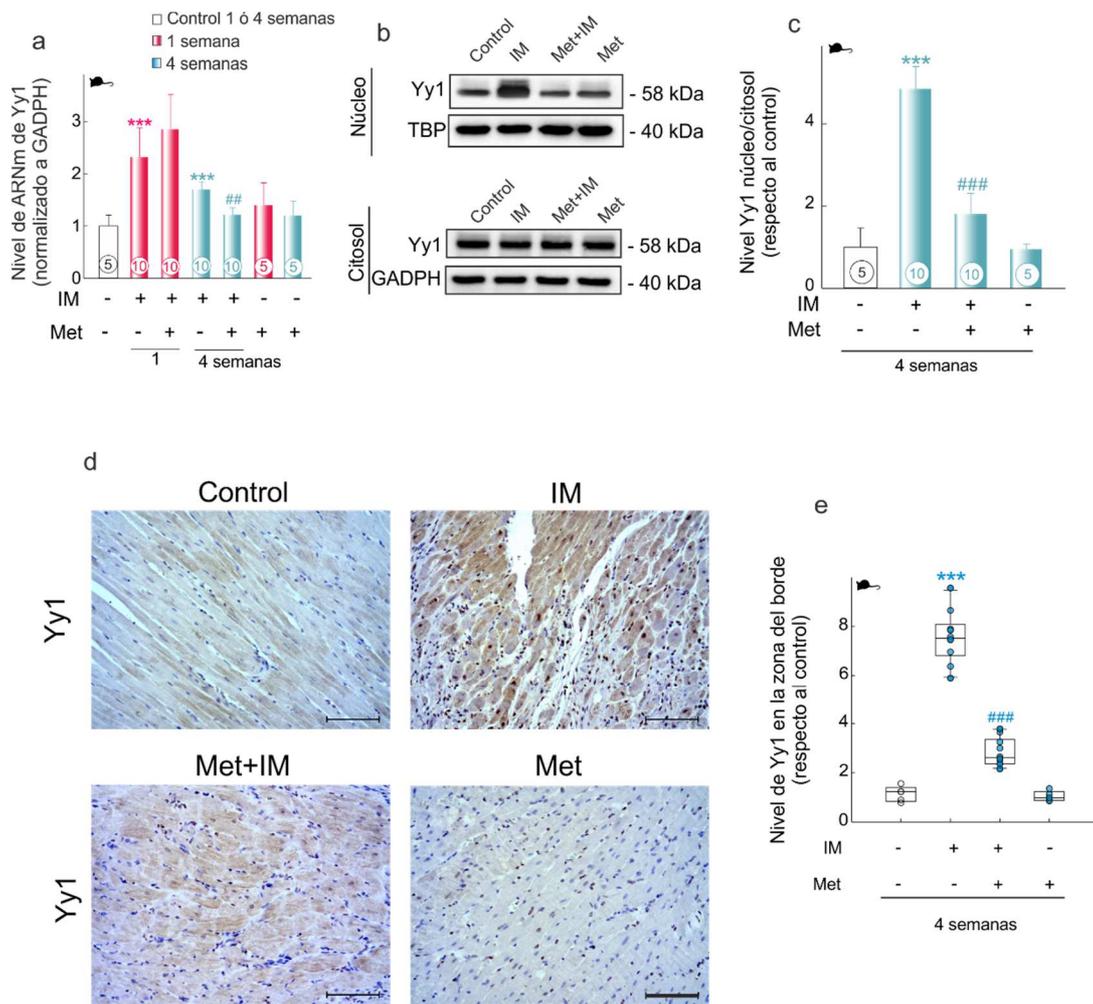


Figura 4.6. *Metformina regula los niveles de sST2 mediante la modulación del factor de transcripción Yy1 en la zona del borde del VI infartado.* (a) Análisis cuantitativo del nivel de ARNm de Yy1 mediante PCR cuantitativa; los datos han sido normalizados al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al ensayo control. (b, c) Nivel de acumulación del factor Yy1 en la fracción nuclear y citosólica aisladas de la zona del borde del VI infartado (b) y análisis densitométrico evaluado como relación núcleo/citosol (c). (d, e) Imágenes representativas de una inmunotinción contra el factor Yy1 en la zona del borde del VI infartado. La barra de escala equivale a 200 μ m. En la parte inferior de cada cilindro se representa el número de animales analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, en comparación con el grupo IM. Yy1: factor de transcripción Yin yang-1. Otras abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Otro de los objetivos planteados en este estudio fue caracterizar la implicación del co-represor HDAC4 en la actividad subcelular del factor de transcripción Yy1 y su relación con la expresión de la isoforma soluble sST2 en la zona del borde del VI infartado. En una primera aproximación mediante el uso de PCR cuantitativa, nuestros datos indicaron que mientras el nivel de ARNm de HDAC4 permaneció invariable tras el IM, cuando los animales se trataron con metformina su nivel aumentó de forma significativa tras 1 semana de IM ($p < 0.001$) (Fig. 4.7, panel a). Además, los resultados obtenidos establecieron que este efecto de metformina sobre el nivel de ARNm de HDAC4 fue mayor cuando el tiempo de tratamiento se prolongó hasta las 4 semanas de IM ($p < 0.001$). Nuestros datos también establecieron que el tratamiento con metformina durante 1 ó 4 semanas y en ausencia de IM fue capaz de incrementar el nivel de ARNm de HDAC4 ($p < 0.001$, en ambos casos) en el VI. Todos estos resultados fueron posteriormente confirmados al evaluar el nivel de expresión de HDAC4 en la zona del borde del VI infartado mediante western blot (Fig. 4.7, panel b).

Una cuestión importante fue dilucidar el papel de HDAC4 como proteína reguladora de la actividad del factor de transcripción Yy1. Con este fin, se estudió la distribución subcelular de la forma fosforilada de la proteína HDAC4 (Fig. 4.7, paneles c, d). El análisis de los resultados obtenidos por western blot —a partir de los extractos subcelulares nuclear y citosólico aislados de la zona del borde del VI infartado de 4 semanas de evolución— indicó un aumento en la acumulación de la proteína fosforilada HDAC4 en la fracción citosólica de ratas infartadas ($p < 0.001$) que fue disminuida cuando los animales fueron tratados con metformina ($p < 0.001$), en comparación con el grupo de animales infartados no tratados. En ausencia de IM, la terapia con metformina no tuvo ningún efecto sobre la distribución de HDAC4 fosforilada.

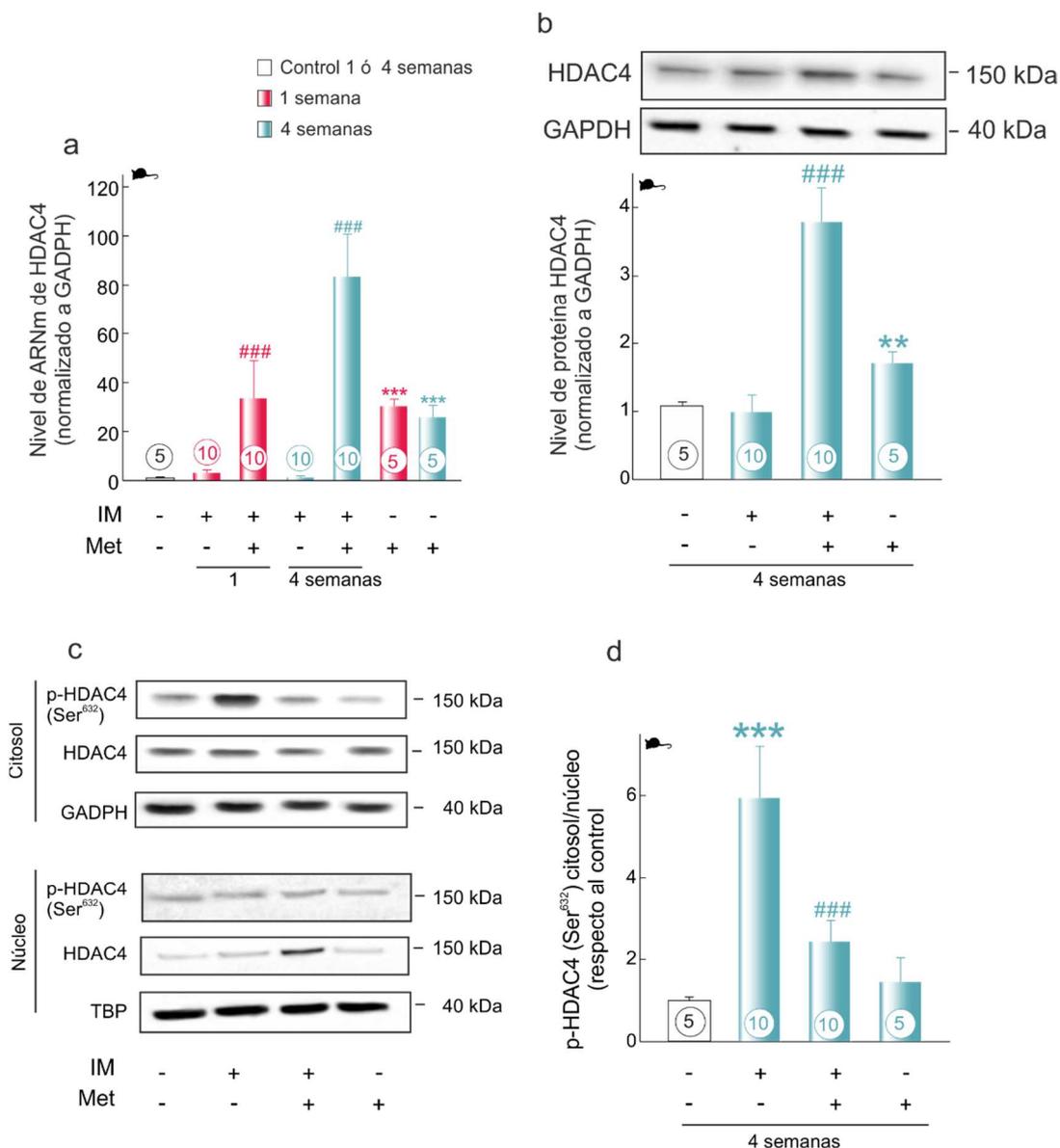


Figura 4.7. *Metformina* regula la actividad del factor de transcripción *Yy1* a través de la modulación de la deacetilasa *HDAC4* en la zona del borde del VI infartado. (a) Nivel de ARNm de *HDAC4* por PCR cuantitativa; los datos se normalizan respecto al nivel de ARNm de *GADPH* y se expresan respecto al ensayo control. (b) Nivel de expresión de *HDAC4* en la zona del borde del VI infartado y análisis densitométrico. (c) Nivel de fosforilación de *HDAC4* en el residuo *Ser*⁶³² en la fracción nuclear y citosólica de la zona del borde del VI infartado y análisis densitométrico evaluado como la relación de *Ser*⁶³²-*HDAC4* en el núcleo/ *Ser*⁶³²-*HDAC4* en el citosol. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de animales analizados por grupo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0.001$ en comparación con el grupo IM. *HDAC4*: histona deacetilasa 4; *TBP*: proteína de unión a TATA. Otras abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

El factor de transcripción Yy1 modula la expresión de la isoforma soluble sST2

Para evaluar la implicación del factor de transcripción Yy1 en la modulación de la expresión del gen *IL1RL1* y caracterizar el papel de HDAC4, desarrollamos un modelo de hipertrofia mediante la co-estimulación celular con PMA y A23187^{105,106,199,200}. Como se describió en detalle en el *Capítulo 2*, este modelo experimental causa una deformación celular mantenida en el tiempo que permite la expresión y secreción de la isoforma soluble sST2. La co-estimulación de los cardiomiocitos con PMA+A23187 se tradujo en una deformación celular caracterizada por un aumento del tamaño del cardiomiocito, así como su capacidad para incorporar leucina ($p < 0,001$, en todos los casos). Este proceso hipertrófico — en los términos previamente citados— fue prevenido cuando las células fueron pretratadas con metformina ($p < 0,001$, en todos los casos) (Fig. 4.8, paneles a, b).

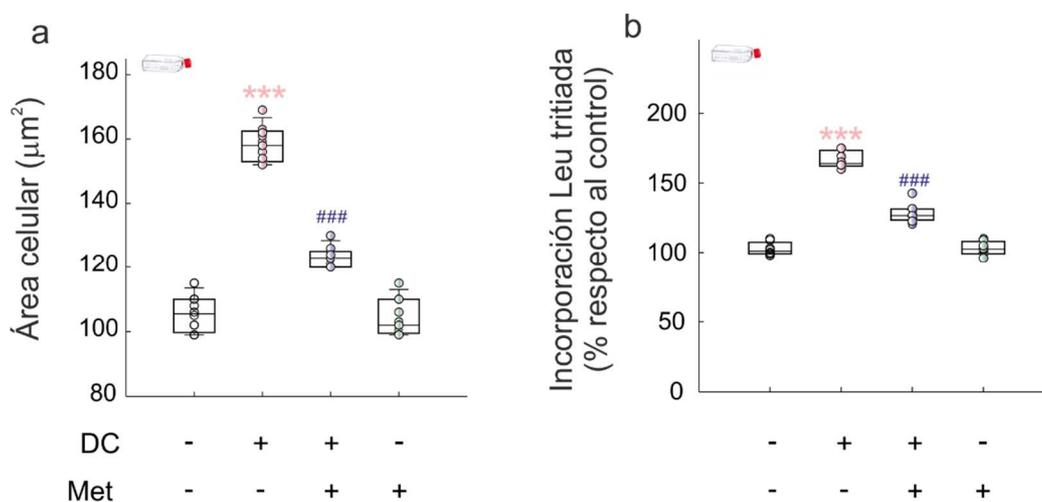


Figura 4.8. *Bajo condiciones de deformación celular, metformina previene la respuesta hipertrófica asociada.* (a) Análisis cuantitativo del tamaño celular del cardiomiocito sometido a deformación celular. (b) Cuantificación de la incorporación de Leucina tritiada al interior de los cardiomiocitos. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo DC. DC: deformación celular; Met: metformina; Leu: leucina.

La deformación celular indujo un incremento de los niveles de ARNm de IL-33, sST2 y de Yy1 ($p < 0,001$, en todos los casos), como se evaluó en la zona del borde del VI infartado, pero no afectó al nivel de ARNm de HDAC4. De igual forma, el pretratamiento con metformina no afectó al nivel de ARNm de IL-33, redujo significativamente los niveles de ARNm de sST2 ($p < 0,001$) y de Yy1 ($p < 0,001$), y aumentó el nivel de ARNm de HDAC4 ($p < 0,001$) (Fig. 4.9).

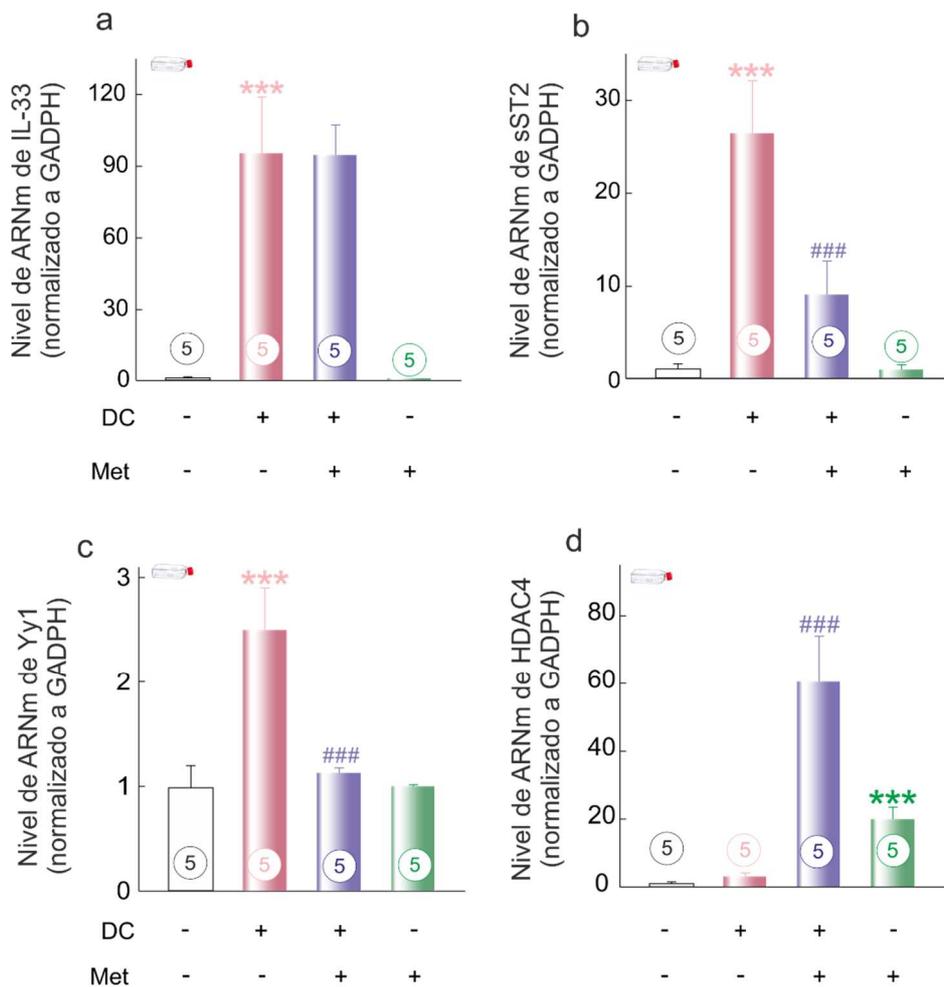


Figura 4.9. Análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de IL-33 (a), sST2 (b), Yy1 (c) y HDAC4 (d); los datos se normalizan respecto al nivel de ARNm de GAPDH y se expresan respecto al ensayo control. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo. *** $p < 0,001$ en comparación con el control; ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

La expresión y secreción de la isoforma soluble sST2 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular se evaluó mediante el uso de western blot y ELISA. El análisis de los datos reveló un incremento en la expresión y secreción de sST2 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular ($p < 0,001$, en ambos casos), que fue prevenido cuando las células se pretrataron con metformina (Fig. 4.10, paneles a, b).

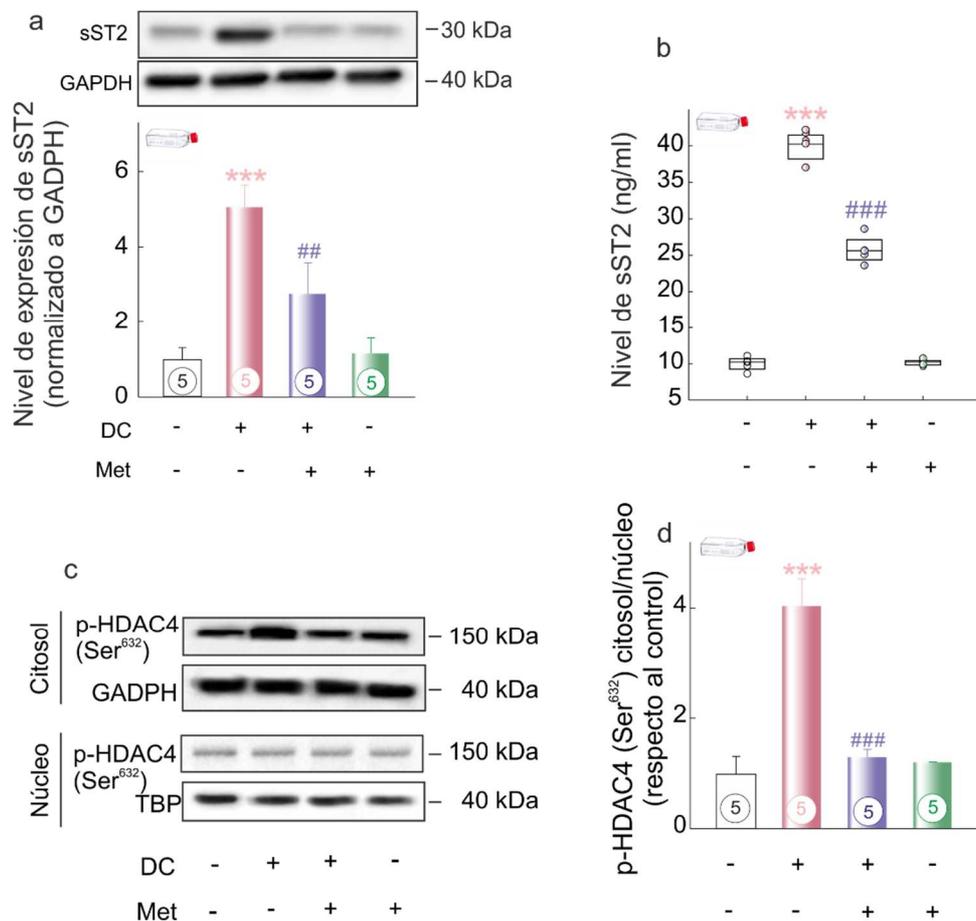


Figura 4.10. *Metformina modula la expresión/secreción de sST2 e incrementa el nivel de la forma fosforilada del HDAC4 en el citosol.* (a) Nivel de expresión de sST2 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular y análisis cuantitativo. (b) Cuantificación del nivel de sST2 en el medio extracelular. (c, d) Distribución subcelular de la forma fosforilada de HDAC4. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo (n=5). *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con el grupo DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

También se observó que la distribución subcelular de la proteína fosforilada HDAC4 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular fue similar a la que obtuvimos en la zona del borde del VI infartado, es decir, evaluamos un incremento significativo del nivel de fosforilación de HDAC4 en el citosol celular respecto a la que se acumula en la fracción nuclear ($p < 0,001$). Un efecto que fue prevenido cuando metformina fue adicionada en preincubación a cardiomiocitos, antes de someterlos a deformación celular (Fig. 4.10, paneles c, d). En células no sometidas a deformación celular, el tratamiento con metformina no indujo ningún cambio en el estado de fosforilación de HDAC4 en el citosol.

Para estudiar si el factor de transcripción Yy1 está involucrado en la modulación de la expresión de la isoforma soluble sST2, se usó una combinación de tipo comercial formada por cuatro secuencias diferentes de ARN de pequeño tamaño (siRNAs) dirigidas contra zonas distintas del mismo ARNm de Yy1 y diseñadas para su degradación. Nuestro objetivo fue analizar el efecto del silenciamiento de Yy1 sobre la expresión y secreción de sST2 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular. De forma inicial, evaluamos la eficiencia de esta combinación comercial denominada siYy1 sobre el nivel de expresión del factor Yy1 mediante PCR cuantitativa, western blot e inmunofluorescencia usando microscopía confocal. Como se muestra en la figura 4.11, panel a, el aumento del nivel de ARNm de Yy1 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular ($p < 0,001$) se bloqueó completamente cuando el nivel endógeno del factor Yy1 fue silenciado ($p < 0,001$) (comparar cilindro de color azul con el cilindro que se muestra en color rosa en fig. 4.11, panel a). Al repetir el ensayo, pero no sometiendo a las células a deformación celular, se observa un perfil de ARNm

similar al ensayo control (comparar cilindro de color gris con cilindro que aparece en color blanco en fig. 4.11, panel a). Cuando se evaluó después el nivel de expresión del factor Yy1 en las fracciones nucleares aisladas de cultivos celulares por western blot —con el objetivo de valorar el efecto del siYy1 sobre la expresión del Yy1— se observó un resultado similar al descrito por PCR cuantitativa (Fig. 4.11, panel b). En línea con estos ensayos preliminares también evaluamos la efectividad del silenciamiento del factor Yy1 analizando su distribución subcelular por inmunofluorescencia (Fig. 4.11, panel c). En este caso, los cardiomiocitos transfectados y sometidos a deformación celular o no, se fijaron y permeabilizaron para permitir detectar al factor Yy1 con ayuda del anticuerpo anti-Yy1 (sc-281; Santa Cruz Biotechnology, INC). La fluorescencia azul corresponde a los núcleos que se han marcado con la sonda DAPI y la fluorescencia verde es la proteína γ -tubulina y se utilizó como control de la integridad celular. Las imágenes que se muestran corresponden a cardiomiocitos a los que no se les aplicó el protocolo de deformación (grupo control+siCtrl), a cardiomiocitos sometidos a deformación celular (grupo siCtrl+DC) o a cardiomiocitos sometidos a deformación celular y transfectados con siYy1 (grupo siYy1+DC). La fluorescencia roja corresponde a la proteína Yy1 y aparece en cardiomiocitos sometidos a un protocolo de deformación celular (grupo siCtrl+DC) pero no en células control (grupo control+siCtrl). La colocación de fluorescencia roja y fluorescencia azul se identificó por la aparición de color violeta. Como se muestra, la superposición de ambas fluorescencias pone de relieve que la distribución del factor Yy1 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular se solapa con la fracción nuclear. El análisis de esta co-localización proporcionó un coeficiente de Pearson de $0,96 \pm 0,04$ y un coeficiente de Manders de $0,98 \pm 0,02$.

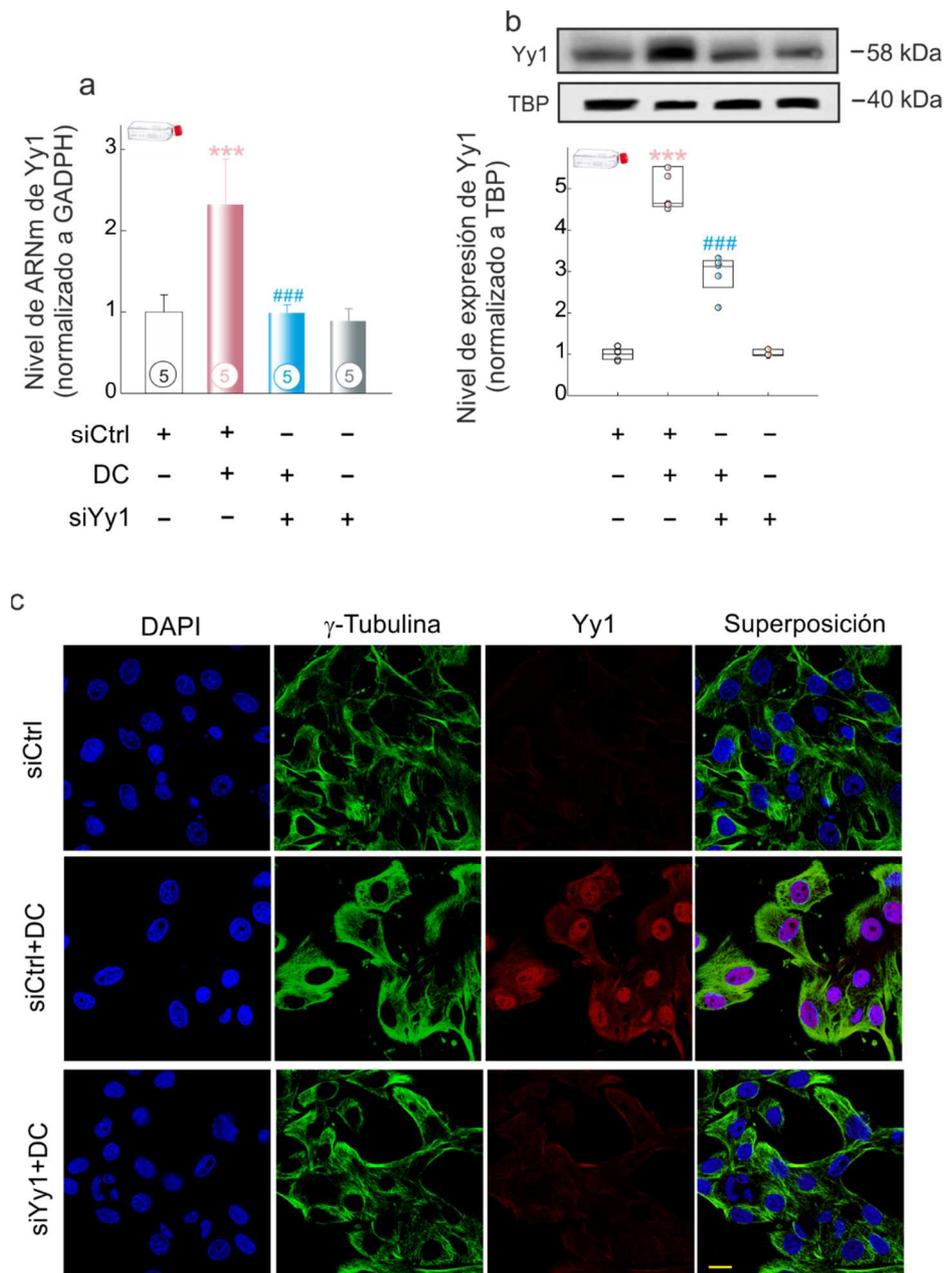


Figura 4.11. *Eficiencia del silenciamiento con siYy1*. (a) Nivel de ARNm de Yy1; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al ensayo control. (b) Nivel de expresión del factor de transcripción Yy1. (c) Imágenes de microscopía confocal de barrido de cardiomiocitos que expresan Yy1 (fluorescencia roja) y γ -tubulina (fluorescencia verde). La fluorescencia azul se localiza en el núcleo y corresponde a un marcaje con DAPI. El tamaño de la escala equivale a 50 μ m. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo (n=5). *** p<0,001 comparado con el grupo siCtrl; ### p<0,001 comparado con el grupo siCtrl+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Como puede observarse, el silenciamiento de la expresión endógena del factor Yy1 (grupo siYy1+DC) previno el incremento de la fluorescencia roja correspondiente al factor Yy1 y por lo tanto la aparición de color violeta en los núcleos de cardiomiocitos sometidos a deformación celular. También se estudió si la combinación de los cuatro siRNAs transfectados en cardiomiocitos y dirigidos a silenciar de forma específica al factor Yy1 presentaba efecto *off-target* (Fig. 4.12). Para ello estudiamos el efecto de cada uno de los 4 siRNAs de la mezcla por separado y lo comparamos con el obtenido usando la combinación de los 4 siRNAs, sobre el nivel de ARNm de Yy1 y la expresión de sST2. El análisis de los datos mostró que el incremento del nivel de ARNm de Yy1 y de sST2 tras la deformación celular fue de forma similar bloqueado no solo cuando la expresión de Yy1 fue silenciada con la mezcla de los 4 siRNAs contra Yy1, sino también cuando usamos cada uno de los 4 siRNAs de la mezcla por separado (Fig. 4.12). A la vista de estos resultados preliminares, podemos concluir que el silenciamiento del factor Yy1, —usando la combinación comercial *ON-TARGET plus*[™] *SMARTpool*[®] siRNA con referencia L-091624-02-0005 obtenida de Dharmacon— en cardiomiocitos sometidos a deformación celular es altamente efectiva y no presenta efecto *off-target*.

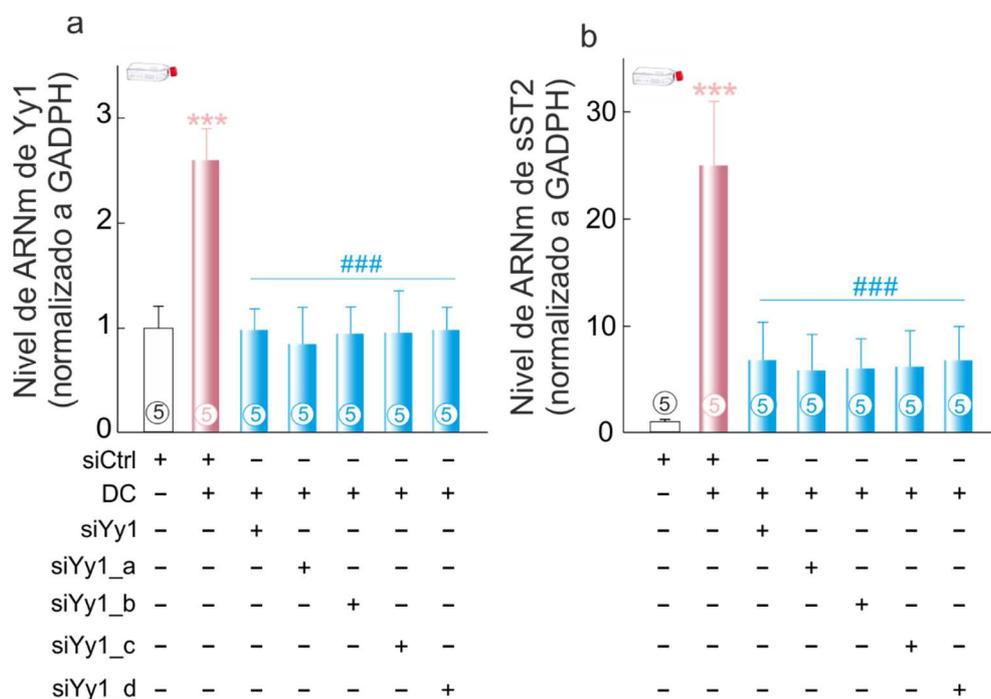


Figura 4.12. La combinación comercial ON-TARGET plus™ SMARTpool® siRNA muestra alta efectividad y ausencia de efecto off-target. Los cardiomiocitos fueron transfectados con una secuencia control de siRNA (siCtrl), con una combinación de 4 siRNAs contra Yy1 (siYy1_a+b+c+d) o con cada una de las secuencias anteriores de forma individual, antes de inducir la deformación celular durante 6 h. El nivel de ARNm de Yy1 (a) y de sST2 (b) fue analizado por PCR cuantitativa; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al ensayo control. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo (n=5). *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Un resultado interesante de este estudio fue el hecho de que el silenciamiento de la expresión del factor Yy1 —en células sometidas a deformación celular— disminuyó el nivel de ARNm y expresión de la isoforma soluble sST2 (Fig. 4.13, paneles a-c) ($p < 0,001$, en todos los casos) sin modificar la expresión de ST2L (Fig. 4.13, paneles d-e).

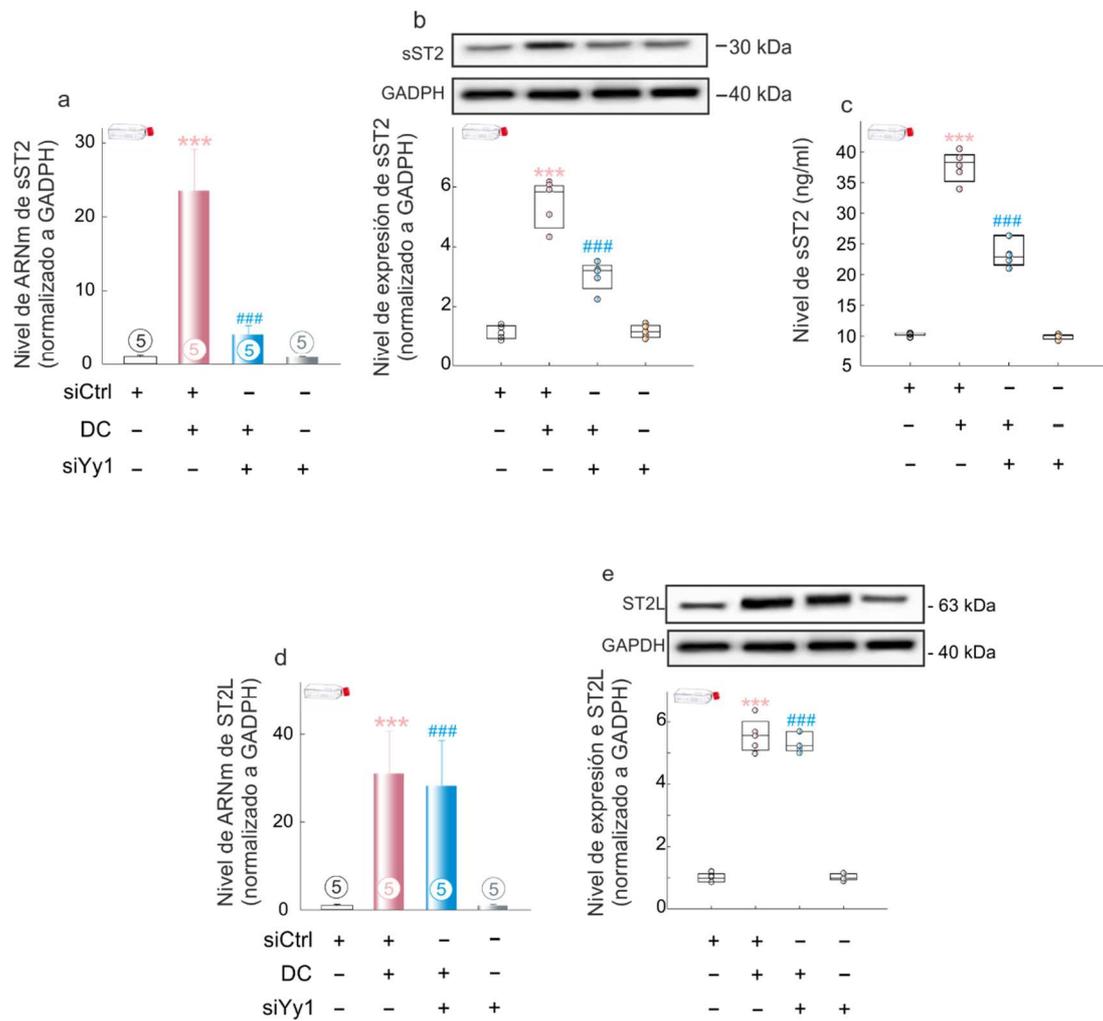


Figura 4.13.- El silenciamiento de Yy1 afecta a la expresión de sST2 pero no a ST2L. (a) Nivel de ARNm de sST2; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GAPDH y se expresan respecto al ensayo control. (b) Imagen de western blot representativa del nivel de expresión de la isoforma soluble sST2. (c) Nivel de la isoforma soluble sST2 en el medio extracelular evaluado por ELISA. (d) Nivel de ARNm de ST2L; los datos se normalizan al nivel de ARNm de GAPDH y se expresan respecto al ensayo control. (e) Imágenes de western blot representativas del nivel de expresión de ST2L. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo (n=5). *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Resultado que nos indica la alta especificidad de acción de este factor de transcripción sobre la expresión de la isoforma soluble sST2. Además, el silenciamiento del factor Yy1 en ausencia de daño no tuvo efecto sobre la expresión de sST2 ni sobre ST2L, en comparación con sus controles respectivos.

La disminución de sST2 previene la fosforilación y activación de IκBα/ NF-κB, aumenta la señal cardioprotectora asociada con la vía IL-33/ST2L, lo que lleva a mejoras en la hipertrofia cardíaca.

Debido a que IκBα/NF-κB es una vía de señalización intracelular relacionada con el eje IL-33/ST2L^{181,201}, exploramos los efectos que la modulación génica de la isoforma soluble sST2 —cuya expresión hemos demostrado está regulada por el factor de transcripción Yy1 y es secretada por cardiomiocitos sometidos a protocolos de deformación celular— tiene sobre esta vía de señalización. Como se evaluó previamente en la zona del borde del VI infartado, los cardiomiocitos que fueron sometidos a un protocolo de deformación celular experimentaron un incremento significativo de la fosforilación de la proteína IκBα sobre su sitio de activación Ser³², —en comparación con aquellas células que no fueron sometidas a deformación (grupo siCtrl)— (Fig. 4.14, panel a).

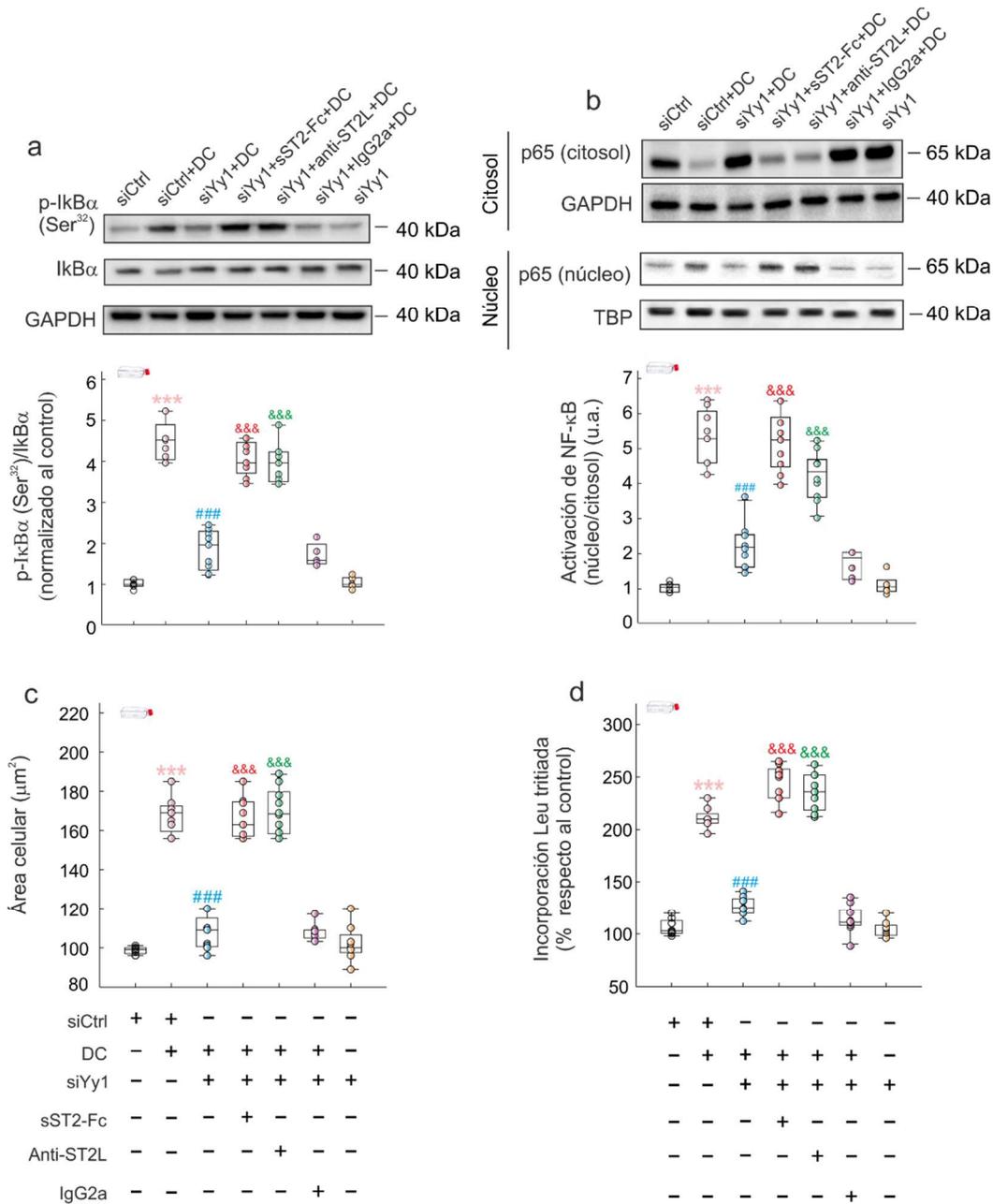


Figura 4.14. La isoforma soluble sST2 actúa sobre la ruta de señalización activada a través de la interacción IL-33/ST2L. (a-b) Imágenes de western blot representativas del estado de fosforilación de la proteína IκB sobre su residuo Ser³² en el citosol y análisis densitométrico correspondiente evaluado como *ratio* Ser³²-IκBα/IκBα total. (c-d) Imágenes de western blot representativas de la activación del factor NF-κB y análisis densitométrico correspondiente evaluado como *ratio* de la subunidad p65 nuclear/p65 en el citosol. (e) Análisis cuantitativo de del tamaño celular de cardiomiocitos. (f) Captación de leucina tritiada por cardiomiocitos. Cuando se indica y antes del co-tratamiento con PMA+A23187, las células transfectadas con siYy1 se trataron con 2 μM de sST2-r ó con 100 μg/ml del anticuerpo anti-ST2L a 37 °C durante 2 h en

incubador de CO₂. Como control para anti-ST2L, se utilizó 100 µg/ml de IgG2a. ***p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p <0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC; &&& p <0,001 en comparación con el grupo siYy1 + DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Sin embargo, el silenciamiento de la expresión endógena del factor de transcripción Yy1 —silenciamiento que hemos demostrado previamente está relacionado con la disminución de la expresión específica de la isoforma soluble sST2— previno esta fosforilación, un efecto que se bloqueó cuando las células se trataron con sST2-Fc (p<0,001) o con un anticuerpo específico contra el receptor ST2L de membrana (anti-ST2L) (p<0,001) tras el silenciamiento del factor Yy1. Un ensayo paralelo consistió en evaluar el efecto del silenciamiento de Yy1 sobre la activación del factor NF-κB. Como se muestra en la figura 4.14, panel b, la acumulación de la subunidad p65 en la fracción nuclear de cardiomiocitos sometidos a deformación celular fue bloqueada en aquellas células donde la expresión de Yy1 fue silenciada antes de inducir la deformación. De nuevo, el efecto del silenciamiento del factor Yy1 sobre la activación de NF-κB —evaluada como la translocación de la subunidad p65 de NF-κB desde el citosol hasta el núcleo— fue revertido en presencia de sST2-Fc o cuando las células se trataron con el anticuerpo anti-ST2L (Figura 4.14, panel b). Este bloqueo de la señalización a través del eje IL-33/ST2L mediante el uso de sST2-Fc o de un anticuerpo contra el receptor ST2L, se estudió también evaluando el área celular (Fig. 4.14, panel c) así como la incorporación de leucina tritiada (Fig. 4.14, panel d) como medidas de hipertrofia cardíaca. El análisis de los datos obtenidos evidenció el carácter cardioprotector asociado con la activación del eje IL-33/ST2L y determinó la importancia del silenciamiento del factor Yy1 sobre las medidas de hipertrofia realizadas. De hecho, el silenciamiento del factor Yy1 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular previno de forma significativa el crecimiento celular y la

captación de leucina. Este efecto cardioprotector frente a la hipertrofia cardíaca y asociado con el silenciamiento del factor Yy1, pudo bloquearse cuando a los cardiomiocitos se les adicionó sST2-Fc o cuando fueron tratados con un anticuerpo específico contra el receptor ST2L. El uso de IgG2a de rata o de la proteína de fusión *IL1-1R-related protein 2-Fc* (dato no mostrado), como controles para anti-ST2L ó s ST2-Fc, respectivamente —cuando el factor Yy1 se silencia durante la deformación celular— así como la adición de siYy1 a cardiomiocitos en ausencia de deformación celular, no tuvo efecto en los parámetros evaluados.

HDAC4 actúa como un co-represor e inhibe la expresión de sST2.

Los datos mostrados hasta el momento indican que el silenciamiento del factor de transcripción Yy1 previene la expresión de la isoforma soluble sST2 lo cual está asociado con la activación del eje de señalización IL-33/ST2L y una mejora en la hipertrofia cardíaca. Los ensayos que a continuación se exponen tratan de evaluar el mecanismo a través del cual el factor Yy1 es capaz de modular la expresión de sST2. Los experimentos estuvieron dirigidos a estudiar la interacción entre el co-represor HDAC4 con el factor de transcripción Yy1 y evaluar el efecto que esta interacción tiene sobre la expresión de la isoforma sST2.

En primer lugar, células H9c2 se preincubaron con 1 μ M de KN-93 (un inhibidor específico de CaMKII) durante 30 min antes del co-tratamiento con PMA+A23187 por 6 h, como se indicó anteriormente. La acumulación de la forma fosforilada de HDAC4 y los niveles de expresión de la proteína sST2 en la fracción citosólica, se evaluaron mediante transferencia western (Fig. 4.15, paneles a, b). Nuestros datos mostraron que el tratamiento de los cardiomiocitos con el inhibidor KN-93, antes de inducir la deformación celular, previno por un lado la

fosforilación y por otro la importación de HDAC4 desde el núcleo al citosol inducida por la deformación ($p=0,001$) (Fig. 4.15, panel a).

Además, nuestros datos también mostraron como el tratamiento con el inhibidor KN-93 bloqueó el incremento de la expresión de la isoforma soluble *sST2* en cardiomiocitos sometidos a deformación celular ($p < 0,01$) (Fig. 4.15, panel b).

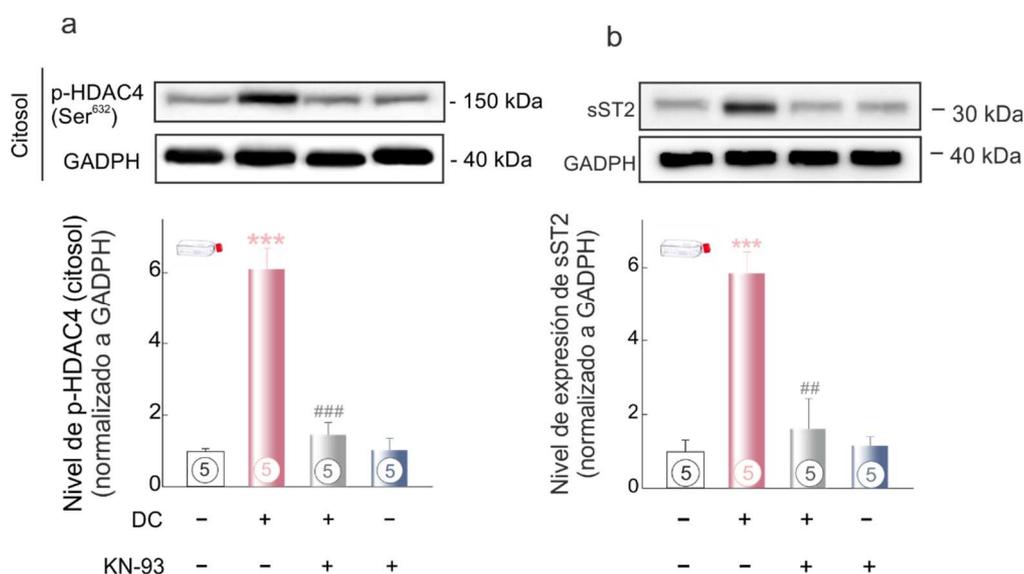


Figura 4.15. La inhibición de la enzima *CaMKII* previene la expresión de la isoforma *sST2*. (a) Imagen representativa de western blot de la proteína fosforilada Ser⁶³²-HDAC4 en la fracción citosólica de cardiomiocitos y análisis densitométrico correspondiente evaluado como nivel de proteína fosforilada Ser⁶³²-HDAC4/GADPH. (b) Imagen representativa de western blot del nivel de expresión de *sST2* y análisis densitométrico correspondiente evaluado como nivel de proteína *sST2*/GADPH. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo ($n=5$). *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ en comparación con el grupo DC. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

En ausencia de daño, la adición de KN-93 no tuvo ningún efecto sobre el nivel de fosforilación de HDAC4 ni sobre el nivel de expresión de sST2 (Fig. 4.15, paneles a, b).

Para evaluar si HDAC4 es capaz de actuar como un co-represor de la expresión de la isoforma soluble sST2 a través de su interacción con el factor de transcripción Yy1, se recurrió por un lado a silenciar su expresión siguiendo el procedimiento experimental de transfección detallado en el *Capítulo 2* y a realizar de forma paralela un ensayo de co-inmunoprecipitación con el objetivo de identificar la formación de complejos proteicos Yy1-HDAC4. La eficiencia de la transfección con siHDAC4 se evaluó por PCR cuantitativa (dato no mostrado).

Como se muestra en la figura 4.16, panel a, el aumento del nivel de ARNm de HDAC4 inducida por la deformación celular en presencia de metformina ($p < 0,001$) se bloqueó cuando la expresión endógena de HDAC4 fue previamente silenciada ($p < 0,001$). Es interesante señalar que el silenciamiento de la expresión endógena de HDAC4 en cardiomiocitos sometidos a deformación celular bloqueó el efecto preventivo de metformina sobre el nivel de ARNm (Figura 4.16, panel b) y proteína de sST2 (Figura 4.16, paneles c, d).

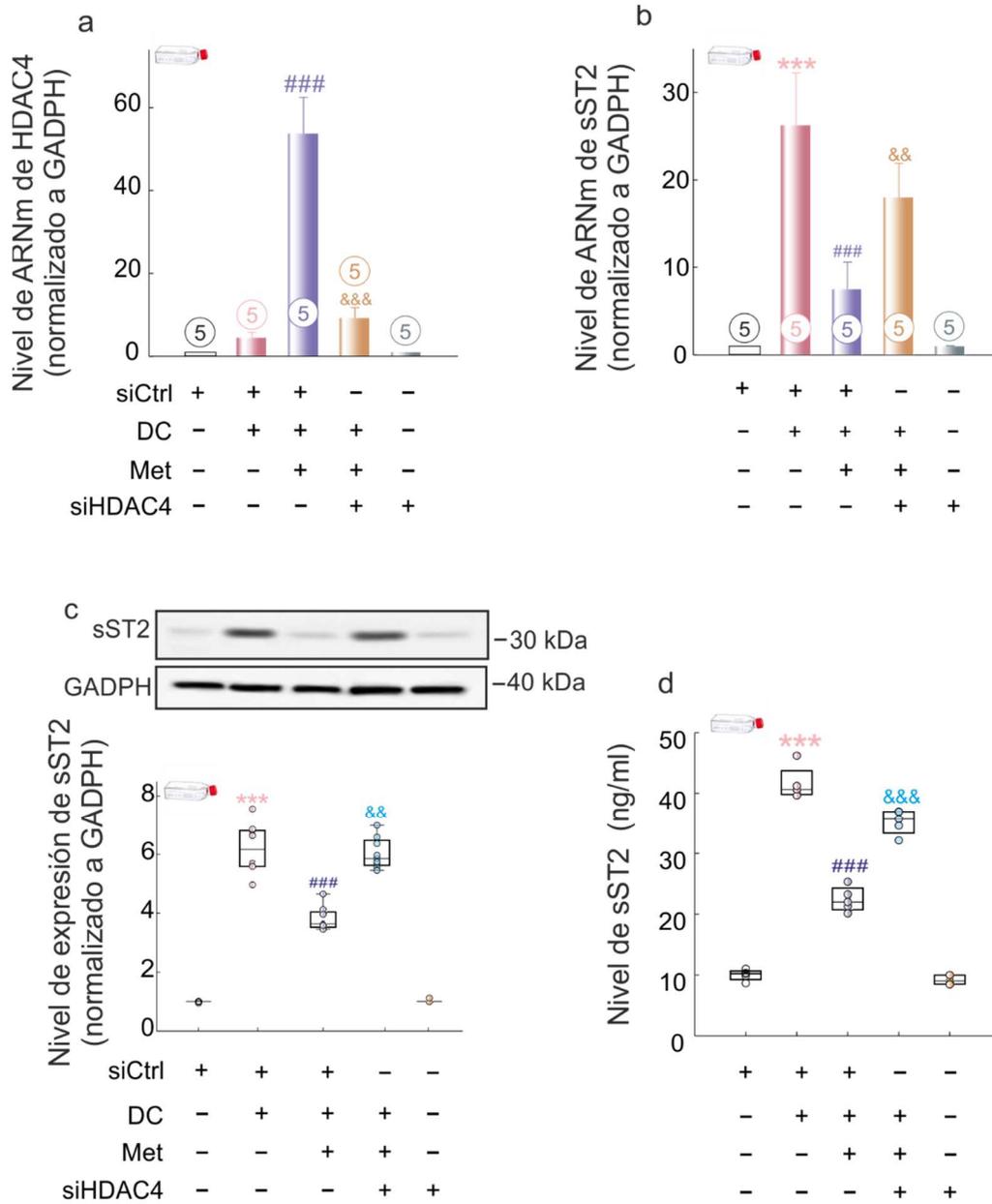


Figura 4.16. (a, b) Niveles de ARNm de HDAC4 y sST2; los datos han sido normalizados al nivel de ARNm de GADPH y se expresan respecto al ensayo control. (c) Imagen representativa de western blot del nivel de expresión de sST2 en el citosol de cardiomiocitos y análisis densitométrico correspondiente evaluado como nivel de sST2/GADPH. (d) Nivel de sST2 en el sobrenadante celular. En la parte inferior de cada uno de los cilindros se representa el número de experimentos analizados por grupo (n=5). *** p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl; ### p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+ DC; && p<0,01, &&& p<0,001 en comparación con el grupo siCtrl+DC+Met. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

Para determinar si el efecto observado es el resultado de una interacción entre HDAC4 y el factor de transcripción Yy1, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación (Figura 4.17, paneles a, b), primero inmunoprecipitando a HDAC4 y luego evaluando la presencia de Yy1 por transferencia western en la fracción aislada del núcleo. En una primera aproximación, evaluamos el nivel de expresión de HDAC4 tanto en los extractos nucleares aislados de la zona del borde del VI infartado como en células sometidas a deformación. El experimento que sirvió de control antes de iniciar el protocolo de co-inmunoprecipitación, permite evaluar un incremento significativo de los niveles de expresión de HDAC4 por metformina en ambos casos (Figura 4.17, paneles a, b). Cuando se estudió la interacción entre Yy1 y HDAC4, nuestros resultados demostraron que mientras en ausencia de metformina (líneas 1 y 2), el nivel de acumulación de Yy1 fue significativamente bajo, el ensayo de co-inmunoprecipitación reveló la presencia de proteína Yy1 co-inmunoprecitada tanto en la fracción nuclear de células sometidas a deformación como en el tejido de la zona del borde del VI infartado y tratadas con metformina (líneas 3 y 4) (Figura 4.17, panel b). Para probar la fiabilidad de nuestro experimento, utilizamos diferentes controles (líneas 5-7). Como se esperaba, la proteína Yy1 co-inmunoprecitada no se observó en las muestras que no fueron tratadas con el anticuerpo contra HDAC4 durante el protocolo de inmunoprecipitación (línea 5). Además, el lisado nuclear procedente de cardiomiocitos donde la expresión del factor Yy1 fue silenciada antes de la co-inmunoprecipitación con HDAC4 (línea 6) evitó el efecto obtenido en cardiomiocitos tratados con metformina antes de la deformación celular, —es decir: incremento de expresión de HDAC4 y, por *ende* aumento de señal de Yy1 por western blot—. Finalmente, se usó Yy1 recombinante para probar la

especificidad del ensayo (línea 7). Tomados en conjunto, estos resultados indican que HDAC4 interactúa específicamente con el factor de transcripción Yy1.

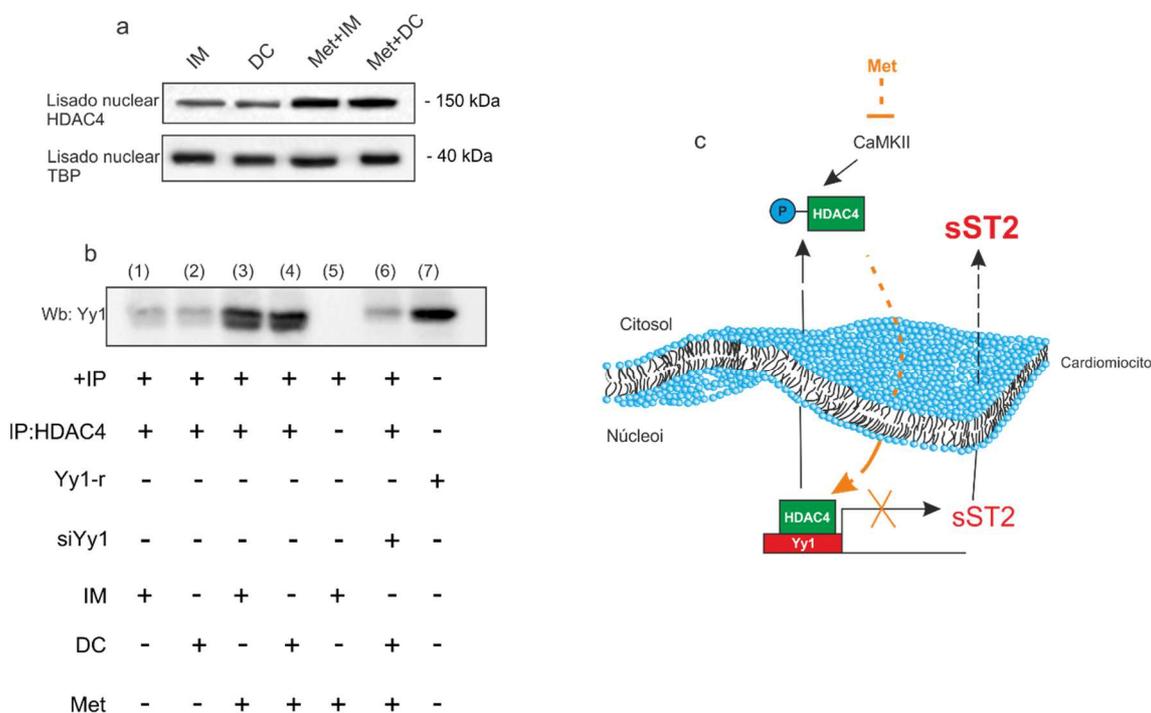


Figura 4.17. HDAC4 se une al factor Yy1 y reprime la transcripción de sST2. (a) Imágenes de western blot representativas del nivel de HDAC4 en la fracción nuclear aislada de la zona del borde del VI infartado o de cardiomiocitos sometidos a deformación celular. (b) Ensayo de co-inmunoprecipitación. (Línea 1) lisado nuclear obtenido de la zona del borde del VI infartado sometido a un protocolo de co-inmunoprecipitación; (Línea 2) lisado nuclear obtenido de cardiomiocitos bajo deformación celular y sometido a un protocolo de co-inmunoprecipitación; (Línea 3) lisado nuclear obtenido de la zona del borde del VI infartado de un animal tratado con metformina durante 4 semanas y sometido a un protocolo de co-inmunoprecipitación; (Línea 4) lisado nuclear obtenido de cardiomiocitos bajo deformación celular y tratados con metformina, sometido a un protocolo de co-inmunoprecipitación; (Línea 5) lisado nuclear obtenido de la zona del borde del VI infartado de un animal tratado con metformina durante 4 semanas y sometido a un protocolo de co-inmunoprecipitación pero en ausencia del anticuerpo anti-HDAC4; (Línea 6) lisado nuclear procedente de cardiomiocitos donde la expresión endógena de Yy1 ha sido silenciada antes de la inducción de la deformación y sometido a un protocolo de co-inmunoprecipitación; (Línea 7) Adición de 2 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína Yy1. (c) Esquema representativo del mecanismo de regulación de la expresión de sST2 por el factor Yy1. Las abreviaturas se describen en figuras anteriores y en el apartado de abreviaturas de esta memoria de Tesis Doctoral.

DISCUSIÓN

Aunque está bien definido el papel de la isoforma soluble del ST2 (sST2) como un potente biomarcador en enfermedades cardíacas como la IC²⁰² y el IM²⁰³, los mecanismos moleculares que regulan su expresión diferencial en el miocardio infartado no se conocen. La identificación de los mecanismos implicados nos permitirá reducir de forma específica la expresión de la isoforma soluble sST2, lo cual incrementará la señalización cardioprotectora asociada al eje IL-33/ST2L, mejorando de esta forma el remodelado adverso asociado al IM. El principal hallazgo de este estudio ha sido la identificación de Yin-yang 1 como un factor de transcripción que es capaz de súper-regular la expresión de sST2 bajo condiciones de estrés, y a HDAC4 como un co-represor que, en una situación basal, bloquea al factor de transcripción Yy1. Además, en este estudio hemos establecido la primera evidencia que relaciona el efecto cardioprotector de metformina con un incremento de la señalización a través del eje molecular IL-33/ST2L, como resultado de una atenuación significativa de la expresión de sST2 en la zona del borde del VI infartado.

Metformina incrementa la expresión de IL-33 y disminuye la expresión de la isoforma soluble sST2

Diversos estudios demuestran que el tratamiento con metformina mejora el remodelado cardíaco adverso en diferentes modelos experimentales, tales como el IM inducido por ligación de la coronaria anterior izquierda, una constricción de la aorta torácica, el tratamiento con isoprotenerol o tras una estimulación ventricular rápida^{115,116,151}. Su uso generalizado fue respaldado en gran medida por un estudio prospectivo realizado en el Reino Unido, el cual informó de una menor mortalidad y morbilidad cardiovascular en pacientes diabéticos tratados con metformina en

comparación con el uso de otros antidiabéticos¹¹⁰. Sin embargo, un meta-análisis publicado en el año 2017 sugirió que estos efectos cardioprotectores asociados al tratamiento con metformina podrían ser menos importantes²⁰⁴; aunque esta afirmación debe interpretarse con precaución porque este estudio se realizó con un pequeño número de ensayos controlados y aleatorios²⁰⁵. Aunque pacientes con enfermedad cardiovascular y DM2 pueden beneficiarse del tratamiento con metformina, las indicaciones asociadas al beneficio cardiovascular en comparación con otros tratamientos antidiabéticos han generado interés en el uso de metformina como tratamiento de la enfermedad cardiovascular, independientemente del estado glucémico del paciente. De hecho, recientemente se han publicado diversos estudios preclínicos y clínicos que sugieren que el tratamiento con metformina no solo es capaz de prevenir la inflamación crónica a través de mejoras en los parámetros metabólicos como la hiperglucemia, la resistencia a la insulina o la dislipidemia aterogénica, sino que también tiene una acción anti-inflamatoria directa que podría beneficiar a las personas con enfermedad cardiovascular no diabética²⁰⁶. De hecho, los datos presentados en nuestro estudio respaldan las propiedades anti-inflamatorias y anti-fibróticas descritas, porque su administración a largo plazo reduce los niveles de expresión de los marcadores pro-inflamatorios y pro-fibróticos evaluados, así como la formación de la cicatriz y la fibrosis intersticial en el tejido de la zona del borde del infarto. No obstante, a pesar de las numerosas evidencias que relacionan el tratamiento con metformina con una mejora del remodelado adverso cardíaco tras el IM, ni el mecanismo molecular ni la ruta de señalización relacionada con esta acción preventiva de metformina se conocen con exactitud.

En este contexto, la evidencia de que metformina mejora la señalización inflamatoria y modula la respuesta hipertrófica independientemente de su acción

sobre el metabolismo celular, nos llevó a caracterizar su efecto sobre la vía de señalización IL-33/ST2L. Los datos presentados en este estudio han permitido evaluar el mecanismo molecular asociado con la modulación de la expresión de la isoforma soluble sST2 tras el IM. Además, hemos sido pioneros en la identificación del factor de transcripción Yy1 como un factor asociado con la expresión de sST2.

Sanada y cols., en un estudio publicado en 2007 describieron una vía de señalización intracelular asociada con el efecto cardioprotector de IL-33 en el miocardio. En este estudio describieron como IL-33, a través de su interacción con el receptor de membrana ST2L, bloquea la fosforilación de las proteínas IKK e I κ B α así como la activación del factor NF- κ B, lo que conduce a una mejora en el remodelado cardíaco adverso¹⁸¹. Por el contrario, al actuar como un receptor señuelo, la isoforma soluble sST2 es capaz de unirse a IL-33 y prevenir la activación de esta ruta de señalización intracelular lo que lleva a un efecto pronóstico negativo sobre el perfil general de riesgo cardiovascular¹⁸¹. Nuestro estudio ha demostrado como el tratamiento con metformina es capaz de prevenir tanto la fosforilación de la proteína I κ B α como la activación del factor NF- κ B en la zona del borde del VI infartado (Fig. 4.5), de forma similar a los datos publicados de forma reciente por Rena y col.,²⁰⁵; quienes describieron cómo el tratamiento con metformina ejerce un efecto anti-inflamatorio en pacientes con IC con una implicación de NF- κ B. En el mismo estudio, los autores propusieron como siguiente paso, que se identificara el mecanismo molecular asociado con el efecto inhibitorio de metformina sobre la activación de NF- κ B. Los datos presentados en nuestro estudio, demostraron que la terapia con metformina disminuyó la expresión y secreción de sST2, incrementó la expresión de IL-33 e inesperadamente, redujo los niveles de ST2L (Fig. 4.3) en el área del borde del VI

infartado. Una explicación a este último efecto de metformina podría estar relacionado con su acción sobre otros factores de transcripción que cooperativamente podrían modular la actividad del promotor distal del gen *IL1RL1* afectando la expresión de ST2L, pero no sobre el promotor proximal, con lo cual los niveles de expresión de la isoforma soluble sST2 no se ven afectados²⁰⁷⁻²⁰⁹. Por otro lado, el uso de un anticuerpo monoclonal específico contra el receptor de membrana ST2L (anti-ST2L) o de sST2-Fc nos permitió demostrar como las variaciones en el nivel de sST2 en el medio extracelular pueden afectar a la señalización intracelular asociada al eje IL-33/ST2L. Por lo tanto, tal y como se describe en la literatura¹⁸¹ parece plausible que un aumento en la expresión y secreción de la isoforma soluble sST2 sea capaz de impedir la unión de IL-33 al receptor de membrana ST2L lo que conduce finalmente a la activación del factor NF- κ B así como a un incremento de la inflamación adversa cardíaca²⁰⁶.

La relación existente entre la expresión de la isoforma soluble sST2 y el remodelado adverso del miocardio tras un IM, se ha evaluado en diferentes estudios experimentales¹⁸³. En estos estudios, se establece un incremento significativo de la expresión de la isoforma soluble sST2 durante las primeras 4 semanas tras el IM, lo cual coincide en el tiempo con la activación de los procesos de fibrosis e inflamación miocárdica^{150,210}. De forma similar, datos recientemente publicados por nuestro grupo de investigación, usando un modelo experimental de IM, han mostrado que la expresión miocárdica de sST2 aumenta rápidamente en la fase aguda y que su expresión correlaciona con los procesos adversos de fibrosis e inflamación²¹⁰. En el ámbito clínico, una concentración elevada en suero de la isoforma soluble sST2 se asocia con un mayor riesgo de padecer IC y con mortalidad^{150,211,212}. En este contexto, las contribuciones de nuestro grupo de investigación han sido numerosas¹⁸² y, entre nuestros hallazgos, hemos establecido

una relación entre niveles altos de sST2 en pacientes con disfunción sistólica y muerte súbita²¹³, lo que también se relacionó con peor remodelado. En este contexto, hemos evaluado una correlación positiva entre los niveles séricos de la isoforma soluble sST2 y los niveles de NT-proBNP, lo cual es consistente con los resultados previos sobre la IC aguda^{214,215} y crónica²⁰².

A pesar de la importancia del sST2 en el miocardio infartado, aún se desconocen los mecanismos que regulan su expresión ante el estrés o el daño cardíaco.

El factor de transcripción Yin-Yang 1 modula la expresión de la isoforma soluble sST2

Varios estudios han evidenciado la existencia de una relación entre la sobre-expresión del factor de transcripción Yy1 con la fisiopatología del remodelado cardíaco adverso. Los datos publicados en 2014 por Kuster y cols., determinaron un incremento de la expresión del factor Yy1 en el miocardio del VI de cerdos infartados¹⁸⁶. Datos similares fueron publicados por Sucharov y cols., en 2003 usando un modelo experimental con IC y muestras de tejido cardíaco procedentes de donantes con IC. En este último estudio los autores establecieron una relación entre la sobre-expresión del factor Yy1 en el miocardio dañado con el bloqueo de la expresión del gen *α MyHC*, lo que evoluciona a hipertrofia cardíaca¹⁸⁷. Nuestros datos indicaron un incremento de los niveles de expresión del factor Yy1 en el tejido de la zona del borde del VI infartado (Fig. 4.6), así como en cardiomiocitos sometidos a daño por deformación (Figs. 4.9 y 4.11). Además, nuestros datos determinaron la re-distribución de este factor de transcripción a nivel sub-celular (Fig. 4.6, paneles b, c) que se caracterizó por su translocación desde el citosol al

núcleo cuando los cardiomiocitos fueron sometidos a una deformación celular simulada (Figura 4.11).

A pesar de lo expuesto anteriormente, una cuestión sin resolver fue conocer la implicación de este factor en el remodelado adverso cardíaco tras el IM — desconocemos los mecanismos moleculares implicados en el efecto adverso del factor Yy1 sobre el miocardio infartado—. Un mecanismo plausible podría estar relacionado con la regulación de la transcripción del gen *ILIRL1*, responsable de la expresión de la isoforma soluble del sST2. De hecho, aunque los datos publicados por tres estudios establecen sitios de reconocimiento específicos para el factor de transcripción Yy1 sobre el promotor proximal del gen *ILIRL1*, no hay estudios experimentales que relacionen directamente al factor Yy1 con la modulación del gen *ILIRL1*^{184,216,217}. Nuestros datos establecieron por primera vez una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el nivel de expresión del factor de transcripción Yy1 y el nivel de sST2 en el área del borde del VI infartado ($r_s = 0,362$, $p = 0,02$) —un hallazgo que al menos indica que ambos elementos moleculares están modulados en paralelo—. Cabe señalar que la terapia con metformina fue capaz de reducir tanto el nivel de expresión del factor de transcripción Yy1 como de la isoforma soluble sST2 (Figs. 4.3, 4.4 y 4.6), lo cual nos sugirió una relación directa entre ambas moléculas.

Para respaldar esta última afirmación, así como poder caracterizar el mecanismo molecular asociado con el efecto adverso del factor de transcripción Yy1 sobre el remodelado cardíaco tras el IM, utilizamos un modelo experimental de hipertrofia simulada, basado en la co-estimulación con éster de forbol PMA y el ionóforo de Ca^{2+} A23187 sobre cardiomiocitos en cultivo. Hay que señalar que este modelo experimental induce de forma sincrónica un estiramiento/deformación celular sostenido en el tiempo¹⁰⁵. De hecho, hay datos bibliográficos que apoyan

el uso de este sistema experimental como modelo capaz de inducir una fuerte respuesta hipertrófica celular cuando se adicionan sobre miocitos ventriculares cardíacos^{105,218,219}. Además, otros estudios han determinado que el co-tratamiento con PMA+A23187 estimula la síntesis y secreción de la isoforma soluble sST2¹⁸¹. Este es nuestro caso, donde la co-estimulación de los cardiomiocitos con PMA+A23187 indujo una respuesta hipertrófica que fue prevenida en presencia de metformina, en términos de incremento del área celular y de la incorporación de leucina tritiada (Fig. 4.8), y un aumento de la expresión y secreción de sST2 de forma paralela a un incremento de los niveles de expresión del factor de transcripción Yy1 (Figs. 4.10 y 4.11). En este contexto, cabe destacar que el uso de este sistema experimental nos permitió establecer por primera vez una relación directa entre la modulación del factor de transcripción Yy1 y la expresión de la isoforma soluble sST2, porque bajo condiciones experimentales de hipertrofia simulada, el silenciamiento génico del factor Yy1 endógeno bloqueó la regulación positiva de sST2 y, lo que es más importante, sin afectar la expresión del receptor de membrana ST2L (Fig. 4.13). Hay que tener en cuenta en este punto que, en la zona del borde del tejido analizado, la expresión del factor Yy1 y sST2, de forma similar a lo evaluado en el modelo animal, muestran una correlación positiva. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que ha demostrado una relación funcional entre el factor de transcripción Yy1 y la modulación de la expresión de la isoforma soluble sST2 en el miocardio infartado.

El estudio publicado por Sanada y cols., determinó que la respuesta cardioprotectora asociada con la activación del eje IL-33/ST2L está relacionada con el bloqueo tanto de la fosforilación de la proteína I κ B α como de la activación del factor NF- κ B, en términos de translocación de la subunidad p65¹⁸¹, lo que conduce a una disminución de la respuesta hipertrófica²⁰¹, que, a su vez, se asocia

con una mejora del daño cardíaco. Algunos autores han descrito como la activación del factor NF- κ B en cardiomiocitos contribuye al daño por isquemia/reperfusión asociada a daño cardíaco²²⁰. Otros han mostrado como su inhibición farmacológica reduce la inflamación cardíaca y la muerte celular inducida por apoptosis²²¹. Nuestro estudio proporcionó evidencias directas sobre el efecto que tiene la variación del nivel extracelular de la isoforma soluble sST2 sobre la activación de la vía intracelular I κ B α /NF- κ B y, en última instancia, la respuesta hipertrófica cardíaca (Fig. 4.14). De hecho, bajo condiciones hipertróficas la disminución de la expresión de la isoforma soluble sST2 en cardiomiocitos donde la expresión del factor Yy1 ha sido silenciada (Fig. 4.13), se asocia con una disminución de la fosforilación de la proteína I κ B α y con el bloqueo de la activación del factor NF- κ B (Figura 4.14), lo que conduce a una mejora de la respuesta hipertrofia celular en términos de área celular e incorporación de leucina tritiada (Figura 4.14, paneles c, d). Cabe señalar que nuestros datos apuntan a una participación directa de la isoforma soluble sST2 en este proceso. Primero, el uso de sST2-Fc eliminó el efecto cardioprotector obtenido cuando el factor Yy1 fue genéticamente silenciado en cardiomiocitos sometidos hipertrofia simulada (Fig. 4.14). Por otro lado, cuando bloqueamos al receptor de membrana ST2L mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-ST2L, el efecto del silenciamiento de Yy1 también fue eliminado. En este caso, aunque la disminución en la expresión de la isoforma soluble sST2, mediante el silenciamiento génico del factor Yy1 (Fig. 4.14), puede favorecer la unión de IL-33 a ST2L y con ello la activación de la vía cardioprotectora, el bloqueo del receptor ST2L previene esta interacción y la activación del eje cardioprotector. Estos datos confirman que el efecto cardioprotector asociado a IL-33 involucra específicamente al receptor de membrana ST2L. En el estudio publicado por Sanada y cols., en 2007, utilizando

angiotensina-II y fenilefrina como modelo experimental para inducir un estado hipertrófico, obtuvo resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio en relación con el efecto que las variaciones en el nivel extracelular de la isoforma soluble sST2 tienen sobre la modulación del eje IL-33/ST2L¹⁸¹. Los hallazgos descritos en nuestro estudio son importantes y añaden valor a lo descrito anteriormente, porque describen los primeros indicios que demuestran como la modulación terapéutica de la actividad del factor de transcripción Yy1 puede ser un potente tratamiento para prevenir la remodelación cardíaca adversa tras el IM.

La proteína HDAC4 regula la actividad del factor de transcripción Yy1 reprimiendo la expresión de sST2

El factor de transcripción Yy1 ha sido identificado como una proteína que, dependiendo del contexto, puede activar o reprimir la transcripción de un gen^{217,222}. Conocemos la existencia de múltiples mecanismos que pueden modular la actividad represora de este factor de transcripción¹⁸⁴. Diversos estudios describen como el factor de transcripción Yy1 puede interaccionar en el promotor con otras proteínas que actúan como co-represores. Este hecho afecta de forma negativa a la actividad de otros factores que pueden estar presentes o incluso puede inducir la alteración de la estructura local de la cromatina, reprimiendo la transcripción del gen²²³. HDAC4 es uno de los co-represores que ha suscitado mayor interés en la investigación²¹⁶. Wang y cols., demostraron que el factor Yy1 se une físicamente con HDAC4 para reprimir la transcripción génica y prevenir la hipertrofia cardíaca¹⁹³. La desfosforilación por fosfatasa y la fosforilación por serina/treonina proteína quinasas controlan la importación y exportación nuclear de HDAC4 e influyen en la actividad de este co-represor. Recientemente, Kreusser y Backs han descrito con detalle el mecanismo de modulación de HDAC4, demostrando que

una de las enzimas involucradas en su fosforilación y, por lo tanto, en el flujo de salida del núcleo hacia el citosol, es la Ca^{2+} /calmodulina proteína quinasa II (CaMKII)¹⁹¹. De manera similar, Backs y sus cols., describieron el mecanismo implicado en la fosforilación de HDAC4 por CaMKII. En este último estudio, los autores encontraron que CaMKII fosforila a HDAC4 en los residuos de Ser⁴⁶⁷ y Ser⁶³², evitando su importación desde el citosol al núcleo¹⁹². Un estudio publicado por Wu y Bers en 2007, demostró que la enzima CaMKII puede translocarse del citosol al núcleo cuando la concentración de Ca^{2+} en el citosol aumenta²²⁴. Además, sabemos que de las cuatro isoformas de CaMKII que se conocen, la δ es la mayoritaria a nivel cardíaco. De esta isoforma se han identificado dos variantes primarias por procesos de corte y empalme, la δB y la δC ¹⁹¹. Mientras que la isoforma δB contiene una señal de localización nuclear y se localiza en el núcleo, la isoforma δC se localiza en el citosol¹⁹¹ y la activación de ambas isoformas conduce a la acumulación de HDAC4 en la fracción citosólica¹⁹². En este sentido, la CaMKII δB nuclear fosforila a HDAC4 en el núcleo, lo que conduce a la translocación de HDAC4 desde el núcleo hasta el citosol. De forma paralela, la activación de CaMKII δC citosólico fosforila a HDAC4 en el citosol evitando su importación al núcleo¹⁹². De forma interesante, sabemos que la inhibición química de CaMKII por KN-93, interrumpe totalmente la función celular al inhibir CaMKII en todas las regiones de la célula²²⁵. Nuestros datos confirman los resultados previamente descritos en la literatura. De esta forma, el IM o la deformación celular puede inducir la fosforilación de HDAC4 y conducir a su acumulación en el citosol, junto con un incremento de los niveles de expresión de sST2. Después de la desfosforilación, HDAC4 puede volver a entrar en el núcleo²²⁶, donde actúa como un co-represor de Yy1²²⁷, lo que conduce a una disminución de la expresión de la isoforma soluble sST2.

Nuestros resultados sugieren que la administración de metformina por periodos largos de tiempo, además de aumentar los niveles totales de proteína HDAC4, previene el desplazamiento núcleo/citosol de HDAC4, lo que finalmente conduce a la regulación negativa de la expresión de sST2. Además, la dependencia inhibitoria generada en presencia de un inhibidor selectivo de CaMKII indica que la expresión de sST2 puede bloquearse como resultado de la inhibición de la fosforilación de HDAC4. Estos resultados sugieren que HDAC4 participa en la modulación de la actividad del factor Yy1 tras el IM, actuando como un co-represor cuando se desfosforila. Para proporcionar un mayor apoyo a este argumento, utilizamos un modelo experimental donde la expresión génica de HDAC4 es silenciada y además evaluamos si HDAC4 está unido a Yy1 usando un ensayo de co-inmunoprecipitación (Figs. 4.16 y 4.17). Nuestros resultados demostraron que HDAC4 y Yy1 trabajan juntos para modular la expresión de la isoforma soluble sST2. En primer lugar, ambos permanecen unidos en la zona del borde del VI infartado y en cardiomiocitos sometidos a deformación celular (Fig. 4.17, panel b) y segundo, el silenciamiento de la expresión de HDAC4 endógeno revirtió el efecto preventivo de metformina, porque al bloquear su expresión aumenta el nivel de sST2 (Fig. 4.16, panel b), lo que indica que HDAC4 está actuando como co-represor del factor Yy1.

En resumen, el presente estudio identifica al factor de transcripción Yy1 y HDAC4 como dos objetivos farmacológicos potenciales para prevenir el remodelado cardíaco adverso tras el IM. Los mecanismos involucrados pueden estar asociados con la inhibición de la fosforilación de la deacetilasa HDAC4, que actúa como co-represor del factor de transcripción Yy1, reprimiendo la expresión de la isoforma circulante sST2. En base a esta mayor comprensión del sistema Yy1/HDAC4 y las enfermedades cardiovasculares, la modulación de este sistema

representa una posible aplicación terapéutica novedosa en la lesión isquémica miocárdica tras el IM.

Perspectiva clínica y conclusión

La identificación de los mediadores involucrados en las vías fisiopatológicas que conducen a la remodelación cardíaca tras el IM puede conducir al desarrollo de terapias dirigidas a paliar este proceso y prevenir la progresión de la insuficiencia cardíaca. Además, la identificación de nuevos biomarcadores más refinados puede ayudar a identificar subpoblaciones que pueden beneficiarse de estrategias terapéuticas específicas. En particular, los niveles de sST2 identifican un mayor riesgo de remodelación cardíaca y eventos clínicos adversos. Nuestro estudio muestra por primera vez que el factor de transcripción Yy1 regula la expresión de sST2, y la represión de Yy1 produce niveles más bajos de sST2. Por lo tanto, la inhibición de la producción de sST2 puede facilitar la interacción entre IL-33 y el receptor transmembrana ST2L, lo que se traduce en efectos cardioprotectores. De hecho, los efectos anti-remodelado adverso asociados con el tratamiento con metformina también se asociaron con una disminución en el nivel intranuclear del factor de transcripción Yy1 y niveles más bajos de HDAC4 fosforilado dentro del espacio citosólico. Nuestro estudio muestra como la manipulación del factor de transcripción Yy1 ó de su co-represor HDAC4 puede representar objetivos farmacológicos potenciales para prevenir la remodelación cardíaca adversa y la progresión a insuficiencia cardíaca.

Este estudio tiene varias limitaciones, que deben señalarse. Primero, nuestras conclusiones se basan en datos obtenidos utilizando un modelo de deformación celular *in vitro*. En base a estos resultados, el siguiente paso es la generación de un modelo animal preclínico que nos permita probar si la

modulación de estos nuevos biomarcadores, mejora el remodelado cardíaco adverso tras el IM. Nuestro estudio caracteriza por primera vez la participación de los factores Yy1 y HDAC4 en la modulación génica de la isoforma soluble de sST2 en la zona del borde del VI infartado, donde está presente una población de cardiomiocitos viables. Sería interesante estudiar las vías de señalización que aquí se han definido en la zona infartada del VI, donde pocos miocitos viables coinciden con otros tipos de células. Por otro lado, aunque en este estudio se ha establecido por primera vez una relación funcional entre HDAC4/Yy1 con la modulación de la expresión de la isoforma soluble sST2, es necesario un análisis más detallado que nos permita obtener evidencias de la interacción física entre el factor de transcripción Yy1 y el promotor proximal del gen *IL1RL1*, que como se comentó anteriormente, regula la expresión de sST2 en cardiomiocitos (ensayo CHip, EMSA).



The equator green jungle and rain forest with trees and bushes. Osmosis version

5



Resumen y conclusiones....



Los resultados descritos en esta memoria de Tesis Doctoral se resumen aquí junto con las conclusiones que de ellos se derivan.

Capítulo 3

- ∅ La terapia con metformina disminuye el tamaño del IM de 4 semanas de evolución.
- ∅ El tratamiento de ratas infartadas con metformina durante 4 semanas tras el IM disminuye el daño oxidativo y la muerte celular apoptótica asociada al daño, en las zonas del borde y del infarto del VI, lo que contribuye a una disminución del tamaño del IM.
- ∅ El tratamiento con metformina durante 4 semanas tras el IM previene la fibrosis cardíaca adversa en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ∅ El tratamiento con metformina durante 4 semanas tras el IM disminuye la expresión de Gal-3 en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ∅ La terapia con metformina durante 4 semanas tras el IM incrementa la actividad de AMPK en las zonas del borde y del infarto del VI y el estado de fosforilación de tuberina en la zona del borde del VI.
- ∅ La terapia con metformina durante 4 semanas tras el IM reduce la expresión y actividad de las enzimas mitoNox y PKC α , en las zonas del borde y del infarto del VI.
- ∅ El incremento de la expresión de AMPK por metformina previene la activación de las enzimas mitoNox y PKC α así como la expresión de Gal-3 en cardiomiocitos sometidos a DC.
- ∅ La enzima mitoNox a través de la activación de PKC α aumenta la expresión y secreción de Gal-3 por cardiomiocitos sometidos a DC.

- ⊗ El aumento de la expresión del AMPK inducido por metformina previene el daño celular asociado con la DC.
- ⊗ La disminución en la fosforilación del AMPK inactiva a tuberina y activa la vía mTORC1/p70S6K lo que conduce a la secreción de Gal-3.
- ⊗ P70S6K que está situada aguas abajo de mTORC1 induce la activación de mitoNox.
- ⊗ Gal-3 que es secretada por cardiomiocitos sometidos a DC induce la activación de los fibroblastos adyacentes.

La fosforilación de la enzima AMPK inducida por el tratamiento con metformina activa a tuberina y conduce al bloqueo de la ruta de señalización intracelular mTORC1/p70S6K. Como resultado a este proceso se produce la inhibición de las enzimas mitoNox y PKC α y finalmente una disminución de la expresión y secreción de Gal-3 por el cardiomiocito. En presencia de daño, Gal-3 secretada por los cardiomiocitos en la fase aguda del IM, induce la activación de los fibroblastos cardíacos y con ello el programa fibrótico adverso.

Capítulo 4

- ⊗ La terapia con metformina previene la extensión del IM de 1 y 4 semanas de evolución.
- ⊗ La terapia con metformina previene la inflamación en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ El tratamiento con metformina modula el sistema IL-33/ST2L en la zona del borde del VI infartado.

- ⊗ La terapia con metformina disminuye la expresión cardíaca de la isoforma soluble sST2 asociada con el IM de 4 semanas de evolución, en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ El tratamiento con metformina bloquea la activación de la proteína IκB y del factor NF-κB asociada con el IM de 4 semanas de evolución, en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ La terapia con metformina disminuye la expresión del factor de transcripción Yin-yang-1 (Yy1) asociada con el IM de 4 semanas de evolución, en la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ La terapia con metformina aumenta la expresión de la deacetilasa HDAC4 en la zona del borde del VI infartado de 1 y 4 semanas de evolución.
- ⊗ La terapia con metformina induce la acumulación de HDAC4 fosforilado en la fracción citosólica de las muestras de tejido aislado de la zona del borde del VI infartado.
- ⊗ El sistema experimental de DC mediante la co-estimulación con PMA+A23187, reproduce los efectos hipertróficos observados en el modelo de IM.
- ⊗ El tratamiento con metformina disminuye la expresión y secreción de la isoforma soluble sST2 asociada con el protocolo de DC y aumenta la acumulación de HDAC4 fosforilada en el citosol celular.
- ⊗ El silenciamiento de la expresión endógena del factor de transcripción Yy1 en cardiomiocitos sometidos a DC, previene el incremento de la expresión y secreción de la isoforma soluble sST2 sin afectar a la isoforma transmembrana ST2L.

- ⊗ Modificaciones en la concentración de la isoforma soluble sST2 en el medio extracelular afectan la señalización intracelular activada por el sistema IL-33/ST2L.
- ⊗ El silenciamiento de la expresión endógena de HDAC4 bloquea el efecto de metformina sobre la expresión y secreción de sST2.
- ⊗ HDAC4 se une al factor de transcripción Yy1 y reprime la transcripción de sST2.

El factor de transcripción Yy1 induce el aumento de la expresión de la isoforma soluble sST2 bajo condiciones de estrés. La inhibición de la fosforilación de HDAC4, que actúa como co-represor de Yy1, reprime la expresión de sST2 en el miocardio infartado. La inhibición de la expresión y secreción de sST2 facilita la interacción entre IL-33 y el receptor transmembrana ST2L, lo que se traduce en efectos cardioprotectores. La manipulación de la expresión génica del factor Yy1 ó de su co-represor HDAC4 puede representar objetivos farmacológicos potenciales para prevenir el remodelado cardíaco adverso. El silenciamiento de la expresión endógena de Yy1 previene el incremento de expresión de la isoforma sST2 pero no afecta a la expresión de ST2L. Aunque la terapia con metformina disminuye la expresión de sST2, también afecta la expresión de la isoforma transmembrana ST2L, por lo que no es un tratamiento de elección que permita la señalización cardioprotectora IL-33/ST2L.



Floating Stones. Jeff Friesen

6



Bibliografía



1. Sperelakis N. Heart physiology and pathophysiology. Academic Press; 2001.
2. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:529–41.
3. Anderson RH, Razavi R, Taylor AM. Cardiac anatomy revisited. *J Anat.* 2004;205:159–77.
4. Dini FL, Guarini G, Ballo P, Carluccio E, Maiello M, Capozza P, Innelli P, Rosa GM, Palmiero P, Galderisi M, Razzolini R, Nodari S, Working Group on Myocardial Function of the Italian Society of Cardiology. The left ventricle as a mechanical engine: from Leonardo da Vinci to the echocardiographic assessment of peak power output-to-left ventricular mass. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2013;14:214–20.
5. Lopez AD, Adair T. Is the long-term decline in cardiovascular-disease mortality in high-income countries over? Evidence from national vital statistics. *Int J Epidemiol.* 2019;
6. WHO | The Atlas of Heart Disease and Stroke. *WHO.* 2010;
7. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart.* 2000;83:361–6.
8. Arbab-Zadeh A, Nakano M, Virmani R, Fuster V. Acute coronary events. *Circulation.* 2012;125:1147–1156.

9. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: A corollary to infarct expansion. *Circulation*. 1986;74:693–702.
10. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161–1172.
11. St. John Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101:2981–2988.
12. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1995;91:1872–1885.
13. Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and Inflammatory Mediators in Tissue Injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:655–677.
14. Tashiro H, Shimokawa H, Yamamoto K, Nagano M, Momohara M, Muramatsu K, Takeishi A. Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1995;130:446–452.
15. Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003;2:242–56.
16. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac

-
- Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:569–582.
17. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140:805–820.
 18. Yu L, Feng Z. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators Inflamm.* 2018;2018.
 19. Lai SL, Marín-Juez R, Stainier DYR. Immune responses in cardiac repair and regeneration: a comparative point of view. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019;76:1365–1380.
 20. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ. Res.* 2004;94:1543–1553.
 21. Sirera R, Salvador A, Roldán I, Talens R, González-Molina A, Rivera M. Quantification of proinflammatory cytokines in the urine of congestive heart failure patients. Its relationship with plasma levels. *Eur J Heart Fail.* 2003;5:27–31.
 22. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2010;176:2177–2187.
 23. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* 2008;173:57–67.

24. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: Possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 1998;98:149–156.
25. Ørn S, Ueland T, Manhenke C, Sandanger, Godang K, Yndestad A, Mollnes TE, Dickstein K, Aukrust P. Increased interleukin-1 β levels are associated with left ventricular hypertrophy and remodeling following acute ST segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention. *J Intern Med*. 2012;272:267–276.
26. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*. 2005;23:845–856.
27. Schaper J, Speiser B. The extracellular matrix in the failing human heart. In: *Cellular and Molecular Alterations in the Failing Human Heart*. Heidelberg: Steinkopff; 1992. p. 303–309.
28. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995;91:161–170.
29. Mewton N, Liu CY, Croisille P, Bluemke D, Lima JAC. Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2011;57:891–903.
30. Van Den Borne SWM, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol*. 2010;7:30–37.

31. Shinde A V., Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014;70:74–82.
32. Weng L, Jia S, Xu C, Ye J, Cao Y, Liu Y, Zheng M. Nogo-C regulates post myocardial infarction fibrosis through the interaction with ER Ca²⁺ leakage channel Sec61 α in mouse hearts. *Cell Death Dis.* 2018;9.
33. Vainio LE, Szabó Z, Lin R, Ulvila J, Yrjölä R, Alakoski T, Piuhola J, Koch WJ, Ruskoaho H, Fouse SD, Seeley TW, Gao E, Signore P, Lipson KE, Magga J, Kerkelä R. Connective Tissue Growth Factor Inhibition Enhances Cardiac Repair and Limits Fibrosis After Myocardial Infarction. *JACC Basic to Transl Sci.* 2019;4:83–94.
34. Francis Stuart SD, De Jesus NM, Lindsey ML, Ripplinger CM. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016;91:114–122.
35. Gulati A, Jabbour A, Ismail TF, Guha K, Khwaja J, Raza S, Morarji K, Brown TDH, Ismail NA, Dweck MR, Di Pietro E, Roughton M, Wage R, Daryani Y, O’Hanlon R, Sheppard MN, Alpendurada F, Lyon AR, Cook SA, Cowie MR, Assomull RG, Pennell DJ, Prasad SK. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;309:896–908.
36. Eghbali M. Cardiac fibroblasts: Function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. In: *Basic Research in Cardiology.* 1992. p.

- 183–189.
37. Moore L, Fan D, Basu R, Kandalam V, Kassiri Z. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2012;17:693–706.
38. Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation.* 2002;105:2512–2517.
39. Laviades C, Varo N, Fernández J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Díez J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation.* 1998;98:535–540.
40. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenes. Tissue Repair.* 2012;5.
41. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18:816–827.
42. Rosenbloom J, Mendoza FA, Jimenez SA. Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2013;1832:1088–1103.
43. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, Andre S, Gabius HJ, Carretero OA. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian

- adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2009;296.
44. Yu L, Ruifrok WPT, Meissner M, Bos EM, Van Goor H, Sanjabi B, Van Der Harst P, Pitt B, Goldstein IJ, Koerts JA, Van Veldhuisen DJ, Bank RA, Van Gilst WH, Silljé HHW, De Boer RA. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Hear Fail*. 2013;6:107–117.
45. Sharma UC. Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3121–3128.
46. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL, Bakker SJL, van der Harst P. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med*. 2012;272:55–64.
47. Ho JE, Liu C, Lyass A, Courchesne P, Pencina MJ, Vasan RS, Larson MG, Levy D. Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:1249–1256.
48. Van Der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, Aukrust P, Guo Y, Adourian A, Muntendam P, Van Veldhuisen DJ, De Boer RA. Prognostic value of changes in galectin-3 levels over time in patients with heart failure data from CORONA and COACH. *Circ Hear Fail*. 2013;6:219–226.
49. Lok DJ, Lok SI, Bruggink-André De La Porte PW, Badings E, Lipsic E,

- Van Wijngaarden J, De Boer RA, Van Veldhuisen DJ, Van Der Meer P. Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*. 2013;102:103–110.
50. De Boer RA, Edelmann F, Cohen-Solal A, Mamas MA, Maisel A, Pieske B. Galectin-3 in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail*. 2013;15:1095–1101.
51. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJV, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WHW, Tsai EJ, Wilkoff BL, American College of Cardiology Foundation, American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:e147–e239.
52. Erratum: 2016 ACC/AHA/HFSA focused update on new pharmacological therapy for heart failure: An update of the 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 Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America (Circulation (2016) 134 (e282-e293) DOI: 10.1161/CIR.0000000000000435). *Circulation*. 2016;134:e298.

53. De Boer RA, Van Der Velde AR, Mueller C, Van Veldhuisen DJ, Anker SD, Peacock WF, Adams KF, Maisel A. Galectin-3: A modifiable risk factor in heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2014;28:237–246.
54. Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 1994;269:20807–20810.
55. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis.
56. Hughes RC. Mac-2: A versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology.* 1994;4:5–12.
57. Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, Ho JE, Liu FT, de Boer RA. Galectin-3 activation and inhibition in heart failure and cardiovascular disease: An update. *Theranostics.* 2018;8:593–609.
58. Díaz-Alvarez L, Ortega E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators Inflamm.* 2017;2017.
59. Kapucuoglu N, Basak PY, Bircan S, Sert S, Akkaya VB. Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract.* 2009;205:97–103.
60. Halimi H, Rigato A, Byrne D, Ferracci G, Sebban-Kreuzer C, ElAntak L, Guerlesquin F. Glycan Dependence of Galectin-3 Self-Association

- Properties. *PLoS One*. 2014;9:e111836.
61. Lin Y-H, Qiu D-C, Chang W-H, Yeh Y-Q, Jeng U-S, Liu F-T, Huang J-R. Galectin-3 self-association The intrinsically disordered N-terminal domain of galectin-3 dynamically mediates multisite self-association of the protein through fuzzy interactions. 2017;
62. Domic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2006;1760:616–635.
63. Martinelli M, Pacilli AMG, Rivetti S, Lauriola M, Fasano L, Carbonara P, Mattei G, Valentini I, Scapoli L, Solmi R. A role for epidermal growth factor receptor in idiopathic pulmonary fibrosis onset. *Mol Biol Rep.* 2011;38:4613–4617.
64. Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Cordone S, Gradini R, Barsotti P, Liu FT, Di Mario U, Pugliese G. Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int Suppl.* 2000;77:S31-9.
65. Dong S, Hughes RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J.* 1997;14:267–274.
66. Margadant C, Van Den Bout I, Van Boxtel AL, Thijssen VL, Sonnenberg A. Epigenetic regulation of galectin-3 expression by β 1 integrins promotes cell adhesion and migration. *J Biol Chem.* 2012;287:44684–44693.
67. Azibani F, Benard L, Schlossarek S, Merval R, Tournoux F, Fazal L, Polidano E, Launay JM, Carrier L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre

-
- C. Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart. *Hypertension*. 2012;59:1179–1187.
68. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001;141:334–341.
69. Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: Eschew obfuscation. *Circ. Res*. 2003;92:1171–1175.
70. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: Development redux in disease. *Genes Dev*. 2003;17:1937–1956.
71. Sadoshima J, Izumo S. THE CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSE OF CARDIAC MYOCYTES TO MECHANICAL STRESS. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:551–571.
72. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: Molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*. 1991;5:3037–3046.
73. Daniels LB, Bayes-Genis A. Using ST2 in cardiovascular patients: a review. *Future Cardiol*. 2014;10:525–39.
74. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD, Rouleau J-L, Lee RT. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:2961–6.
75. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel

- biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:827–40.
76. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23:479–90.
77. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007;117:1538–49.
78. Sánchez-Más J, Lax A, Asensio-López M del C, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Santarelli G, Januzzi JL, Pascual-Figal DA. Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: correlation with cardiac remodelling markers. *Eur J Clin Invest.* 2014;44:643–651.
79. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, Lee RT. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail.* 2009;2:684–91.
80. Bayés-Genís A, Núñez J, Lupón J. Soluble ST2 for Prognosis and Monitoring in Heart Failure: The New Gold Standard? *J Am Coll Cardiol.* 2017;70:2389–2392.
81. Bainey KR, Armstrong PW. Clinical perspectives on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2014;167:637–45.

-
82. Plakht Y, Gilutz H, Shiyovich A. Excess long-term mortality among hospital survivors of acute myocardial infarction. Soroka Acute Myocardial Infarction (SAMI) project. *Public Health*. 2017;143:25–36.
 83. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia*. 2006;49:434–41.
 84. Khan SZ, Rivero M, Nader ND, Cherr GS, Harris LM, Dryjski ML, Dosluoglu HH. Metformin Is Associated with Improved Survival and Decreased Cardiac Events with No Impact on Patency and Limb Salvage after Revascularization for Peripheral Arterial Disease. *Ann Vasc Surg*. 2019;55:63–77.
 85. Retwiński A, Kosmalski M, Crespo-Leiro M, Maggioni A, Opolski G, Ponikowski P, Poloński L, Jankowska E, Drzewoski J, Drożdż J. The influence of metformin and the presence of type 2 diabetes mellitus on mortality and hospitalisation in patients with heart failure. *Kardiol Pol*. 2018;76:1336–1343.
 86. Lexis CPH, van der Horst ICC, Lipsic E, van der Harst P, van der Horst-Schrivers ANA, Wolffenbuttel BHR, de Boer RA, van Rossum AC, van Veldhuisen DJ, de Smet BJGL, GIPS-III Investigators. Metformin in non-diabetic patients presenting with ST elevation myocardial infarction: rationale and design of the glycometabolic intervention as adjunct to

- primary percutaneous intervention in ST elevation myocardial infarction (GIPS)-III trial. *Cardiovasc drugs Ther.* 2012;26:417–26.
87. Yin M, van der Horst ICC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Silljé HHW, de Boer RA. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H459-68.
88. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 1998;39:60–76.
89. Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure. *Cardiovasc Res.* 2019;
90. Manikandan P, Sumitra M, Nayeem M, Manohar BM, Lokanadam B, Vairamuthu S, Subramaniam S, Puvanakrishnan R. Time course studies on the functional evaluation of experimental chronic myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem.* 2004;267:47–58.
91. de Leon EB, Bortoluzzi A, Rucatti A, Nunes RB, Saur L, Rodrigues M, Oliveira U, Alves-Wagner AB, Xavier LL, Machado UF, Schaan BD, Dall’Ago P. Neuromuscular electrical stimulation improves GLUT-4 and morphological characteristics of skeletal muscle in rats with heart failure. *Acta Physiol (Oxf).* 2011;201:265–73.
92. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281.

-
93. Phan TT, Shivu GN, Abozguia K, Sanderson JE, Frenneaux M. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction: from molecular mechanisms to exercise haemodynamics. *Int J Cardiol.* 2012;158:337–43.
 94. Rehn TA, Borge BA, Lunde PK, Munkvik M, Sneve ML, Grøndahl F, Aronsen JM, Sjaastad I, Prydz K, Kolset SO, Wiig H, Sejersted OM, Iversen PO. Temporary fatigue and altered extracellular matrix in skeletal muscle during progression of heart failure in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297:R26-33.
 95. Thomas DP, Hudlická O. Arteriolar reactivity and capillarization in chronically stimulated rat limb skeletal muscle post-MI. *J Appl Physiol.* 1999;87:2259–65.
 96. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med.* 1991;42:225–46.
 97. HEIMBURGER RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg (Chicago, Ill 1920).* 1946;52:677–89.
 98. JOHNS TNP, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954;140:675–682.
 99. Lax A, Sanchez-Mas J, Asensio-Lopez MC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Garrido IP, Pastor-Perez FJ, Januzzi JL, Pascual-Figal DA. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and

- interleukin-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. *JACC Hear Fail*. 2015;3:50–58.
100. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*. 1976;98:367–81.
101. Banerjee I, Carrion K, Serrano R, Dyo J, Sasik R, Lund S, Willems E, Aceves S, Meili R, Mercola M, Chen J, Zambon A, Hardiman G, Doherty TA, Lange S, del Álamo JC, Nigam V. Cyclic stretch of embryonic cardiomyocytes increases proliferation, growth, and expression while repressing Tgf- β signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;79:133–44.
102. Weinberg EO, Shimpo M, De Keulenaer GW, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD, Rouleau J-L, Lee RT. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:2961–6.
103. Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkentin JD. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol*. 2002;156:905–19.
104. Islam KN, Koch WJ. Involvement of nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway in regulation of cardiac G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) expression. *J Biol Chem*. 2012;287:12771–8.
105. Reid BG, Stratton MS, Bowers S, Cavasin MA, Demos-Davies KM, Susano I, McKinsey TA. Discovery of novel small molecule inhibitors of cardiac hypertrophy using high throughput, high content imaging. *J Mol*

-
- Cell Cardiol.* 2016;97:106–13.
106. Neshati Z, Bingen BO, Askar SFA, Schaliij MJ, Pijnappels DA, De Vries AAF. Development of a new model of cardiac hypertrophy with pro-arrhythmic features to study the role of hypertrophy in arrhythmogenesis. *Eur Heart J.* 2013;34:P4984–P4984.
107. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
108. LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–685.
109. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polycrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 1984;10:203–209.
110. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet (London, England).* 1998;352:854–65.
111. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359:1577–89.
112. Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJM, Bestermann WH, Tian R, Lefter DJ. Acute metformin therapy confers cardioprotection against

- myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*. 2008;57:696–705.
113. Jian M-Y, Alexeyev MF, Wolkowicz PE, Zmijewski JW, Creighton JR. Metformin-stimulated AMPK- α 1 promotes microvascular repair in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305:L844-55.
114. Paiva M, Riksen NP, Davidson SM, Hausenloy DJ, Monteiro P, Gonçalves L, Providência L, Rongen GA, Smits P, Mocanu MM, Yellon DM. Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;53:373–8.
115. Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Yong Ji S, Nunez D, Ramachandran A, Anaya-Cisneros M, Tian R, Lefer DJ. Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Metformin Improves Left Ventricular Function and Survival in Heart Failure. *Circ Res*. 2009;104:403–411.
116. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Ito S, Ogai A, Asakura M, Kim J, Minamino T, Takashima S, Sanada S, Sugimachi M, Komamura K, Mochizuki N, Kitakaze M. Metformin Prevents Progression of Heart Failure in Dogs: Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Circulation*. 2009;119:2568–2577.
117. Zhao QD, Viswanadhapalli S, Williams P, Shi Q, Tan C, Yi X, Bhandari B, Abboud HE. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NF κ B signaling pathways. *Circulation*. 2015;131:643–55.

-
118. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall M V, Kranias EG, Molkenstin JD. PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med*. 2004;10:248–254.
 119. Block K, Gorin Y, Abboud HE. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14385–90.
 120. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2010;106:1253–64.
 121. Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:15565–15570.
 122. Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovasc Res*. 2009;82:229–39.
 123. BOYLE A, KELLY D, ZHANG Y, COX A, GOW R, WAY K, ITESCU S, KRUM H, GILBERT R. Inhibition of protein kinase C reduces left ventricular fibrosis and dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:213–221.
 124. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented protein kinase C- α -induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in

- experimental congestive heart failure. *Circ Res.* 2007;101:195–204.
125. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Pickard T, Roden R, Bristow MR, Sabbah HN, Mizrahi JL, Gromo G, King GL, Vlahos CJ. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation.* 1999;99:384–91.
126. Ferreira JCB, Koyanagi T, Palaniyandi SS, Fajardo G, Churchill EN, Budas G, Disatnik M-H, Bernstein D, Brum PC, Mochly-Rosen D. Pharmacological inhibition of β IIPKC is cardioprotective in late-stage hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:980–7.
127. Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:6758–62.
128. Liu Y-H, D'Ambrosio M, Liao T -d., Peng H, Rhaleb N-E, Sharma U, Andre S, Gabius H-J, Carretero OA. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *AJP Hear Circ Physiol.* 2008;296:H404–H412.
129. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K -i., Yoshizato K. Stimulation of Proliferation of Rat Hepatic Stellate Cells by Galectin-1 and Galectin-3 through Different Intracellular Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 2003;278:18938–18944.

130. Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *J Pathol.* 1999;187:481–489.
131. Pascual-Figal DA, Lax A, Perez-Martinez MT, del Carmen Asensio-Lopez M, Sanchez-Mas J, on behalf of GREAT Network. Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54.
132. Sanchez-Mas J, Lax A, Asensio-Lopez MC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Garrido IP, Pastor F, Januzzi JL, Pascual-Figal DA. Galectin-3 expression in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2014;172:e98–e101.
133. Meijers WC, van der Velde AR, Pascual-Figal DA, de Boer RA. Galectin-3 and post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Eur J Pharmacol.* 2015;763:115–121.
134. Somanna NK, Valente AJ, Krenz M, Fay WP, Delafontaine P, Chandrasekar B. The Nox1/4 Dual Inhibitor GKT137831 or Nox4 Knockdown Inhibits Angiotensin-II-Induced Adult Mouse Cardiac Fibroblast Proliferation and Migration. AT1 Physically Associates With Nox4. *J Cell Physiol.* 2016;231:1130–1141.
135. Song X, Qian X, Shen M, Jiang R, Wagner MB, Ding G, Chen G, Shen B. Protein kinase C promotes cardiac fibrosis and heart failure by modulating galectin-3 expression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853:513–521.

136. Wang C-H, Yang N-I, Liu M-H, Hsu K-H, Kuo L-T. Estimating systemic fibrosis by combining galectin-3 and ST2 provides powerful risk stratification value for patients after acute decompensated heart failure. *Cardiol J.* 2013;
137. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58:1072–83.
138. Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, Moses BL. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med.* 7:247–52.
139. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B, Thompson CB. Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs p53-Deficient Tumor Cell Growth. *Cancer Res.* 2007;67:6745–6752.
140. Zou M-H, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2004;279:43940–51.
141. Banerjee I, Carrion K, Serrano R, Dyo J, Sasik R, Lund S, Willems E,

- Aceves S, Meili R, Mercola M, Chen J, Zambon A, Hardiman G, Doherty TA, Lange S, del Álamo JC, Nigam V. Cyclic stretch of embryonic cardiomyocytes increases proliferation, growth, and expression while repressing Tgf- β signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;79:133–144.
142. Asensio-López MC, Soler F, Sánchez-Más J, Pascual-Figal D, Fernández-Belda F, Lax A. Early oxidative damage induced by doxorubicin: Source of production, protection by GKT137831 and effect on Ca²⁺ transporters in HL-1 cardiomyocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2016;594:26–36.
143. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:607–14.
144. Asensio-López MC, Lax A, Pascual-Figal DA, Valdés M, Sánchez-Más J. Metformin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of the adiponectin cardiac system. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1861–1871.
145. Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes.* 2012;5:513.
146. Lax A, Sanchez-Mas J, Asensio-Lopez MC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Garrido IP, Pastor-Perez FJ, Januzzi JL, Pascual-Figal DA. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and interleukin-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after

- acute myocardial infarction. *JACC Hear Fail.* 2015;3.
147. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74:1141–8.
148. Asensio-López MC, Sánchez-Más J, Pascual-Figal DA, Abenza S, Pérez-Martínez MT, Valdés M, Lax A. Involvement of ferritin heavy chain in the preventive effect of metformin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2013;57.
149. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–8.
150. Lax A, Sanchez-Mas J, Asensio-Lopez MC, Fernandez-Del Palacio MJ, Caballero L, Garrido IP, Pastor-Perez FJ, Januzzi JL, Pascual-Figal DA. Mineralocorticoid Receptor Antagonists Modulate Galectin-3 and Interleukin-33/ST2 Signaling in Left Ventricular Systolic Dysfunction After Acute Myocardial Infarction. *JACC Hear Fail.* 2015;3:50–58.
151. Xiao H, Ma X, Feng W, Fu Y, Lu Z, Xu M, Shen Q, Zhu Y, Zhang Y. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF 1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 2010;87:504–513.
152. Cameron AR, Logie L, Patel K, Erhardt S, Bacon S, Middleton P, Harthill J, Forteach C, Coats JT, Kerr C, Curry H, Stewart D, Sakamoto K, Repiščák P, Paterson MJ, Hassinen I, McDougall G, Rena G. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox*

-
- Biol.* 2018;14:187–197.
153. Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, Sakaue H, Wataoka Y, Emi A, Senga Y, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes*. 2010;59:1608–15.
154. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108:1167–74.
155. Zhang P, Hu X, Xu X, Fassett J, Zhu G, Viollet B, Xu W, Wiczer B, Bernlohr DA, Bache RJ, Chen Y. AMP activated protein kinase- α 2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2008;52:918–24.
156. Daskalopoulos EP, Dufey C, Bertrand L, Beauloye C, Horman S. AMPK in cardiac fibrosis and repair: Actions beyond metabolic regulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:188–200.
157. Kurian GA, Rajagopal R, Vedantham S, Rajesh M. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–14.
158. Matsushima S. Overexpression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in

- Mice. *Circulation*. 2006;113:1779–1786.
159. Wang J, Hong Z, Zeng C, Yu Q, Wang H. NADPH oxidase 4 promotes cardiac microvascular angiogenesis after hypoxia/reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med*. 2014;69:278–288.
160. Sato N, Takasaka N, Yoshida M, Tsubouchi K, Minagawa S, Araya J, Saito N, Fujita Y, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Hara H, Kadota T, Yanagisawa H, Hashimoto M, Utsumi H, Wakui H, Kojima J, Numata T, Kaneko Y, Odaka M, Morikawa T, Nakayama K, Kohrogi H, Kuwano K. Metformin attenuates lung fibrosis development via NOX4 suppression. *Respir Res*. 2016;17:107.
161. He T, Xiong J, Nie L, Yu Y, Guan X, Xu X, Xiao T, Yang K, Liu L, Zhang D, Huang Y, Zhang J, Wang J, Sharma K, Zhao J. Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway. *J Mol Med*. 2016;94:1359–1371.
162. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1–S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med*. 2007;13:252–259.
163. Eid AA, Ford BM, Bhandary B, de Cassia Cavaglieri R, Block K, Barnes JL, Gorin Y, Choudhury GG, Abboud HE. Mammalian target of rapamycin regulates Nox4-mediated podocyte depletion in diabetic renal injury. *Diabetes*. 2013;62:2935–47.
164. Sciarretta S, Forte M, Frati G, Sadoshima J. New Insights Into the Role of

-
- mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2018;122:489–505.
165. Guimaraes DA, dos Passos MA, Rizzi E, Pinheiro LC, Amaral JH, Gerlach RF, Castro MM, Tanus-Santos JE. Nitrite exerts antioxidant effects, inhibits the mTOR pathway and reverses hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Free Radic Biol Med*. 2018;120:25–32.
166. Völkers M, Konstandin MH, Doroudgar S, Toko H, Quijada P, Din S, Joyo A, Ornelas L, Samse K, Thuerauf DJ, Gude N, Glembotski CC, Sussman MA. Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation*. 2013;128:2132–44.
167. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Weiss CS, Bea F, Bekeredjian R, Schinke-Braun M, Izumo S, Katus HA, Hardt SE. Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2435–46.
168. Sakaguchi M, Isono M, Isshiki K, Sugimoto T, Koya D, Kashiwagi A. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340:296–301.
169. Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ, de Tombe PP. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in

- experimental congestive heart failure. *Circ Res.* 2007;101:195–204.
170. Thallas-Bonke V, Jha JC, Gray SP, Barit D, Haller H, Schmidt HHHW, Coughlan MT, Cooper ME, Forbes JM, Jandeleit-Dahm KAM. Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy. *Physiol Rep.* 2014;2:e12192–e12192.
171. Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int J Mol Sci.* 2012;13:10697–10721.
172. Mummidi S, Das NA, Carpenter AJ, Kandikattu H, Krenz M, Siebenlist U, Valente AJ, Chandrasekar B. Metformin inhibits aldosterone-induced cardiac fibroblast activation, migration and proliferation in vitro, and reverses aldosterone+salt-induced cardiac fibrosis in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;98:95–102.
173. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:5060–5065.
174. Martínez-Martínez E, Calvier L, Fernández-Celis A, Rousseau E, Jurado-López R, Rossoni L V., Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, López-Andrés N. Galectin-3 Blockade Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis in Experimental Hyperaldosteronism and Hypertension Novelty and Significance. *Hypertension.* 2015;66:767–775.

-
175. Chen Q, Thompson J, Hu Y, Das A, Lesnefsky EJ. Metformin attenuates ER stress-induced mitochondrial dysfunction. *Transl Res.* 2017;190:40–50.
176. Zhu M, Li J, Li Z, Luo W, Dai D, Weaver SR, Stauber C, Luo R, Fu H. Mortality rates and the causes of death related to diabetes mellitus in Shanghai Songjiang District: An 11-year retrospective analysis of death certificates. *BMC Endocr Disord.* 2015;15.
177. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES-2018. 2017;
178. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, Danchin N, Deaton C, Escaned J, Hammes HP, Huikuri H, Marre M, Marx N, Mellbin L, Ostergren J, Patrono C, Seferovic P, Uva MS, Taskinen MR, Tendera M, Tuomilehto J, Valensi P, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Erol Ç, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, De Backer G, Ezquerra EA, Avogaro A, Badimon L, Baranova E, Betteridge J, Ceriello A, Funck-Brentano C, Gulba DC, Kjekshus JK, Lev E, Mueller C, Neyses L, Nilsson PM, Perk J, Reiner Ž, Sattar N, Schächinger V, Scheen A, Schirmer H, Strömberg A, Sudzhaeva S, Viigimaa M, Vlachopoulos C, Xuereb RG. ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2013;34:3035–3087.

179. Weinberg EO. ST2 protein in heart disease: from discovery to mechanisms and prognostic value. *Biomark Med.* 2009;3:495–511.
180. Pascual-Figal DA, Lax A, Perez-Martinez MT, Asensio-Lopez MDC, Sanchez-Mas J. Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54.
181. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007;117:1538–49.
182. Januzzi JL, Pascual-Figal D, Daniels LB. ST2 testing for chronic heart failure therapy monitoring: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol.* 2015;115:70B–5B.
183. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:827–40.
184. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene.* 2006;25:1125–42.
185. Calame K, Atchison M. YY1 helps to bring loose ends together. *Genes Dev.* 2007;21:1145–52.
186. Kuster DWD, Merkus D, Blonden LA, Kremer A, van IJcken WFJ, Verhoeven AJM, Duncker DJ. Gene reprogramming in exercise-induced cardiac hypertrophy in swine: A transcriptional genomics approach. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;77:168–74.

-
187. Sucharov CC, Mariner P, Long C, Bristow M, Leinwand L. Yin Yang 1 is increased in human heart failure and represses the activity of the human alpha-myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem*. 2003;278:31233–9.
188. Nan C, Huang X. Transcription factor Yin Yang 1 represses fetal troponin I gene expression in neonatal myocardial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:62–7.
189. Deng Z, Cao P, Wan MM, Sui G. Yin Yang 1: a multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcription*. 2010;1:81–4.
190. Mathiyalagan P, Keating ST, Du X-J, El-Osta A. Chromatin modifications remodel cardiac gene expression. *Cardiovasc Res*. 2014;103:7–16.
191. Kreusser MM, Backs J. Integrated mechanisms of CaMKII-dependent ventricular remodeling. *Front Pharmacol*. 2014;5:36.
192. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2006;116:1853–64.
193. Wang X, Feng Y, Xu L, Chen Y, Zhang Y, Su D, Ren G, Lu J, Huang B. YY1 restrained cell senescence through repressing the transcription of p16. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:1876–83.
194. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res*. 1991;69:1476–86.

195. Stuck BJ, Lenski M, Böhm M, Laufs U. Metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with angiotensin II are prevented by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2008;283:32562–9.
196. Lax A, Soler F, Fernández-Belda F. Intracellular Ca^{2+} pools and fluxes in cardiac muscle-derived h9c2 cells. *J Bioenerg Biomembr.* 2005;37:249–59.
197. Liu Q, Merkler KA, Zhang X, McLean MP. Prostaglandin F₂α suppresses rat steroidogenic acute regulatory protein expression via induction of Yin Yang 1 protein and recruitment of histone deacetylase 1 protein. *Endocrinology.* 2007;148:5209–19.
198. Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes.* 2012;5:513.
199. Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall M V, Kranias EG, Molkenin JD. PKC-α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 2004;10:248–54.
200. Islam KN, Koch WJ. Involvement of Nuclear Factor κB (NF-κB) Signaling Pathway in Regulation of Cardiac G Protein-coupled Receptor Kinase 5 (GRK5) Expression. *J Biol Chem.* 2012;287:12771–12778.
201. Yin H, Li P, Hu F, Wang Y, Chai X, Zhang Y. IL-33 attenuates cardiac remodeling following myocardial infarction via inhibition of the p38

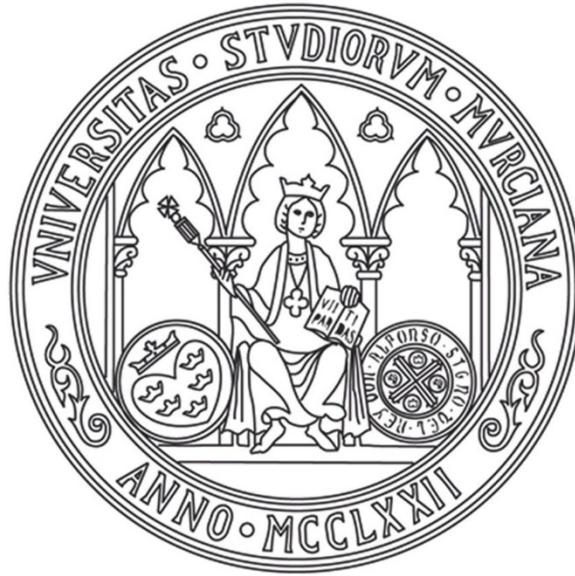
-
- MAPK and NF- κ B pathways. *Mol Med Rep*. 2014;9:1834–8.
202. Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau J-L, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation*. 2003;107:721–6.
203. Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM, Lee RT. Serum Levels of the Interleukin-1 Receptor Family Member ST2 Predict Mortality and Clinical Outcome in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 2004;109:2186–2190.
204. Heszen NA, Riksen NP, Aalders B, Ritskes-Hoitinga M, El Messaoudi S, Wever KE. A systematic review and meta-analysis of the protective effects of metformin in experimental myocardial infarction. *PLoS One*. 2017;12:e0183664.
205. Rena G, Lang CC. Repurposing Metformin for Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2018;137:422–424.
206. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, Mohan M, Forteach C, Beall C, McNeilly AD, Balfour DJK, Savinko T, Wong AKF, Viollet B, Sakamoto K, Fagerholm SC, Foretz M, Lang CC, Rena G. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Novelty and Significance. Circ Res*. 2016;119:652–665.
207. Udhane SS, Legeza B, Marti N, Hertig D, Diserens G, Nuoffer J-M, Vermathen P, Flück CE. Combined transcriptome and metabolome analyses of metformin effects reveal novel links between metabolic

- networks in steroidogenic systems. *Sci Rep.* 2017;7:8652.
208. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:475.
209. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, Inage E, Niyonsaba F, Hara M, Suzuki R, Ohtsuka Y, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C. Involvement of PU.1 in Mast Cell/Basophil-Specific Function of the Human IL1RL1/ST2 Promoter. *Allergol Int.* 2012;61:461–467.
210. Sanchez-Mas J, Lax A, Asensio-Lopez M, Fernandez-Del Palacio M, Caballero L, Santarelli G, Januzzi J, Pascual-Figal D. Modulation of IL-33/ST2 system in post-infarction heart failure: correlation with cardiac remodeling markers. *Eur J Clin Invest.* 2014;44:643–51.
211. Bayes-Genis A, de Antonio M, Vila J, Peñafiel J, Galán A, Barallat J, Zamora E, Urrutia A, Lupón J. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:158–66.
212. Aimo A, Vergaro G, Passino C, Ripoli A, Ky B, Miller WL, Bayes-Genis A, Anand I, Januzzi JL, Emdin M. Prognostic Value of Soluble Suppression of Tumorigenicity-2 in Chronic Heart Failure. *JACC Hear Fail.* 2017;5:280–286.
213. Pascual-Figal DA, Ordoñez-Llanos J, Tornel PL, Vázquez R, Puig T, Valdés M, Cinca J, de Luna AB, Bayes-Genis A, MUSIC Investigators. Soluble ST2 for Predicting Sudden Cardiac Death in Patients With Chronic

- Heart Failure and Left Ventricular Systolic Dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:2174–2179.
214. Southcombe JH, Lédée N, Perrier d’Hauterive S, Turner K, Child T, Snider J V, Redman CWG, Sargent IL, Granne I. Detection of soluble ST2 in human follicular fluid and luteinized granulosa cells. *PLoS One.* 2013;8:e74385.
215. Pascual-Figal DA, Manzano-Fernández S, Boronat M, Casas T, Garrido IP, Bonaque JC, Pastor-Perez F, Valdés M, Januzzi JL. Soluble ST2, high-sensitivity troponin T- and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: complementary role for risk stratification in acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:718–25.
216. Han S, Lu J, Zhang Y, Cheng C, Han L, Wang X, Li L, Liu C, Huang B. Recruitment of histone deacetylase 4 by transcription factors represses interleukin-5 transcription. *Biochem J.* 2006;400:439–48.
217. Giger JM, Bodell PW, Zeng M, Baldwin KM, Haddad F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol.* 2009;107:1204–12.
218. Hartong R, Villarreal FJ, Giordano F, Hilal-Dandan R, McDonough PM, Dillmann WH. Phorbol myristate acetate-induced hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes is associated with decreased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) gene expression and calcium reuptake. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2467–77.

219. Hayakawa M, Yanagisawa K, Aoki S, Hayakawa H, Takezako N, Tominaga S. T-helper type 2 cell-specific expression of the ST2 gene is regulated by transcription factor GATA-3. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1728:53–64.
220. Ling H, Gray CBB, Zambon AC, Grimm M, Gu Y, Dalton N, Purcell NH, Peterson K, Brown JH. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II δ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor- κ B. *Circ Res*. 2013;112:935–44.
221. Kim YS, Kim JS, Kwon JS, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Kang JC, Ahn Y. BAY 11-7082, a nuclear factor- κ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model. *Int Heart J*. 2010;51:348–53.
222. Riggs KJ, Merrell KT, Wilson G, Calame K. Common factor 1 is a transcriptional activator which binds in the c-myc promoter, the skeletal alpha-actin promoter, and the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol*. 1991;11:1765–9.
223. Thomas MJ, Seto E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene*. 1999;236:197–208.
224. Wu X, Bers DM. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes. *Cell Calcium*. 2007;41:353–64.
225. Li B, Dedman JR, Kaetzel MA. Nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent

- protein kinase II in the murine heart. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006;1763:1275–1281.
226. Grozinger CM, Schreiber SL. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7835–40.
227. Li L, Yang X-J. Molecular and Functional Characterization of Histone Deacetylase 4 (HDAC4). *Methods Mol Biol.* 2016;1436:31–45.



Resumen/Abstract

RESUMEN

Introducción

El infarto agudo de miocardio (IAM) es un problema sanitario de primer nivel. Si bien su mortalidad en la fase aguda se ha reducido en los últimos años, su pronóstico a medio y largo plazo sigue siendo malo debido a la repercusión estructural y funcional que conlleva la necrosis miocárdica. Tras el IAM, se ponen en marcha una serie de mecanismos de reparación local en el tejido infartado, fundamentalmente inflamación y fibrosis, que condicionan un riesgo de arritmia ventricular y de deterioro de la función miocárdica sistólica y diastólica, así como otros en el tejido no infartado, fundamentalmente fibrosis e hipertrofia, con una función inicial compensadora pero que en la evolución conllevan cambios estructurales patológicos y pérdida de la función cardíaca. Es por ello, que el IAM conlleva un elevado riesgo de muerte y evolución a la insuficiencia cardíaca. Diversos estudios muestran como una concentración en suero elevada de Galectina-3 ó de la isoforma soluble sST2 identifica mal pronóstico, pero también un remodelado ventricular más adverso en este tipo de pacientes. Sin embargo, los mecanismos moleculares que modulan su expresión y su señalización a nivel celular no son bien conocidos. De hecho, no existen tratamientos dirigidos a modular de forma específica la expresión de estos biomarcadores. Su caracterización permitirá el desarrollo y uso de nuevos tratamientos que eviten el remodelado miocárdico adverso tras el IAM mejorando la calidad de vida de nuestros pacientes. La consecución del plan de trabajo se inicia estudiando el efecto del tratamiento con metformina, un antidiabético que a pesar de haber sido capaz de mejorar el remodelado ventricular post-IAM y retrasar la progresión hasta Insuficiencia Cardíaca, los mecanismos moleculares aún no se han descrito.

Objetivos

La consecución del plan de trabajo a desarrollar tiene por objetivos generales: (1) la caracterización de los mecanismos moleculares asociados con la expresión y secreción de Gal-3 por cardiomiocitos y estudiar su acción paracrina sobre los fibroblastos cardíacos adyacentes; y (2) la identificación de los elementos reguladores de la expresión específica de la isoforma sST2 por el miocardio infartado.

Metodología

Este estudio se ha realizado usando un modelo animal de IM mediante la ligación de la arteria coronaria anterior descendente izquierda. Además, se han utilizado cultivos de cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos a los que se les somete a protocolos de deformación biomecánica celular y modelos *Knockdown*. El remodelado ventricular tras el IM se estudia por PCR cuantitativa, western blot e inmunofluorescencia. La función cardíaca por ecocardiografía.

Resultados y conclusiones

La fosforilación de la enzima AMPK inducida por el tratamiento con metformina activa α tuberina y conduce al bloqueo de la ruta de señalización intracelular mTORC1/p70S6K. Como resultado a este proceso se produce la inhibición de las enzimas mitoNox y PKC α y finalmente una disminución de la expresión y secreción de Gal-3 por el cardiomiocito. En presencia de daño, Gal-3 secretada por los cardiomiocitos en la fase aguda del IM, induce la activación de los fibroblastos cardíacos y con ello el programa fibrótico adverso.

Así mismo, nuestro grupo ha sido pionero en demostrar que el factor de transcripción Yy1 induce el aumento de la expresión de la isoforma soluble sST2 bajo condiciones de estrés. La inhibición de la fosforilación de HDAC4, que actúa como co-represor de Yy1, reprime la expresión de sST2 en el miocardio infartado. La inhibición de la expresión y secreción de sST2 facilita la interacción entre IL-33 y el receptor transmembrana ST2L, lo que se traduce en efectos cardioprotectores. La manipulación de la expresión génica del factor Yy1 ó de su co-represor HDAC4 puede representar objetivos farmacológicos potenciales para prevenir el remodelado cardíaco adverso. El silenciamiento de la expresión endógena de Yy1 previene el incremento de expresión de la isoforma sST2 pero no afecta a la expresión de ST2L. Aunque la terapia con metformina disminuye la expresión de sST2, también afecta la expresión de la isoforma transmembrana ST2L, por lo que no es un tratamiento de elección que permita la señalización cardioprotectora IL-33/ST2L.

ABSTRACT

Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is a major health problem. Although its mortality in the acute phase has been reduced in recent years, its prognosis in the medium and long-term remains poor due to the structural and functional impact of myocardial necrosis. After AMI, a series of local repair mechanisms are implemented in the infarcted tissue, mainly inflammation and fibrosis, which condition a risk of ventricular arrhythmia and deterioration of systolic and diastolic myocardial function, as well as others in the non-infarcted tissue, mainly fibrosis and hypertrophy, with an initial compensatory function but which in evolution lead to pathological structural changes and loss of cardiac function. For this reason, AMI carries a high risk of death and evolution to heart failure. Several studies show how a high serum concentration of Galectin-3 or the soluble isoform sST2 identifies a poor prognosis, but also a more adverse ventricular remodeling in this type of patients. However, the molecular mechanisms that modulate their expression and signaling at the cellular level are not well known. In fact, there are no treatments aimed at specifically modulating the expression of these biomarkers. Their characterization will allow development and use of new treatments that avoid adverse myocardial remodeling after AMI improving the quality of life of our patients. The achievement of the work plan begins by studying the effect of treatment with metformin, an antidiabetic that despite having been able to improve post-AMI ventricular remodeling and delay progression to heart failure, the molecular mechanisms have not yet been described.

Aims

The achievement of the work plan to be developed has general objectives: (1) To characterize the molecular mechanisms associated with the expression and secretion of Gal-3 by cardiomyocytes and the study of their paracrine action on adjacent cardiac fibroblasts; and (2) To identify the elements regulating the specific expression of the isoform sST2 by the infarcted myocardium.

Methodology

This study was performed using an animal model of MI by ligation of the left descending anterior coronary artery. In addition, cardiomyocyte and cardiac fibroblast cultures have been used and subjected to biomechanical cell deformation protocols and Knockdown models. Ventricular remodeling after IM is studied by quantitative PCR, western blot and immunofluorescence. Cardiac function by echocardiography.

Results and conclusions

Phosphorylation of the AMPK enzyme induced by treatment with metformin activates tuberin which leads to blockage of the mTORC1/p70S6K intracellular signaling pathway. As a result of this process, the enzymes mitoNox and PKC are inhibited and finally there is a decrease in the expression and secretion of Gal-3 by the cardiomyocyte. In the presence of damage, Gal-3 secreted by cardiomyocytes in the acute phase of MI, induces activation of cardiac fibroblasts and thus the adverse fibrotic program.

On the other hand, we have been pioneers in demonstrating the key role of the transcription factor Ying yang-1 (Yy1) on cardiac sST2 expression. Indeed, Yy1 induces increased expression of the soluble isoform sST2 under stress conditions. Inhibition of HDAC4 phosphorylation, which acts as co-repressor of Yy1, represses the expression of sST2 in the infarcted myocardium. The inhibition of the expression and secretion of sST2 facilitates the interaction between IL-33 and the transmembrane ST2L receptor, which translates into cardioprotective effects. Manipulation of Yy1 factor gene expression or its HDAC4 co-repressor may represent potential pharmacological targets to prevent adverse cardiac remodeling. Silencing the endogenous expression of Yy1 prevents increased expression of sST2 isoform but does not affect ST2L expression. Although metformin therapy decreases the expression of sST2, it also affects the expression of the transmembrane isoform ST2L, so it is not a treatment of choice that allows cardioprotective IL-33/ST2L signaling.

