

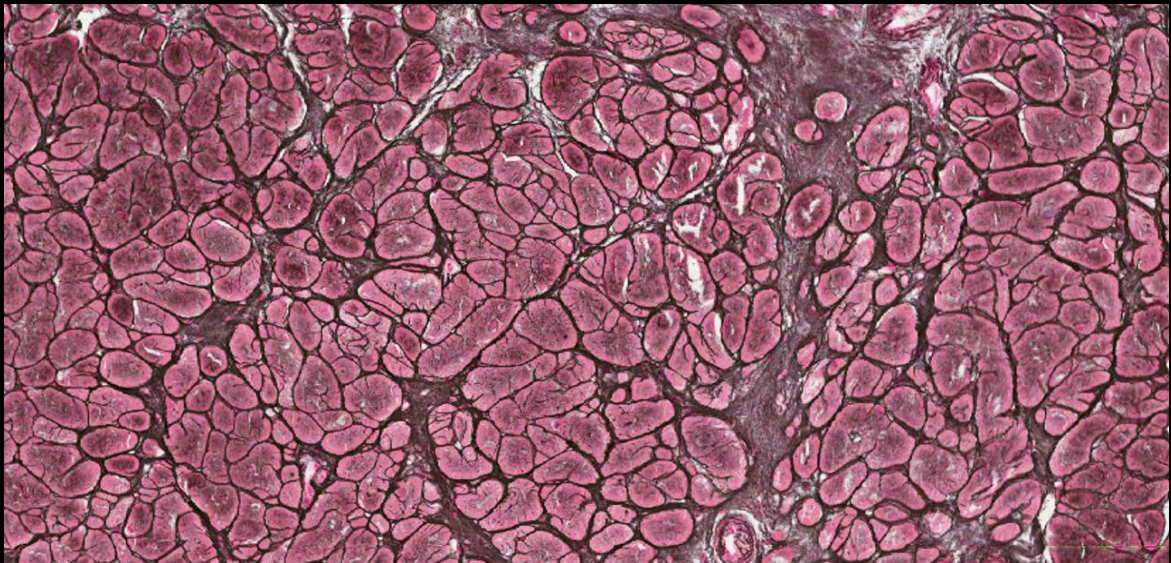
eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Estudio de la implicación de las distintas
isoenzimas PLC β ₍₁₋₄₎ en el desarrollo de la
hipertrofia cardíaca**



Tesis doctoral

ANE LAZKANO NAVARLAZ

2017

biodonostia

osasun ikerketa institutua
instituto de investigación sanitaria



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Erizaintza II Saila /
Departamento de Enfermería II

Estudio de la implicación de las distintas isoenzimas PLC β ₍₁₋₄₎ en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca

Ane Lazkano Navarraz

Tesis dirigida por:

Mikel-Asier Garro Beristain

Ramón Querejeta Iraola

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

**Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina y Enfermería**

2017

Este trabajo perteneciente al Programa de Doctorado en Farmacología ha sido realizado en el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia y en el Departamento de Enfermería II/Erizaintza Saila II bajo la dirección del Dr. Mikel-Asier Garro Beristain y el Dr. Ramón Querejeta Iraola, gracias a una beca predoctoral para la Formación de Investigadores del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco/Eusko Jurlaritz (BFI-2010-380) y a la ayuda a proyectos de investigación del Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco/Eusko Jurlaritz (2010111027).

Manoliri.

Eta amari, aitari eta Joneri.

Radiohead – No Surprises
<https://youtu.be/u5CVsCnxyXg>

Eskerrak – Agradecimientos

Ibilbide honetan tesi-zuzendari izan dudana Asier Garrori nire eskerrik beroenak adieraziz hasi nahiko nuke atal hau. Bere bulegoan kardiomiopatoekin egiten zuen ikerketa-lana azaldu zidan lehen egunetik gaurko egunera arte eskaini didan denbora, laguntza eta babes guztiagatik.

Quisiera agradecer también a mi co-director Ramón Querejeta su apoyo, sin su colaboración el presente trabajo no hubiera sido posible. Y por darme la oportunidad de trabajar en sus proyectos y acercarme al mundo clínico de las enfermedades cardiovasculares.

Eskerrik asko a los dos, bidaia gogor baina zirrargarri honetan nire gidari izateagatik. ¡Ha sido un camino duro pero apasionante!

Milari ere bihotzez eskerrak eman nahi nizkioke, tesi proiektu honen lanaren zati bat berea ere badelako, eta momenturo laguntzeko prest dagoelako. Mila esker Mila.

Eskerrik asko, halaber, Biodonostiako lankideei, behar izan dudanero *pezera-z* bestalde laguntza eskaini didatelako. -1. solairutik +3. solairura bitarteko lankide guztiarekin etapa hau konpartitzea handia izan da!

Mila esker baita ere estenosi aortikoko proiektukide izan ditudanei, beraien laguntzagatik. Baita Ion Andreuri ere, laginak deszellularizatzean ikasitakoagatik.

Me gustaría darle las gracias también a Javier Díez y a su equipo del grupo Insuficiencia Cardíaca del CIMA, en especial a Begoña López, por su cálida acogida y por el tiempo dedicado a enseñarme.

Eskerrik asko *Petarditei* ere, urte hauetan bide-lagun izan ditudalako, eta behar nuenero babes-hitzak eman dizkidatelako, eskerrik asko neskak!!

Untzaeneko estatistikariei eta AmoreTourreko lagunei ere eskerrak, *Doktoragaien Bikoteen eta Tesien Biktimen Elkartean* onartu eta behar izan dudanero laguntza eskaini didatelako.

Azkenik, ibilbide luze honetan nire ondoan egon diren familiakoei eta lagunei. Eta bereziki, amari, aitari, Joneri eta Enekori. Eskerrik asko guztiei bihotz-bihotzez!!

Índice

Índice general

Índice.....	i
Abreviaturas, acrónimos y símbolos.....	xi
Resumen	xix
Introducción	1
1. Fosfolipasa C.....	3
1.1 Estructura de las PLCs	4
1.2 Clasificación de las PLCs en mamíferos	7
2. Fosfolipasa C β	10
2.1 Estructura de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$	10
2.2 Expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y sus variantes transcripcionales.....	11
2.3 Activación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$	14
3. Hipertrofia cardíaca	17
3.1 El corazón.....	17
3.2 Insuficiencia cardíaca.....	21
3.3 Hipertrofia cardíaca	22
3.4 Estenosis aórtica.....	30
4. Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en el miocardio.....	31
4.1 Expresión de PLCs en el miocardio	31
4.2 Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y su función cardíaca.....	32
4.3 Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y la hipertrofia cardíaca	32
Hipótesis y objetivos	35
1. Hipótesis	37
2. Objetivos	38
Material y métodos	39
1. Material biológico.....	41
1.1 Muestras de rata y ratón	41
1.2 Cultivos celulares	42
1.3 Muestras humanas	45
2. Análisis de la expresión de proteínas	47
2.1 Obtención de extractos proteicos	47
2.2. Análisis de proteínas.....	48
3. Análisis de la expresión génica.....	51
3.1 Aislamiento de ARN	51
3.2 Determinación de la concentración de ARN	52

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR): generación del ADNc	53
3.4 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	53
4. Estudio histomorfológico.....	55
4.1 Cuantificación del diámetro cardiomiocitario.....	55
4.2 Determinación del colágeno fibrilar.....	56
5. Estudio bioquímico.....	58
5.1 Determinación de las concentraciones en sangre de angiotensina II y noradrenalina.....	58
5.2 Determinación de las concentraciones en sangre de los marcadores bioquímicos del metabolismo del colágeno	58
5.3 Determinación de la concentración en sangre del propéptido N-terminal del péptido natriurético cerebral.....	59
6. Estudios clínicos	59
6.1 Variables estudiadas	59
6.2 Estudio de variables demográficas y clínicas.....	60
6.3 Estudio ecocardiográfico	60
10. Análisis estadístico	63
Resultados.....	65
Capítulo 1: Caracterización de la expresión de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco de mamíferos y cardiomiocitos murinos HL-1.....	67
1. Expresión de la proteína de la isoenzima PLC β_4 en ventrículo izquierdo.....	69
2. Patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo .69	
2.1 Ventrículo izquierdo de rata y ratón	69
2.2 Ventrículo izquierdo humano	71
3. Expresión de la proteína de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos murinos HL-171	
4. Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos murinos HL-1....	73
Capítulo 2: Estudio de la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras el tratamiento con diferentes agentes hipertróficos	75
1. Efecto de diferentes estimuladores hipertróficos sobre la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1.....	77
1.1 Efecto del tratamiento con angiotensina II 1 μ M durante 24 horas en cardiomiocitos murinos HL-1.....	77
1.2 Efecto del tratamiento con fenilefrina 10 μ M durante 48 horas en cardiomiocitos murinos HL-1.....	78
Capítulo 3: Estudio de la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa	81
1. Características clínicas generales de los pacientes con estenosis aórtica severa .83	

2. Estudio de la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo humano patológico con estenosis aórtica severa y ventrículo izquierdo humano control con estenosis mitral	84
3. Evaluación de niveles séricos de angiotensina II y noradrenalina en sangre de pacientes con estenosis aórtica severa	85
4. Estudio del diámetro de los cardiomiocitos en pared libre de ventrículo izquierdo y en septo interventricular de pacientes con estenosis aórtica severa	87
5. Estudio de la fibrosis miocárdica en pacientes con estenosis aórtica severa	87
5.1 Fracción de volumen y distribución de colágeno en pared libre de ventrículo izquierdo y en septo interventricular de pacientes con EAo	87
5.2 Evaluación de la síntesis y degradación del colágeno a nivel bioquímico en pacientes con EAo	89
6. Evaluación de índices de morfología ventricular, función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo	90
7. Estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo, los niveles séricos de angiotensina II y noradrenalina y el tamaño cardiomiocitario de pacientes con estenosis aórtica severa	90
7.1 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa vs concentración sérica de angiotensina II y noradrenalina.....	90
7.2 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ vs diámetro cardiomiocitario de ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa	91
7.3 Diámetro cardiomiocitario de ventrículo izquierdo de pacientes con EAo vs concentración sérica de angiotensina II y noradrenalina.....	92
8. Estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo y la fibrosis miocárdica en pacientes con estenosis aórtica severa	93
8.1 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs fracción de volumen y distribución del colágeno en ventrículo izquierdo de pacientes con EAo	93
8.2 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno en pacientes con EAo.....	94
9. Estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de ventrículo izquierdo y parámetros generales, índices de morfología ventricular, función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo	95
9.1 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs características generales de los pacientes con estenosis aórtica severa	95
9.2 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs índices de morfología ventricular izquierda.....	95

9.3 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs índices de función sistólica en pacientes con estenosis aórtica severa	96
9.4 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs índices de función diastólica en pacientes con estenosis aórtica severa.....	97
Discusión	99
1. Expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo humano, de rata y de ratón, y en cardiomiocitos murinos HL-1	101
2. Regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras el tratamiento con diferentes agentes hipertróficos.....	106
3. Estudio de la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa	111
4. Limitaciones del estudio	120
Conclusiones	121
Anexos	125
Anexo 1: Reactivos y tampones	127
A) Biología molecular	127
B) Cultivos celulares	129
Anexo 2: Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario, GPR, IMVI y FVC en pacientes con EAo	133
Anexo 3: Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario, GPR, IMVI y los parámetros ecocardiográficos en pacientes con EAo	135
Anexo 4: Análisis de asociación entre la FVC y los parámetros ecocardiográficos en pacientes con EAo	137
Anexo 5: Análisis de asociación entre niveles séricos de angiotensina II y noradrenalina, fibrosis miocárdica, y los parámetros ecocardiográficos en pacientes con EAo.....	139
Anexo 6: Artículos científicos publicados a partir del presente trabajo	141
Bibliografía	145

Índice de figuras

Figura 1: Hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP ₂) por la fosfolipasa C β	3
Figura 2: Clasificación y estructura de dominios de PLCs en mamíferos.....	4
Figura 3: Representación de la conservación de los dominios compartidos por las PLCs humanas.....	5
Figura 4: Diagrama de la estructura tridimensional de la isoenzima PLC β ₂	6
Figura 5: Estructura de la familia PLC γ	7
Figura 6: Estructura de la familia PLC δ	8
Figura 7: Estructura de la familia PLC ϵ	8
Figura 8: Estructura de la familia PLC ζ	9
Figura 9: Estructura de la familia PLC η	9
Figura 10: Representación esquemática de variantes transcripcionales de PLC β en ratón.....	10
Figura 11: Estructura de la familia PLC β	11
Figura 12: Resumen de las variantes transcripcionales de las isoenzimas PLC β ₍₁₋₄₎ y su longitud en diferentes especies	11
Figura 13: Variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β ₁	12
Figura 14: Comparación de parte de la secuencia de aminoácidos (aa) del extremo CT de las variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β ₂	13
Figura 15: Dos de las variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β ₄	14
Figura 16: Vía de señalización proteínas G _q – PLC β	15
Figura 17: Anatomía del corazón humano.....	18
Figura 18: Estructura del cardiomiocito.....	20
Figura 19: Geometrías de la hipertrofia cardíaca fisiológica y patológica	23
Figura 20: Esquema de las principales vías de señalización involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica.....	25
Figura 21: Matriz del colágeno fibrilar.....	26
Figura 22: Diferentes tipos de fibrosis miocárdica.....	28
Figura 23: Desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda en la estenosis aórtica ..	30
Figura 24: Vía de señalización proteína G _{q/11} -PLC β en la hipertrofia cardíaca patológica	33
Figura 25: Diagrama temporal de los tratamientos administrados a los cardiomiocitos HL-1	44
Figura 26: Esquema representativo del procedimiento para el análisis de la expresión génica de las isoenzimas PLC β ₍₁₋₄₎	51
Figura 27: Esquema representativo del proceso seguido por las muestras miocárdicas para el estudio histomorfológico.....	55
Figura 28: Tinción Gordon y Sweets para la reticulina.....	56
Figura 29: Tinción rojo picosirio para el colágeno.	57
Figura 30: Imágen descriptiva de la determinación de la distribución del colágeno fibrilar en un paciente con EAo.....	57

Figura 31: Representación del western blot de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco patológico humano, de rata y de ratón 69

Figura 32: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de rata y ratón, y en sangre de ratón..... 70

Figura 33: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano control y en sangre humana 71

Figura 34: Caracterización de la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1..... 72

Figura 35: Localización subcelular de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1 73

Figura 36: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1 control 74

Figura 37: Efecto sobre el área celular de los cardiomiocitos HL-1 del tratamiento con angiotensina II 1 μ M durante 24 h. 77

Figura 38: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1 control y tras 24 h de tratamiento con angiotensina II 1 μ M 78

Figura 39: Efecto sobre el área celular de los cardiomiocitos HL-1 del tratamiento con fenilefrina 10 μ M durante 48 h 78

Figura 40: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1 control y tras 48 h de tratamiento con 10 μ M fenilefrina..... 79

Figura 41: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en pared libre y septo interventricular de ventrículo izquierdo de pacientes con EAo 84

Figura 42: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano control..... 85

Figura 43: Concentraciones de angiotensina II en suero de sangre periférica y de sangre de seno coronario en pacientes con EAo 86

Figura 44: Diámetro de cardiomiocitos en PL y en SI de pacientes con EAo..... 87

Figura 45: Fracción de volumen de colágeno en PL y en SI de pacientes con EAo.... 88

Figura 46: Distribución del depósito de colágeno en PL y en SI de pacientes con EAo. 88

Figura 47: Resumen de las variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β_4 y su longitud en diferentes especies102

Índice de tablas

Tabla 1. Sondas prediseñadas utilizadas en este estudio.	54
Tabla 2. Variables determinadas a los pacientes con EAo.....	59
Tabla 3. Características generales de los pacientes con EAo	83
Tabla 4. Concentraciones de noradrenalina en suero de sangre periférica y de sangre de seno coronario en pacientes con EAo	86
Tabla 5. Concentraciones de biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno en suero de sangre de seno coronario en pacientes con EAo	89
Tabla 6. Parámetros ecocardiográficos de los pacientes con EAo	90
Tabla 7. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI en pacientes con EAo y sus niveles de angiotensina II y noradrenalina	91
Tabla 8. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y el diámetro cardiomiocitario de VI en pacientes con EAo.....	91
Tabla 9. Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de VI de pacientes con EAo y sus concentraciones séricas de angiotensina II y noradrenalina	92
Tabla 10. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y la fracción de volumen de colágeno en pacientes con EAo	93
Tabla 11. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y los biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno del seno coronario en pacientes con EAo.....	94
Tabla 12. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y las características generales de pacientes con EAo.....	95
Tabla 13. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y los índices de morfología ventricular izquierda en pacientes con EAo.....	96
Tabla 14. Análisis de asociación entre expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo.....	97
Tabla 15. Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de PL de VI y SI, índices de morfología y la fracción de volumen de colágeno en pacientes con EAo ..	133
Tabla 16. Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de PL y SI, índices de morfología y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo.	135
Tabla 17. Análisis de asociación entre la fracción de volumen de colágeno de PL y SI, y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo.	137
Tabla 18. Análisis de asociación entre las concentraciones de angiotensina II y noradrenalina y la fracción de volumen de colágeno en pacientes con EAo.....	139
Tabla 19. Análisis de asociación entre las concentraciones séricas de angiotensina II y noradrenalina, y los índices de función sistólica y diastólica en pacientes con EAo...	139

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

°C	Grado Celcius
Aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico cíclico
ALT/GPT	Alanina aminotransferasa
AMP	Adenosín monofosfato
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
ANP	Péptido natriurético auricular, <i>atrial natriuretic peptide</i>
ARA-II	Antagonistas de los receptores de la AT II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST/GOT	Aspartato aminotransferasa
AT II	Angiotensina II
AT ₁	Receptor tipo 1 para la angiotensina II
AT ₂	Receptor tipo 2 para la angiotensina II
ATP	Adenosín trifosfato
AVAo	Área valvular aórtica
BSA	Albúmina de suero de bovino, <i>bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺	Calcio
CAMKII	Quinasa dependiente de calcio/calmodulina II, <i>calcio/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CaR	Receptores sensibles al calcio, <i>calcium-sensing receptor</i>
CCL2	<i>Chemokine (CC motif) ligand 2</i>
CCL4	<i>Chemokine (CC motif) ligand 4</i>
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
cm	Centímetro
CO ₂	Carbono dióxido
CT	C-terminal, carboxilo-terminal
DAG	Diacilglicerol
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DIVId	Diámetro interior de VI en diástole
DIVIs	Diámetro interior de VI en sístole
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato, <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
DOC	Deoxicolato de sodio
DPBS	Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco sin calcio y magnesio
DTD	Diámetro telediastólico
EAO	Estenosis aórtica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico

EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Estenosis mitral
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EST	Marcador de secuencia expresada, <i>expressed sequence tags</i>
ET-1	Endotelina-1
ET _A	Receptor tipo A para la endotelina-1
ET _B	Receptor tipo B para la endotelina-1
FBS	Suero fetal bovino, <i>fetal bovine serum</i>
FE	Fracción de eyección
FGR	Filtrado glomerular renal
FVC	Fracción de volumen de colágeno
g	Fuerza g
G	Gauge
GAP	Proteínas activadoras GTPasa
Gap	Uniones en hendidura
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
GGT	Gamma-glutamil-transpeptidasa
GMP _c	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G, <i>G protein-coupled receptors</i>
GPR	Grosor parietal relativo
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
G _α	Subunidad α de la proteína heterotrimérica G
G _{βγ}	Subunidades β y γ de la proteína heterotrimérica G
h	Hora
HDAC	Histona deacetilasas
HeLa	Células epiteliales humanas procedentes de carcinoma de cuello uterino
HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
Hz	Hercio
IAVAo	Índice de área valvular aórtica
IC	Insuficiencia cardíaca
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1, <i>insulin-Like Growth Factor 1</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IMVI	Índice de masa ventricular izquierda
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato, <i>inositol 1,4,5-triphosphate</i>
K	lisina
kDa	Kilodalton
xiv	

L	Litro
Log	Logaritmo
LPA	Ácido lisofosfatídico
m	Metro
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDAM	Media del desplazamiento sistólico anterior del anillo mitral
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
MMP	Metaloproteinasa de matriz, <i>matrix metalloproteinase</i>
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero, <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MVI	Masa ventricular izquierda
MWFS	Fracción de acortamiento mesoparietal, <i>midwall fractional shortening</i>
MYH	Miosina
n	Tamaño de la muestra
NA	Noradrenalina
NFAT	Factor nuclear del linfocito T activado, <i>nuclear factor of activated T cells</i>
ng	Nanogramo
NHERF2	<i>Sodium-hydrogen exchange regulatory cofactor 2</i>
nm	Nanómetro
NT	N-terminal, amino-terminal
NT-proBNP	Propéptido N-terminal del péptido natriurético cerebral, <i>N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide</i>
NYHA	Clasificación funcional de la IC de la <i>New York Heart Association</i>
P	Valor de probabilidad
PAD	Presión arterial diastólica
PAR-3	<i>Protease activated receptor-3</i>
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>Post synaptic density protein-95, Drosophila disc large tumor suppressor-1, and Zonula occludens-1 protein</i>
PE	Fenilefrina, <i>phenylephrine</i>
pg	Picogramo
PH	Dominio de homología a <i>Pleckstrina</i>
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa, <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKA	Proteína quinasa A, <i>protein kinase A</i>
PKC	Proteína quinasa C, <i>protein kinase C</i>

PKD	Proteína quinasa D, <i>protein kinase D</i>
PL	Pared libre del ventrículo izquierdo
PLC	Fosfolipasa C, <i>phospholipase C</i>
PP	Grosor de la pared posterior
PPd	Grosor de la pared posterior en diástole
PPs	Grosor de la pared posterior en sístole
PSd	Grosor de la pared del septo en diástole
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
R	Arginina
r	Coeficiente de Pearson
R*	Receptor activado
RA	Dominio asociado a Ras
Rap1	<i>Ras-related protein 1</i>
Ras-GEF	Dominio parecido al factor intercambiador de nucleótidos de guanina para los miembros de la familia Ras
RA- α	Receptores adrenérgicos- α
RA- β	Receptores adrenérgicos- β
RE	Retículo endoplasmático
Ref.	Referencia
RGS	Proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G, <i>regulators of G protein signaling</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SC	Seno coronario
SCp	Superficie corporal
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SH	Dominio de homología a src
SH2	Dominio de homología a src 2
SH3	Dominio de homología a src 3
SI	Septo interventricular
siRNA	ARN interferente, <i>small interfering RNA</i>
SP	Sangre periférica de vena antecubital
SRP14	Partícula de reconocimiento de señal 14, <i>signal recognition particle 14</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β , <i>transforming growth factor β</i>
TIMP	Inhibidor tisular específico de las MMPs, <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α , <i>tumor necrosis factor-α</i>
TSVI	Tracto de salida de VI
UDP	Uridina difosfato, <i>uridine diphosphate</i>
V	Voltios
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
xvi	

<i>vs</i>	<i>versus</i>
VTD	Volumen telediastólico
VTI	Integral velocidad-tiempo del flujo
VTS	Volumen telesistólico
X/Y <i>linker</i>	Inserto autoinhibitorio que entrelaza los dominios X e Y
y cols.	Y colaboradores
Δ	Delta
β -bloq	β -bloqueante
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro
μ m	Micrómetro

Resumen

Resumen

La hipertrofia cardíaca patológica es la respuesta del miocardio a estímulos neurohumorales, a la sobrecarga hemodinámica o a lesiones del tejido cardíaco, y se caracteriza por el incremento de la masa del corazón y del diámetro cardiomiocitario, así como por el desarrollo de fibrosis miocárdica y de disfunción cardíaca. La adrenalina, noradrenalina, angiotensina II y endotelina-1 han sido identificados como los factores neurohumorales más importantes en estimular la hipertrofia cardíaca patológica y en contribuir a su progresión hacia la insuficiencia cardíaca. Todos estos factores hipertróficos comparten el hecho de que dentro del complejo entramado de señalización activan la fosfolipasa C β (PLC β) a través de receptores acoplados a proteínas heterotriméricas G $_{q/11}$. De las tres isoenzimas PLC $\beta_{(1-3)}$ descritas en el miocardio, sólo las isoenzimas PLC β_1 y PLC β_3 han sido relacionadas con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Sin embargo, se desconoce si la isoenzima PLC β_4 también se expresa en tejido cardíaco y qué función podría desempeñar. Asimismo, no se conoce la regulación diferencial que podrían sufrir las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras los diferentes estímulos hipertróficos recibidos en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica, ni la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en la hipertrofia ventricular izquierda humana.

En este trabajo de investigación se ha realizado el estudio de la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en la hipertrofia cardíaca centrado en tres aspectos principales: en primer lugar, se ha determinado la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 y el patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo (VI) de diferentes especies y en cardiomiocitos murinos HL-1. Gracias a este análisis, se ha establecido que la isoenzima PLC β_4 se expresa en tejido cardíaco y que es la isoenzima más expresada en VI. En segundo lugar, se ha estudiado la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras el tratamiento con diferentes agentes hipertróficos. Los resultados sugieren que la angiotensina II y la fenilefrina regulan de manera diferencial la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1, aunque con aumentos en la isoenzima PLC β_4 en ambos casos. Por último, mediante la obtención de muestras de VI de pacientes con estenosis aórtica severa, se ha determinado la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en un modelo humano de hipertrofia ventricular izquierda, y se ha podido estudiar su asociación con la activación humoral, la hipertrofia cardiomiocitaria, la fibrosis miocárdica e índices de morfología ventricular, función sistólica y función diastólica presentadas por los pacientes.

Laburpena

Bihotz hipertrofia patologikoa estimulu neurohumoralen, galkarga hemodinamikoaren edota bihotz-ehunak jasandako lesioen aurrean miokardioak emandako erantzuna da. Hipertrofia patologikoan bihotz-masaren eta kardiomiotoen diametroaren handipena dago, baita miokardioko fibrosiaren eta bihotz-disfuntzioaren garapena ere. Adrenalina, noradrenalina, angiotensina II eta endotelina-1 bihotz hipertrofia patologikoa estimulatu eta bihotz-gutxiegitasuneranzko garapenean laguntzen duten faktore neurohumoral garrantzitsuenak dira. Faktore hipertrofiko horiek guztiek, seinaleztapen-sistema konplexuaren baitan, $G_{q/11}$ proteina heterotrimerikoei lotutako hartzaileen bitartez fosfolipasa $C\beta$ (PLC β) aktibatzen dute. Orain arte, miokardioan hiru PLC $\beta_{(1-3)}$ isoentzima deskribatu dira, eta PLC β_1 eta PLC β_3 dira bihotz-hipertrofiaren garapenarekin erlazionatu diren bakarrak. Hala ere, bihotz-ehunean PLC β_4 isoentzima adierazten den eta zein funtzio beteko lukeen ez da jakina. Gainera, bihotz hipertrofia patologikoan sortzen diren estimulu hipertrofikoek PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimak era bereizgarrian erregulatzen dituzten ere ezjakina da; baita giza ezker bentrakuluaren hipertrofian PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimek duten parte-hartzea ere.

Ikerlan honetan, bihotz-hipertrofian PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimen adierazpen-analisisa egin da, eta ikerketa hiru atal nagusitan banatu da. Batetik, hainbat espeziaren ezker bentrakuluan eta HL-1 sagu-kardiomiotoetan, PLC β_4 isoentzimen proteina-adierazpena eta PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimen gene-adierazpenaren patroia aztertu da. Azterketa horri esker, bihotz-ehunean PLC β_4 isoentzima adierazten dela eta ezker bentrakuluan maila handienetan adierazten den isoentzima dela zehaztu da. Bestetik, agente hipertrofikoaren tratamenduek eragindako PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimen erregulazioa ikertu da. Emaitzek, HL-1 kardiomiotoetan, angiotensina II-k eta fenilefrinak PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimak era bereizgarrian erregulatzen dituztela iradoki dute, baina bi kasuetan PLC β_4 isoentzima-maila handituz. Azkenik, estenosi aortiko larria duten pazienteen ezker bentrakuluaren laginak erabiliz, PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimen gene-adierazpena aztertu da giza ezker bentrakuluaren hipertrofian. Horri esker, PLC $\beta_{(1-4)}$ isoentzimen adierazpen-mailaren eta pazienteen aktibazio-humoralaren, kardiomioto-hipertrofiaren, miokardio-fibrosiaren eta bentrakulu-morfologiaren, funtzio-sistolikoaren eta funtzio-diastolikoaren indizeen arteko asoziazioa aztertu da.

Summary

Pathological cardiac hypertrophy is the myocardium response to neurohumoral stimuli, hemodynamic overload or cardiac tissue injury, and is characterized by increased heart mass and cardiomyocyte diameter, as well as the development of myocardial fibrosis and cardiac dysfunction. Adrenaline, noradrenaline, angiotensin II and endothelin-1 have been identified as the most important neurohumoral factors in stimulating pathological cardiac hypertrophy and contributing to its progression to heart failure. All these hypertrophic factors share the fact that they activate phospholipase C β (PLC β) by G $_{q/11}$ -protein-coupled receptors in the complex downstream signalling pathway. Three PLC $\beta_{(1-3)}$ isozymes have been described in the myocardium, and only PLC β_1 and PLC β_3 have been implicated in the development of cardiac hypertrophy. However, it is unknown whether PLC β_4 isozyme is also expressed in cardiac tissue and the role that it might play. Moreover, it is unknown the differential regulation of PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes by different hypertrophic stimuli and the involvement of PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes in the human left ventricular hypertrophy.

The present work studies three main aspects of the PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes expression in cardiac hypertrophy: firstly, PLC β_4 isozyme protein expression and PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes gene expression pattern have been determined in the left ventricle (LV) of different species and in murine HL-1 cardiomyocytes. This analysis confirms the presence of PLC β_4 in cardiac tissue and revealed PLC β_4 as the most expressed isozyme in the LV. Secondly, PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes regulation has been studied after the treatment with different hypertrophic agents. The results suggest that angiotensin II and phenylephrine regulate differentially the PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes gene expression in HL-1 cardiomyocytes, although with PLC β_4 isozyme increases in both cases. Lastly, PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes gene expression has been determined in a human model of left ventricular hypertrophy by obtaining LV samples from patients with severe aortic stenosis. In addition, the association of PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes with the humoral activation, cardiomyocyte hypertrophy, myocardial fibrosis, ventricular morphology and systolic and diastolic function index has been analyzed.

Introducción

1. Fosfolipasa C

La fosfolipasa C (PLC) es una familia de fosfodiesterasas dependientes de calcio (Ca^{2+}) que cataliza selectivamente la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en respuesta a la activación de receptores mediante hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y otras moléculas (Gresset y cols., 2012). El PIP_2 es un fosfolípido que se localiza en la membrana plasmática y regula una amplia variedad de funciones celulares, como la reorganización del citoesqueleto, la endocitosis, y la actividad de canales iónicos (Yin y Janmey, 2003; Ling y cols., 2006; Suh y Hille, 2008). Es por ello que la regulación de sus niveles mediante la PLC u otras enzimas es necesaria para la homeostasis celular (Fukami, 2002). La escisión que provoca la PLC en el PIP_2 genera dos importantes segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) (**Figura 1**). El IP_3 es una pequeña molécula soluble en agua, que se difunde a través del citoplasma y promueve la movilización del calcio intracelular al unirse y activar los canales de calcio activados por IP_3 situados en la membrana del retículo endoplásmico. El DAG se mantiene anclado a la membrana plasmática y estimula la activación de varias enzimas y proteínas estructurales, como la proteína quinasa C (PKC) (Vines, 2012; Kadamur y Ross, 2013). La actividad de la PLC es de crucial importancia para el control de la fisiología celular ya que puede regular la proliferación, la diferenciación, la división, el crecimiento, la transducción sensorial, la activación, la secreción, la motilidad, y la expresión génica celular (Fukami y cols., 2010; Vines, 2012).

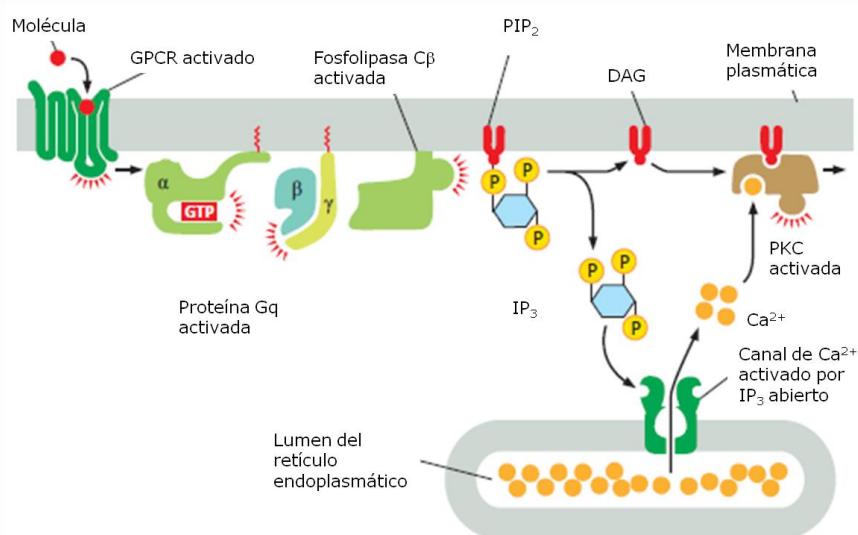


Figura 1: Hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) por la fosfolipasa $\text{C}\beta$. A partir de la escisión del PIP_2 se generan dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), que se difunde a través del citosol y libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico, y el diacilglicerol (DAG), que permanece en la membrana y estimula la activación de la proteína quinasa C (PKC). Figura tomada y modificada de Alberts y cols., 2014.

1.1 Estructura de las PLCs

La primera evidencia de actividad de la PLC fue sugerida por Hokin y Hokin en 1953, donde demostraron que la estimulación colinérgica aumentaba los niveles de fosfolípidos en células pancreáticas. Posteriormente, en 1975, Michell y Allan consiguieron escindir fosfatidilinosoles mediante preparaciones de PLC obtenida de *Bacillus cereus*. En 1981, Takenawa y Nagai purificaron por primera vez la PLC en hígado de rata, con un peso molecular de 68 kDa. Y dos años más tarde, en 1983, Streb y cols. demostraron en células acinares pancreáticas que el IP_3 generado por la hidrólisis del PIP_2 era responsable de la movilización del calcio intracelular. Este hallazgo proporcionó una nueva visión de la función que ejerce la PLC en los organismos vivos. Hasta la actualidad se han identificado trece isoenzimas PLC en diferentes tejidos de mamíferos, con masas moleculares comprendidas entre 85 y 150 kDa, y en base a su estructura y mecanismos de activación se han clasificado en seis familias: $PLC\beta_{(1-4)}$, $PLC\gamma_{(1,2)}$, $PLC\delta_{(1,3,4)}$, $PLC\epsilon$, $PLC\zeta$ y $PLC\eta_{(1,2)}$ (Fukami y cols., 2010) (**Figura 2**). Estas isoenzimas PLC pueden localizarse en el citoplasma, asociadas a la membrana plasmática, así como dentro del núcleo (Ratti y cols., 2017).

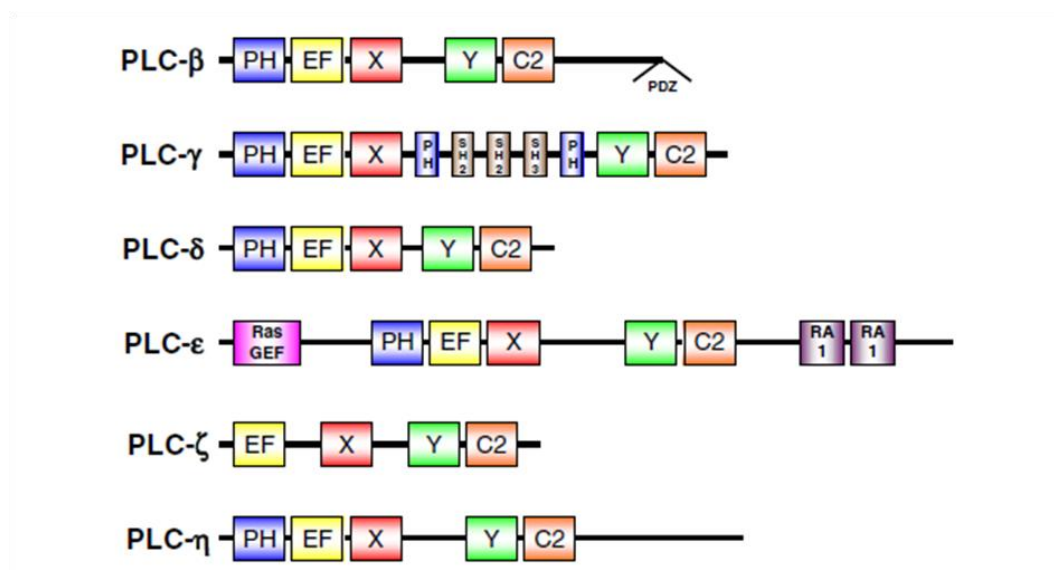


Figura 2: Clasificación y estructura de dominios de PLCs en mamíferos.

Todas las isoenzimas PLC contienen los dominios catalíticos X e Y, así como dominios de regulación: un dominio de homología a Pleckstrina (PH), dominio mano EF y un dominio C2. Algunas de ellas tienen secuencias de anclaje PDZ, dominios de homología a src (SH), dominio parecido al factor intercambiador de nucleótido de guanina-Ras (Ras-GEF) y dominios asociados a Ras (RA). Figura tomada de Fukami y cols., 2010.

Cada isoenzima PLC se compone de dominios específicos de cada familia y de dominios conservados. Aunque, en general, existe un nivel bajo de conservación de aminoácidos entre las diferentes familias PLC, la similitud entre los dominios bien

conservados es superior al 40-50% (Fukami y cols., 2010) (**Figura 3**). Todas las isoenzimas PLC contienen los dominios catalíticos X e Y, así como varios dominios para su regulación: un dominio de homología a *Pleckstrina* (PH), un dominio mano EF y un dominio C2. Por otro lado, cada subtipo PLC contiene dominios específicos que contribuyen a mecanismos reguladores específicos, entre los que se encuentran las secuencias de anclaje PDZ (*Post synaptic density protein-95*, *Drosophila disc large tumor suppressor-1*, and *Zonula occludens-1 protein*), dominios de homología a src (SH), dominios parecidos al factor intercambiador de nucleótidos de guanina para los miembros de la familia Ras (Ras-GEF) y dominios asociados a Ras (RA) (**Figura 2**) (Fukami y cols., 2010).

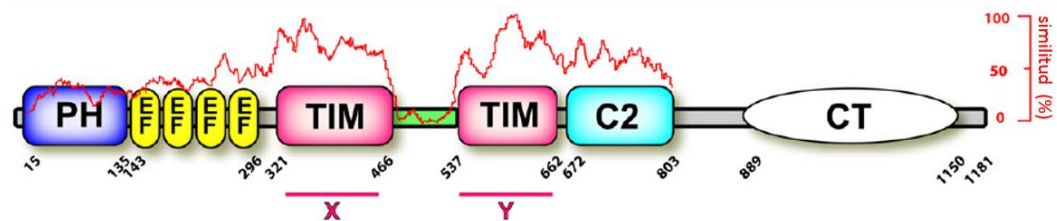


Figura 3: Representación de la conservación de los dominios compartidos por las PLCs humanas. La traza roja muestra el grado de similitud de los dominios entre los diferentes miembros de la familia PLC. Los dominios X e Y son los más conservados. La estructura base de la imagen corresponde a la isoenzima PLC β_2 humana. Figura tomada y modificada de Hicks y cols., 2008.

1.1.1 Dominios catalíticos X e Y

Los dominios catalíticos X e Y son dos regiones altamente conservadas en las isoenzimas PLC que están localizadas entre el dominio mano EF y el dominio C2. Conforman el sitio activo y el sitio de unión para el Ca²⁺, y consisten en un barril de 8 hélices α y 8 laminas β paralelas que se alternan, también denominado barril TIM (por corresponder a la estructura de la enzima triosa fosfato isomerasa) (Essen y cols., 1996) (**Figura 4**). El barril TIM está interrumpido por un inserto autoinhibitorio, que difiere entre las familias PLC en secuencia y tamaño, y es crucial para la regulación de la actividad. La presencia de este inserto llevó a la denominación de las mitades amino- y carboxilo-terminales (N-terminal y C-terminal, respectivamente) del barril TIM como dominios X e Y (Kadamur y Ross, 2013).

El dominio X contiene residuos catalíticos que participan de forma activa en la hidrólisis del PIP₂, actividad catalítica que aumenta a medida que la concentración de Ca²⁺ se incrementa (Vines, 2012). Mientras que el dominio Y, el cuál se encuentra en la segunda mitad del barril TIM, contiene los residuos de unión que intervienen en la unión del sustrato y regulan la preferencia de PLC hacia el PIP₂ (Wang y cols., 1996).

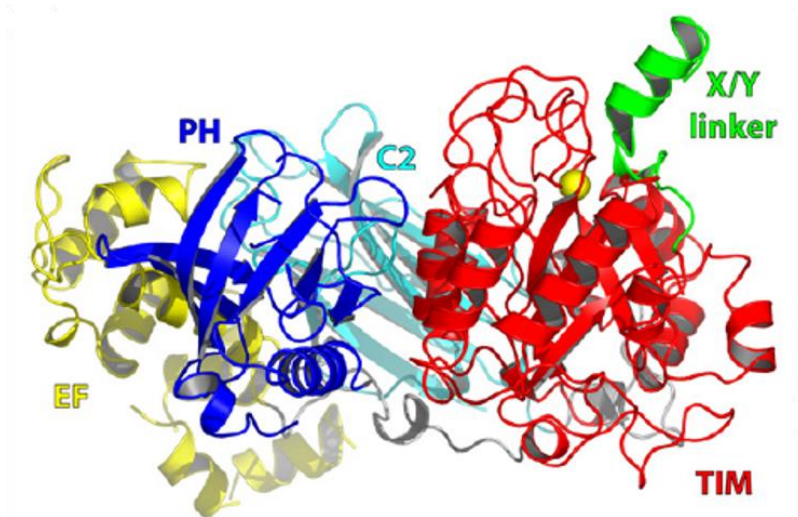


Figura 4: Diagrama de la estructura tridimensional de la isoenzima PLC β_2 . El dominio catalítico barril TIM (formado por los dominios X e Y) se muestra en color rojo, el inserto autoinhibitorio que entrelaza los dominios X e Y (X/Y linker) en color verde, el dominio PH en azul oscuro, el dominio mano EF en amarillo, y el dominio C2 en azul claro. También se muestra el cofactor Ca²⁺ como una esfera amarilla dentro del sitio activo. Figura tomada y modificada de Hicks y cols., 2008.

1.1.2 Dominio PH

Los dominios PH son elementos comunes de, aproximadamente, 120 aminoácidos que se encuentran en un gran número de proteínas de distintas familias implicadas en la señalización intracelular (Haslam y cols., 1993). A excepción de la PLC ζ , todos los miembros PLC tienen un dominio PH en el extremo N-terminal (Vines, 2012). Aunque generalmente los pliegues estructurales del dominio PH están bien conservados, este dominio ejerce diversas funciones en las diferentes familias PLC (Gresset y cols., 2012).

1.1.3 Dominio mano EF

La mano EF es un motivo estructural de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice que se encuentra en una gran familia de proteínas de unión a Ca²⁺ (Lewit-Bentley y Réty, 2000). El papel que ejerce el dominio mano EF en las familias PLC no está claro (Rhee, 2001). Este dominio suele unir iones de Ca²⁺ en otras proteínas, sin embargo, no hay pruebas sólidas que apoyen la idea de que en PLC los motivos de mano EF se unan a los iones metálicos (Suh y cols., 2008).

1.1.4 Dominio C2

El dominio C2 es una región de alrededor de 120 aminoácidos que forma sitios de unión para el Ca²⁺ y suele encontrarse en más de 40 proteínas diferentes (Essen y cols., 1996). En PLC β , este dominio contribuye a la unión de la isoenzima a la subunidad G α_q y a su activación por G α_q (Waldo y cols., 2010).

1.2 Clasificación de las PLCs en mamíferos

El gran número de funciones ejercidas por la PLC exige su estricta regulación y localización, además de una capacidad de respuesta apropiada a las múltiples señales extracelulares e intracelulares recibidas. Esta necesidad ha impulsado la evolución de seis familias de PLCs en mamíferos, cada una con una regulación diferente (Kadamur y Ross, 2013).

1.2.1 PLC β

La familia PLC β se describe en profundidad en el próximo punto 2. Fosfolipasa C β del apartado *Introducción*.

1.2.2 PLC γ

Hasta la actualidad se han identificado dos isoenzimas PLC γ en mamíferos, PLC γ_1 y PLC γ_2 . Mientras que la isoenzima PLC γ_1 se expresa en una gran variedad de tejidos, la expresión de PLC γ_2 se limita principalmente a células del sistema hematopoyético (Suh y cols., 2008). Las isoenzimas PLC γ se caracterizan estructuralmente por tener un segundo dominio PH dentro del inserto que une los dominios catalíticos X e Y. Este segundo dominio PH se divide en dos, flanqueando dos dominios de homología a src 2 (SH2) y un dominio de homología a src 3 (SH3) (Yang y cols., 2012) (**Figura 5**).

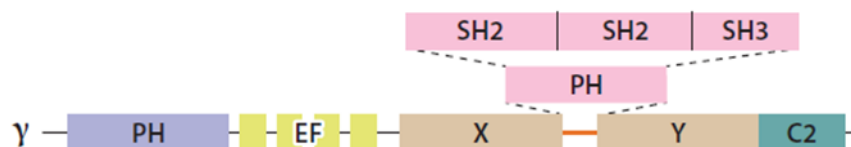


Figura 5: Estructura de la familia PLC γ . Figura tomada y modificada de Kadamur y Ross, 2013.

Las isoenzimas PLC γ se activan en respuesta a la unión de diversos factores de crecimiento a receptores tirosina quinasas, así como por la activación de tirosina quinasas citosólicas y varios receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores de citoquinas y receptores de células T (Fukami y cols., 2010; Yang y cols., 2012). La delección homocigótica de PLC γ_1 en un modelo de ratón reveló que esta isoenzima desempeña un papel esencial en el crecimiento y el desarrollo (Ji y cols., 1997).

1.2.3 PLC δ

Existen tres isoenzimas PLC δ identificadas en mamíferos, PLC δ_1 , PLC δ_3 y PLC δ_4 . Se demostró que la isoenzima bovina originalmente identificada como PLC δ_2 era un homólogo de la isoenzima PLC δ_4 humana y de ratón (Irinio y cols., 2004). La estructura de las isoenzimas PLC δ se conforma con los dominios conservados, no contiene

dominios específicos (**Figura 6**), y sus únicos ligandos reguladores identificados son el Ca^{2+} y el PIP_2 (Fukami y cols., 2010). Todas las células de los mamíferos expresan alguna isoenzima $\text{PLC}\delta$, y pueden localizarse en el citoplasma, en la membrana plasmática o en el núcleo (Gresset y cols., 2012).



Figura 6: Estructura de la familia $\text{PLC}\delta$. Figura tomada y modificada de Kadamur y Ross, 2013.

El dominio PH permite la unión de las isoenzimas $\text{PLC}\delta$ a PIP_2 , enlace que impulsa la asociación de la enzima con la membrana plasmática y promueve la hidrólisis del PIP_2 (Fukami y cols., 2010). Sin embargo, la unión a la membrana mediada por el fosfoinositol no es suficiente para activar las $\text{PLC}\delta$, se requiere de 3 a 4 iones de Ca^{2+} en el dominio C2, así como, de la unión del Ca^{2+} al sitio activo, para conseguir la actividad máxima de las enzimas. La disminución de los niveles de PIP_2 de la membrana plasmática promueve el desplazamiento de las $\text{PLC}\delta$ al citoplasma (Kadamur y Ross, 2013).

1.2.4 $\text{PLC}\epsilon$

Los miembros de la familia $\text{PLC}\epsilon$ son las mayores isoenzimas PLC clonadas hasta la fecha, con un peso molecular de alrededor de 250 kDa. El análisis del ARNm de $\text{PLC}\epsilon$ de diversos tejidos y órganos sugiere una distribución relativamente amplia, expresándose principalmente en el corazón, el hígado y el pulmón (Vines, 2012). Estructuralmente, además de los dominios bien conservados, las isoenzimas $\text{PLC}\epsilon$ contienen un dominio Ras-GEF, también denominado dominio CDC25, y dos dominios RA (Dusaban y Brown, 2015) (**Figura 7**).



Figura 7: Estructura de la familia $\text{PLC}\epsilon$. Figura tomada y modificada de Kadamur y Ross, 2013.

Los dominios RA consisten en aproximadamente 100 aminoácidos que interactúan directamente con las guanosina trifosfatasa (GTPasas) Ras y Rho. Mientras que el dominio Ras-GEF es capaz de funcionar como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para Rap1 (*Ras-related protein 1*), una GTPasa de bajo peso molecular (Vines, 2012). De manera que las isoenzimas $\text{PLC}\epsilon$, además de su capacidad para hidrolizar PIP_2 , pueden activar pequeñas proteínas G como Ras y Rap. Los miembros de esta familia pueden ser regulados por GPCRs acoplados a $G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{12}$

y $G\alpha_i$, por las subunidades $G\beta\gamma$ y varios receptores tirosina quinasa, así como por las moléculas de señalización Ras, Rap y Rho (Kadamur y Ross, 2013).

1.2.5 PLC ζ

Hasta la actualidad, la isoenzima PLC ζ únicamente se ha determinado en espermatozoides de mamíferos, donde provoca picos citoplasmáticos de Ca^{2+} necesarios para activar los ovocitos durante la fecundación (Saunders y cols., 2002; Fujimoto y cols., 2004). La isoenzima PLC ζ es el miembro de la familia PLC más pequeño y el único que carece del dominio PH (Nomikos y cols., 2015) (**Figura 8**). Sin embargo, comparte una homología del 33% con la isoenzima PLC δ_1 (Saunders y cols., 2002).



Figura 8: Estructura de la familia PLC ζ . Figura tomada y modificada de Kadamur y Ross, 2013.

Su único ligando regulador conocido es el Ca^{2+} . La isoenzima PLC ζ es sensible a bajas concentraciones de Ca^{2+} , de manera que las concentraciones basales celulares pueden ser suficientes para activar la isoenzima (Fukami y cols., 2010).

1.2.6 PLC η

Las isoenzimas PLC identificadas más recientemente son las pertenecientes a la familia PLC η , que incluye dos isoenzimas en mamíferos: la PLC η_1 y PLC η_2 (Hwang y cols., 2005; Nakahara y cols., 2005). Ambas isoenzimas se expresan en regiones neuronales del cerebro, lo que sugiere que podrían participar en el desarrollo neuronal (Nakahara y cols., 2005). Estructuralmente, son similares a la familia PLC δ , con la adición de un extremo C-terminal tras el dominio C2 que incluye una secuencia de anclaje PDZ (Zhou y cols., 2005) (**Figura 9**).



Figura 9: Estructura de la familia PLC η . Figura tomada y modificada de Kadamur y Ross, 2013.

Las isoenzimas PLC η son activadas por la movilización intracelular del Ca^{2+} y son sensibles a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} . De modo que las isoenzimas PLC η participan en un bucle de retroalimentación positiva para el Ca^{2+} , son activadas por el ión metálico y, a su vez, modulan su liberación a través de la producción del segundo mensajero IP_3 (Popovics y cols., 2014). Asimismo, esta isoenzima también puede ser regulada por GPCRs (Zhou y cols., 2005).

2. Fosfolipasa C β

A día de hoy se han identificado cuatro isoenzimas PLC β en mamíferos, PLC β_1 , PLC β_2 , PLC β_3 y PLC β_4 , además de varias variantes transcripcionales (Suh y cols., 2008) (**Figura 10**).

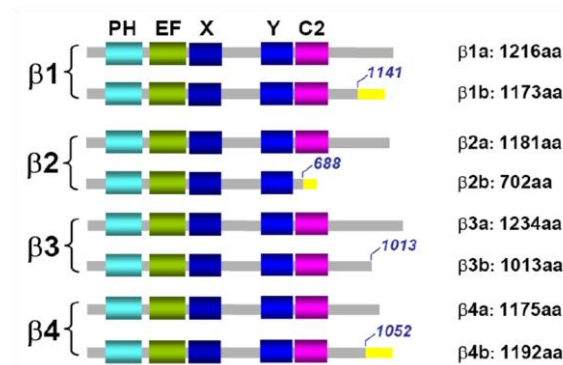


Figura 10: Representación esquemática de variantes transcripcionales de PLC β en ratón. El diagrama muestra el dominio PH, el dominio mano EF, los dominios X e Y, y el dominio C2 de las isoenzimas PLC β . Las posiciones de inserción de aminoácidos adicionales en las variantes transcripcionales están indicadas en color azul, y las regiones de corte y empalme alternativo en amarillo. El número de aminoácidos (aa) de cada variante está escrito al lado del diagrama. Figura tomada y modificada de Suh y cols., 2008.

2.1 Estructura de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$

Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ comparten muchas de las características presentes en los demás miembros de la familia PLC, contienen un dominio PH, cuatro manos EF, los dominios X e Y, y un dominio C2 (Lyon y Tesmer, 2013) (**Figura 11**). No obstante, con la excepción de los dominios X e Y, los demás dominios de la familia PLC β tienen funciones no convencionales (Lyon y Tesmer, 2013). El dominio PH de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ contribuye débilmente a la asociación de la enzima a la membrana, mientras que tiene un papel significativo en la regulación de la interacción de la enzima con las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G (Wang y cols., 2000). Las manos EF de PLC β no conservan los aminoácidos necesarios para la unión del Ca $^{2+}$ y no sirven para unir el ión metálico (Gresset y cols., 2012), sin embargo, se ha demostrado que interactúan con la subunidad $G\alpha_q$ y promueven su actividad GTPasa (Waldo y cols., 2010). Finalmente, a diferencia de otros, el dominio C2 de PLC β no participa en la unión de la isoenzima con la membrana mediada por Ca $^{2+}$, sino que contribuye a su interacción con la subunidad $G\alpha_q$ (Wang y cols., 1999).



Figura 11: Estructura de la familia PLCβ. Figura tomada y modificada de Kadamur y Ross, 2013.

Pero principalmente, las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ se diferencian de las demás PLC por la presencia de un alargamiento de 450 aminoácidos en el extremo C-terminal (extremo CT) (**Figura 11**), cuya función está relacionada con la interacción de la isoenzima con la proteína G $_q$, la unión a la membrana y la localización nuclear (Adjobo-Hermans y cols., 2013; Lyon y Tesmer, 2013). Los extremos CT de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ no muestran una gran homogeneidad, y son las regiones principales donde se producen cortes y empalmes de aminoácidos que dan lugar a nuevas variantes transcripcionales de las isoenzimas (**Figura 12**).

Isoenzima	Humano		Rata		Ratón	
	Variante	aa	Variante	aa	Variante	aa
PLC β_1	PLC β_{1a}	1216	<i>PLCβ_1</i>	1216	PLC $\beta_{1.1}$	1216
	PLC β_{1b}	1173			PLC $\beta_{1.2}$	1173
PLC β_2	PLC $\beta_{2.1}$	1185	<i>PLCβ_2</i>	1183	PLC β_{2a}	1181
	PLC $\beta_{2.2}$	1181			PLC β_{2b}	1158
	PLC $\beta_{2.3}$	1170				
PLC β_3	PLC $\beta_{3.1}$	1234	<i>PLCβ_3</i>	1236	PLC β_{3a}	1234
	PLC $\beta_{3.2}$	1167			PLC β_{3b}	1234
PLC β_4	PLC β_{4a}	1194	<i>PLCβ_4</i>	1176	<i>PLCβ_4</i>	1175
	PLC β_{4b}	1175				
	PLC β_{4c}	1187				

Figura 12: Resumen de las variantes transcripcionales de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y su longitud en diferentes especies. La tabla muestra las variantes transcripcionales de PLC $\beta_{(1-4)}$ y el número de aminoácidos (aa) recogidos en NCBI Gene Database. Las secuencias provisionales se muestran en cursiva.

2.2 Expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y sus variantes transcripcionales

Las cuatro isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ descritas en mamíferos presentan diferentes patrones de expresión.

La isoenzima PLC β_1 se expresa extensamente en diversos tejidos aunque alcanza niveles superiores en la corteza cerebral y en el hipocampo, donde la enzima regula la actividad neuronal (Kim y cols., 1997; Böhm y cols., 2002), y en el sistema cardiovascular (Arthur y cols., 2001; Woodcock y cols., 2009). Bahk y cols. (1994)

describieron dos variantes transcripcionales de PLC β_1 en cerebro de rata, la isoenzima PLC β_{1a} y PLC β_{1b} . Ambas variantes se diferencian en que los últimos 75 aa del extremo CT de la isoenzima PLC β_{1a} se intercambian por 32 residuos únicos en la isoenzima PLC β_{1b} (**Figura 13**). Si bien esta diferencia representa una pequeña parte de la secuencia total de la enzima, supone una gran diferencia a nivel funcional. El extremo CT de la isoenzima PLC β_{1a} contiene una secuencia de anclaje PDZ que contribuye en la localización y en la actividad de la enzima; el extremo CT de la isoenzima PLC β_{1b} , en cambio, contiene una secuencia rica en prolina que permite a la enzima interactuar con dominios SH3 o dominios WW (Grubb y cols., 2008). En cardiomiocitos de rata neonata esta diferencia estructural implica diferencias en la interacción, localización y actividad de las diferentes variantes PLC β_1 . Si bien la isoenzima PLC β_{1a} se localiza en el citoplasma, la isoenzima PLC β_{1b} se localiza en la membrana plasmática y es la única variante en responder a la activación de subunidad G α_q (Grubb y cols., 2008), implicando a esta variante en la respuesta hipertrófica provocada por la activación de los receptores adrenérgicos α_1 en cardiomiocitos (Filtz y cols., 2009).

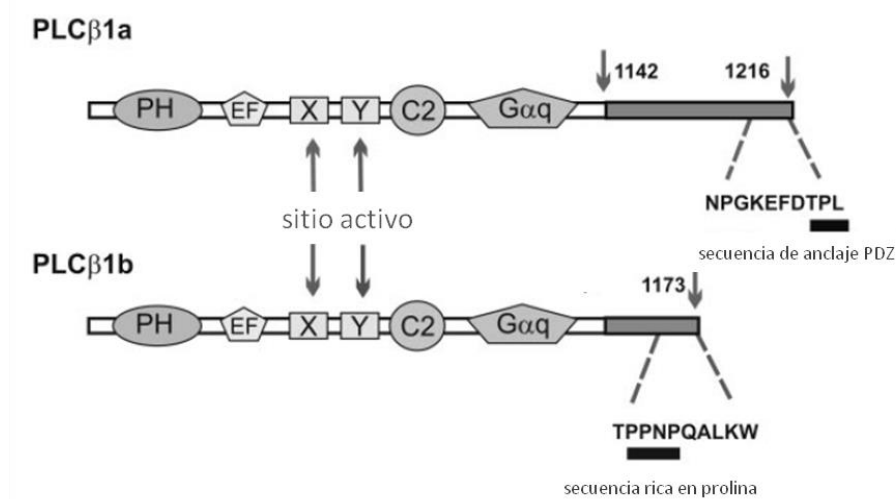


Figura 13: Variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β_1 . La imagen muestra las diferentes secuencias de los extremos CT de las dos variantes, que contienen la secuencia de anclaje PDZ en la isoenzima PLC β_{1a} , y la secuencia rica en prolina en la isoenzima PLC β_{1b} . Figura tomada y modificada de Grubb y cols., 2008

La isoenzima PLC β_2 se expresa mayoritariamente en células de origen hematopoyético, y desempeña un papel importante en la señalización leucocitaria y en los mecanismos inmunitarios (Kawakami y Xiao, 2013). Mao y cols. (2000) describieron dos variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β_2 en células hematopoyéticas humanas, las variantes PLC β_{2a} y PLC β_{2b} . La isoenzima PLC β_{2b} contiene 15 aa menos que la variante PLC β_{2a} en su extremo CT, entre las cuales se encuentran dos argininas (R) y una lisina (K) (**Figura 14**). Esta diferencia de secuencias se produce muy cerca del dominio que participa en la activación de las

isoenzimas a través de la subunidad $G\alpha_q$ y en su asociación a la membrana celular. De modo que las variantes de $PLC\beta_2$ podrían ser reguladas de manera diferente en cuanto a su activación por $G\alpha_q$ y su localización celular (Mao y cols., 2000). Sin embargo, Sun y cols. (2007) demostraron que ambas isoenzimas $PLC\beta_2$ son activadas por la subunidad $G\alpha_q$ y que se localizan tanto en la membrana plasmática, en el citoplasma, como en el núcleo; concluyendo que esta diferencia estructural no parece afectar a la asociación del extremo CT de las isoenzimas $PLC\beta_2$ a la proteína $G\alpha_q$ y a la membrana celular.

```

      850          863          879          893
PLC-β2a --QVNGALAPTSNGSPAARAGAREEAMKEAAEPRTASLEELRELKG--
PLC-β2b --QVNGALAPTSNGSP-----EPRTASLEELRELKG--

```

Figura 14: Comparación de parte de la secuencia de aminoácidos (aa) del extremo CT de las variantes transcripcionales de la isoenzima $PLC\beta_2$. La línea superior muestra la secuencia de aa de la variante $PLC\beta_{2a}$ (desde el residuo 849 hasta el 894). La línea inferior muestra la delección de 15 aa de la variante $PLC\beta_{2b}$. Figura tomada de Mao y cols., 2000.

La isoenzima $PLC\beta_3$ es ubiquitaria (Rebecchi y Pentylala, 2000), aunque se expresa mayoritariamente en cerebro, hígado, glándula parótida, células hematopoyéticas y en el sistema cardiovascular (Jhon y cols., 1993; Li y cols., 2000; Arthur y cols., 2001).

La isoenzima $PLC\beta_4$ se aisló inicialmente en retina y cerebelo (Lee y cols., 1993; Min y cols., 1993), sin embargo, el análisis de marcadores de secuencias expresadas (EST, acrónimo del inglés *expressed sequence tags*) sugiere una distribución en los tejidos del organismo mucho más amplia (Suh y cols., 2008). Se han identificado varias variantes transcripcionales de la isoenzima $PLC\beta_4$. La isoenzima $PLC\beta_{4b}$ de rata descrita por Kim y cols. (1998) contiene una estructura idéntica a la $PLC\beta_{4a}$ (Lee y cols., 1993) a excepción de 162 aa de la región CT reemplazados por 10 aa (**Figura 15**). Sin embargo, a diferencia de la isoenzima $PLC\beta_{4a}$, que se localiza en la membrana plasmática y es activada por la subunidad $G\alpha_q$, la variante $PLC\beta_{4b}$ se encuentra en el citoplasma y no es activada por la $G\alpha_q$ (Kim y cols., 1998). En cuanto a la isoenzima $PLC\beta_{4c}$ de rata identificada por Adamski y cols. (1999), contiene un extremo CT extendido como el de la isoenzima $PLC\beta_{4a}$ pero diferente por la sustitución de 22 aa por otros 41 aa. De manera que la longitud y la disposición de los aa del extremo CT de la isoenzima $PLC\beta_4$ son determinantes para su localización y activación.

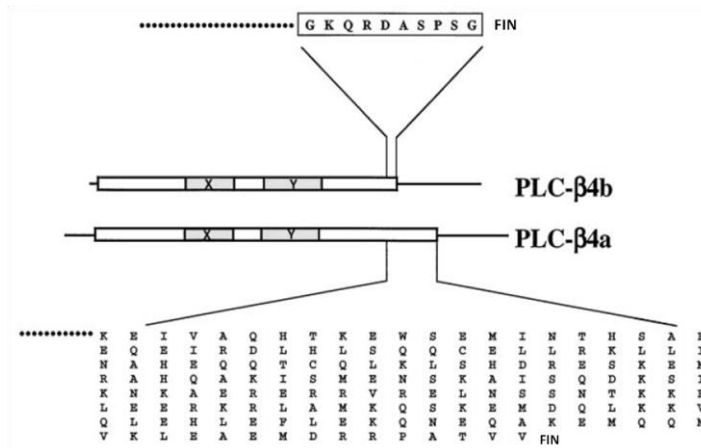


Figura 15: Dos de las variantes transcripcionales de la isoenzima PLCβ₄. La imagen muestra las diferentes secuencias de los extremos CT de las variantes PLCβ_{4a} y PLCβ_{4b} en rata. Figura tomada y modificada de Kim y cols., 1998.

2.3 Activación de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎

Las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ son las principales proteínas efectoras de la familia G_{q/11} de las proteínas heterotriméricas G. La activación de la vía proteína G_{q/11}-PLCβ se inicia cuando la adrenalina, noradrenalina (NA), endotelina-1 (ET-1) y angiotensina II (AT II), entre otros, se unen a sus receptores específicos (receptores adrenérgicos α₁, receptores ET_A y ET_B para ET-1, y receptores AT₁ para la AT II) e inducen un cambio conformacional de los receptores que provoca la activación de la proteína heterotrimérica G_{q/11} a la cual se acoplan y desencadena la activación de la proteína efectora PLCβ (Golebiewska y Scarlata, 2010) (**Figura 16**).

Las proteínas heterotriméricas que se unen a guanósín trifosfato (GTP), conocidas como proteínas G, están constituidas por una subunidad α (Gα), la cual contiene un sitio de unión para nucleótidos de guanina, y las subunidades β y γ, que forman un dímero no dissociable (Gβγ) (Hepler y Gilman, 1992). Cuando la proteína G se activa, provoca el intercambio de GDP (guanósín difosfato) por GTP en la subunidad Gα, disminuye su afinidad por el dímero Gβγ e induce un cambio conformacional que permite la disociación de las subunidades Gα y Gβγ, estimulando la activación de varios efectores (Molkentin y Dorn II, 2001). La actividad GTPasa intrínseca que tiene la subunidad Gα permite la hidrólisis de GTP en GDP, lo cual promueve la re-asociación de la subunidades, y de ese modo finalizar la activación del efector (Golebiewska y Scarlata, 2010).

Las proteínas G se dividen en cuatro subfamilias: G_s, G_i, G_q, y G₁₂ (Simon y cols., 1991), nombre atribuido por la subunidad Gα que las componen (Gα_s, Gα_i, Gα_q y Gα₁₂), y cada familia se une a GPCRs y proteínas efectoras específicas, como la G_s a adenilato ciclasa y la G_q a PLCβ.

La familia G_q se compone de cuatro miembros, los cuales se diferencian por su subunidad $G\alpha$: $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{15/16}$ (Hubbard y Hepler, 2006). La proteína $G\alpha_{14}$ se encuentra en riñón, hígado y pulmón; y la proteína $G\alpha_{15/16}$ (ortólogo ratón/humano, respectivamente) sólo se expresa en células hematopoyéticas. Las proteínas $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$ son ubiquitarias y son las más estudiadas (Sánchez-Fernández y cols., 2014).

El dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G es un complejo fuertemente unido compuesto por una subunidad β y una subunidad γ . En mamíferos se han identificado 5 subunidades $\beta_{(1-5)}$ y 12 subunidades $\gamma_{(1-14)}$ (Wettschureck y Offermanns, 2005). Los diferentes subtipos de subunidades pueden emparejarse para formar combinaciones $G\beta_x\gamma_x$ únicas (Smrcka, 2008). Si bien inicialmente no se consideró importante, en la actualidad está demostrado que el complejo $\beta\gamma$ es un componente principal de la señalización mediada por GPCR (Clapham y Neer, 1997) y que regula la activación de una gran variedad de efectores como las PLCs (Smrcka, 2008).

Las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ son activadas por la subunidad $G\alpha_{q/11}$ de la proteína heterotrimérica G_q , por las subunidades $G\beta\gamma$ y el Ca^{2+} . Asimismo, la actividad de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ es regulada por pequeñas proteínas GTPasas de la subfamilia Rho, el ácido fosfatídico y la fosforilación catalizada por varias proteínas quinasas (Kadamur y Ross, 2013).

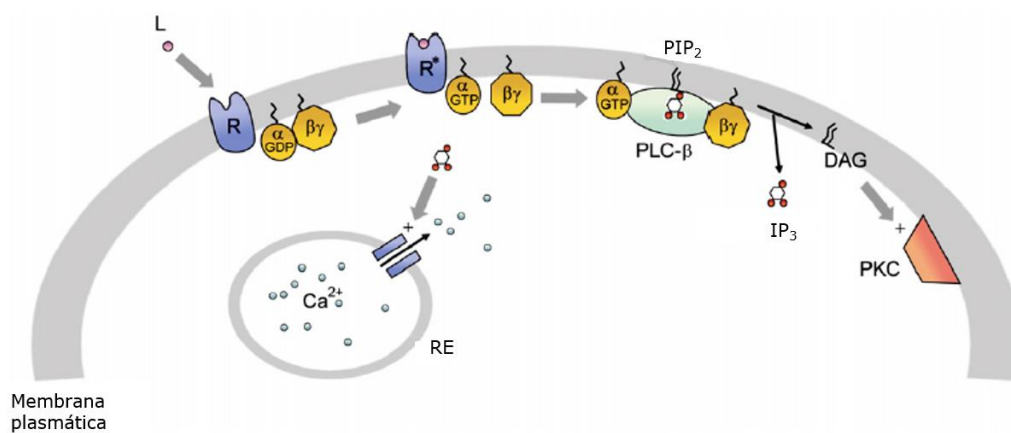


Figura 16: Vía de señalización proteínas G_q – $PLC\beta$. La imagen muestra la activación de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ a través de las subunidades $G\alpha_{q/11}$ y $G\beta\gamma$ de proteínas heterotriméricas G. Cuando el receptor es activado (R^*) por un ligando (L) activa la proteína G provocando el intercambio de guanósín difosfato (GDP) por guanósín trifosfato (GTP) e induce la disociación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, estimulando la activación de fosfolipasa Cβ ($PLC\beta$). Las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ hidrolizan el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) de la membrana y generan dos segundos mensajeros: el inositol(1,4,5)-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 se difunde lejos de la membrana plasmática y promueve la movilización del calcio intracelular al unirse y activar los canales de calcio activados por IP_3 situados en la membrana del retículo endoplásmico. El DAG se mantiene anclado a la membrana plasmática y estimula la activación la proteína quinasa C (PKC). Figura tomada y modificada de Drin y Scarlata, 2007.

Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ muestran diferentes afinidades para su activación tanto a través de la subunidad G $\alpha_{q/11}$ como de las subunidades G $\beta\gamma$ de la proteína heterotrimérica G.

El extremo CT es muy importante en la asociación de la isoenzima con la membrana celular así como en su unión y activación a través de la subunidad G $\alpha_{q/11}$ (Rhee, 2001). A pesar de que la estructura general de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ esté bien conservada, la alineación de secuencias de su extremo CT indica que ésta tiene una relativa baja homología entre isoenzimas en comparación con otros dominios (Kim y cols., 2011). De manera que cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ tiene diferentes afinidades de unión para la subunidad G $\alpha_{q/11}$. El monómero G $\alpha_{q/11}$ unido a GTP activa las cuatro isoformas según este orden: PLC β_1 , PLC β_4 > PLC β_3 > PLC β_2 (Smrcka y Sternweis, 1993; Lee y cols., 1994; Runnels y Scarlata, 1999). La isoenzima PLC β_4 también es activada por la subunidad G α_q (Jiang y cols., 1994), sin embargo, su actividad basal es inhibida de forma selectiva por ribonucleótidos (Lee y cols., 1994). Dicha inhibición requiere el conjunto de los grupos 5'-fosfato, 2'-hidróxilo en la ribosa, además de una base nitrogenada. Es, por tanto, inhibida por ribonucleótidos monofosfato, difosfato y trifosfato, y no, en cambio, por desoxiribonucleótidos, nucleósidos, ribosa-5-fosfato y nucleótidos cíclicos (adenosín monofosfato cíclico (AMP_c), guanosín monofosfato cíclico (GMP_c)) (Lee y cols., 1994). En ausencia de ribonucleótidos, la actividad específica de la isoenzima PLC β_4 hacia PIP₂ es cuatro a cinco veces la actividad media específica de la PLC β_1 y PLC β_3 (Lee y cols., 1994). Por lo que la inhibición dependiente de nucleótidos puede servir para reducir la actividad de la isoenzima PLC β_4 en ausencia de una señal neurohumoral (Lee y cols., 1994) y aumentarla en presencia una señal mediada por receptores como los receptores adrenérgicos β_1 o enzimas como la óxido nítrico sintasa que promuevan la generación de nucleótidos cíclicos.

La unión de las subunidades G $\beta\gamma$ con las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ se produce a través de varias regiones, aunque las determinantes residen en el dominio PH (Rebecchi y Pentylala, 2000). Con la excepción de la isoenzima PLC β_4 , las subunidades G $\beta\gamma$ también activan las isoenzimas PLC $\beta_{(1-3)}$, de manera que también pueden responder a receptores acoplados a proteínas G_i o G_o (Park y cols., 1993). La sensibilidad relativa de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-3)}$ al dímero $\beta\gamma$ difiere de la de la subunidad G $\alpha_{q/11}$, siguiendo el siguiente orden: PLC β_2 > PLC β_3 >> PLC β_1 (Runnels y Scarlata, 1999; Suh y cols., 2008).

La señalización mediada por la subunidad G $\alpha_{q/11}$ finaliza cuando la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad G α se acelera y causa la desactivación de la proteína G. Existen mecanismos de retroalimentación negativa dirigidos a la regulación de la actividad GTPásica de la subunidad G α_q . Un mecanismo es mediado directamente por las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$, que funcionan como proteínas activadoras GTPasa (GAP) (Berstein y cols., 1992); y un segundo mecanismo es a través de proteínas

reguladoras de la señalización de proteínas G (proteínas RGS), las cuales también actúan como proteínas GAP acelerando la actividad GTPásica de la subunidad $G\alpha_q$ (Zhong y Neubig, 2001). La regulación a nivel del efector, en cambio, está mediada por proteínas quinasas que fosforilan las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en respuesta al aumento de segundos mensajeros intracelulares. La fosforilación de las isoenzimas mediante la proteína quinasa A (PKA), PKC o quinasa dependiente de calcio-calmodulina II (CAMKII) inhibe la actividad o atenúa la estimulación de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-3)}$ provocada por las proteínas G (Kadamur y Ross, 2013). Por otro lado, el ácido fosfatídico modula la interacción entre las proteínas heterotriméricas G y la isoenzima $PLC\beta_1$ promoviendo la activación de la isoenzima. De manera que el ácido fosfatídico tiene el potencial de regular la extensión de la retroalimentación negativa mediada por proteínas RGS y proteína quinasas (Litosch, 2002).

Sin embargo, las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ no solo son activadas por GPCRs, también responden a otras señales. Por una parte, las cuatro isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ son estimuladas por el Ca^{2+} en un rango fisiológico, cuando el ión metálico se encuentra en el sitio activo la estimulación de las isoenzimas se amplifica de 5 a 10 veces (Kadamur y Ross, 2013). Por otra, varias isoenzimas $PLC\beta_{(1-3)}$ son estimuladas por pequeñas proteínas GTPasas de la subfamilia Rho, siendo la isoenzima $PLC\beta_2$ la más sensible a la estimulación mediante estas proteínas (Illenberger y cols., 2003).

Asimismo, es posible que la formación de un complejo de señalización entre los receptores y las proteínas de andamiaje aporte una función específica a cada isoenzima $PLC\beta_{(1-4)}$ (Choi y cols., 2010). Un gran número de evidencias sugieren que las proteínas con dominios PDZ, a través de interacciones específicas entre proteínas, juegan una función fundamental en la activación de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ mediada por GPCRs (Kim y cols., 2011). Los dominios PDZ, originariamente, se consideraban dominios de 80-90 aminoácidos sin función conocida que se encontraban en proteínas estructuralmente relacionadas, actualmente, se sabe que reconocen pequeñas secuencias de aminoácidos situados en el extremo CT de multitud de proteínas denominadas secuencias de anclaje PDZ. Cada isoenzima $PLC\beta_{(1-4)}$ contiene una secuencia de anclaje PDZ diferente en su extremo CT, lo que hace pensar que su interacción con diferentes proteínas con dominios PDZ podría involucrarlas en diferentes vías de señalización mediadas por GPCRs (Kim y cols., 2011).

3. Hipertrofia cardíaca

3.1 El corazón

El corazón es el órgano principal del sistema cardiovascular, y cumple dos funciones principales: 1) bombear sangre saturada en oxígeno a la circulación sistémica y satisfacer las necesidades de oxígeno del organismo; 2) enviar sangre

enriquecida en carbono dióxido (CO₂) a los pulmones, donde se produce la difusión del CO₂ a los alvéolos para ser expulsado en el proceso respiratorio (Iaizzo, 2009).

El corazón es un órgano de forma cónica con cuatro cámaras compuestas de músculo cardíaco o miocardio: dos aurículas y dos ventrículos. Las aurículas son las cámaras superiores que sirven para recibir la sangre recolectada por las venas; los ventrículos son las cámaras inferiores y tienen un mayor engrosamiento muscular que les permite ejercer la fuerza necesaria para bombear la sangre fuera del corazón a través de las arterias. El corazón presenta bilateralidad, la aurícula y el ventrículo de la derecha se encargan de recoger la sangre de la circulación sistémica y bombearla a los pulmones, mientras que la aurícula y el ventrículo de la izquierda de recoger la sangre de los pulmones y bombearla a la circulación sistémica. La aurícula y el ventrículo de cada lado están comunicados por las válvulas tricúspide y mitral que permiten el paso unidireccional de la sangre (**Figura 17**).

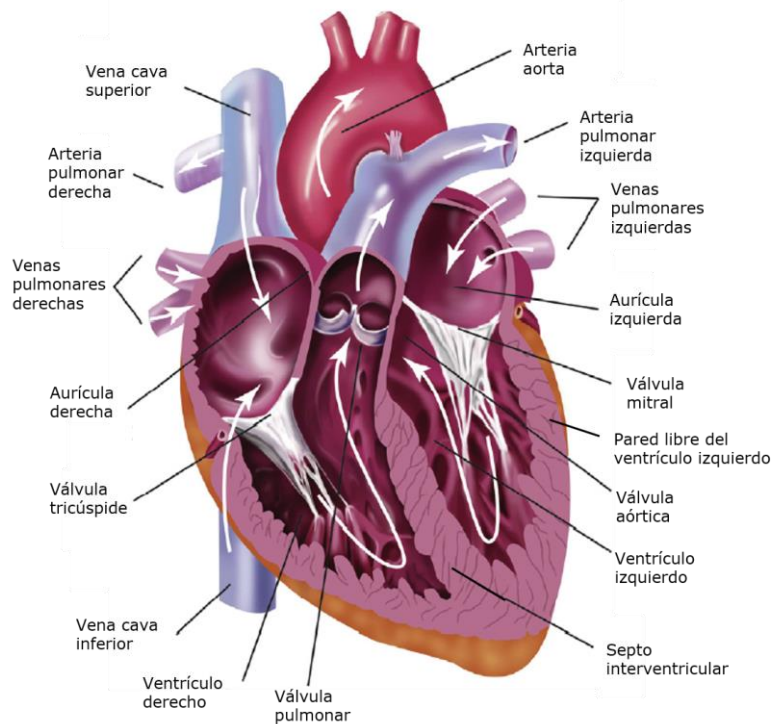


Figura 17: Anatomía del corazón humano. La función de las aurículas es recoger la sangre, mientras que la función de los ventrículos es bombearla. El lado derecho del corazón está involucrado en la circulación pulmonar, mientras que el lado izquierdo en la circulación sistémica. El flujo de sangre del corazón es unidireccional gracias a las válvulas. Figura tomada y modificada de Al-Shura, 2014.

Las venas cava superior e inferior recolectan la sangre venosa desde las partes superiores e inferiores del cuerpo hasta la aurícula derecha. La sangre pasa a través de la válvula tricúspide al ventrículo derecho (VD), desde donde es bombeada a los pulmones por medio de las arterias pulmonares izquierda y derecha. Una vez la sangre

se oxigena en los pulmones, regresa al corazón a través de las cuatro venas pulmonares para desembocar en la aurícula izquierda. El ventrículo izquierdo (VI) recibe la sangre de la aurícula izquierda a través de la válvula mitral, y la bombea por la válvula aórtica hacia la arteria aorta con suficiente fuerza de contracción para que llegue a todos los tejidos del cuerpo.

La circulación de la sangre a través de las cámaras cardíacas es posible gracias a la existencia de movimientos rítmicos y automáticos de contracción y relajación, llamados sístole y diástole. Al inicio de la diástole (protodiástole) las aurículas se llenan de sangre y el aumento de presión intraauricular abre las válvulas tricúspide y mitral para que la sangre pase a los ventrículos. En cuanto la presión intraventricular aumenta, las aurículas se contraen para completar el llenado ventricular (telediástole). Al inicio de la sístole ventricular, la presión que ejerce la sangre en los ventrículos cierra las válvulas auriculoventriculares y abre la válvula pulmonar y la aórtica, de manera que la sangre sale hacia sus respectivas arterias. Al finalizar la sístole, la presión en el interior de los ventrículos alcanza valores menores a las presiones presentadas en las arterias pulmonares y aórtica, cerrando las válvulas sigmoideas (pulmonar y aórtica) y dando inicio a un nuevo ciclo cardíaco (Oto y cols., 2001).

El VI es considerado la cámara principal del corazón, y a diferencia del VD, su pared es entre 5-8 mm más gruesa para impulsar la sangre con la fuerza suficiente hacia la mayor parte del cuerpo (von Domarus y cols., 1988). Los ventrículos están separados entre sí por el septo interventricular (SI), y la pared exterior se denomina pared libre del ventrículo izquierdo (PL).

El metabolismo del músculo cardíaco es fundamentalmente aerobio, de manera que el corazón necesita sangre oxigenada para cumplir con su función y mantener sus estructuras (Martín Jadraque, 1988). La fuente principal de irrigación sanguínea del miocardio es la circulación coronaria. Las arterias coronarias, izquierda y derecha, nacen de sus respectivos senos aórticos, justo por encima de la válvula aórtica, y se ramifican en arterias más pequeñas que suministran sangre oxigenada a todo el músculo cardíaco. La sangre, tras pasar por una abundante red de capilares, es recogida por vénulas. Estas vénulas desembocan en venas coronarias que se unen para formar un gran vaso denominado seno coronario (SC), que lleva la sangre a la aurícula derecha (Iaizzo, 2009).

El corazón es un órgano complejo que está compuesto por varios tipos celulares: cardiomiocitos, células endoteliales, fibroblastos, células de músculo liso vascular y células del sistema inmune como leucocitos, mastocitos o pericitos (Sheridan, 1984; Pinto y cols., 2016).

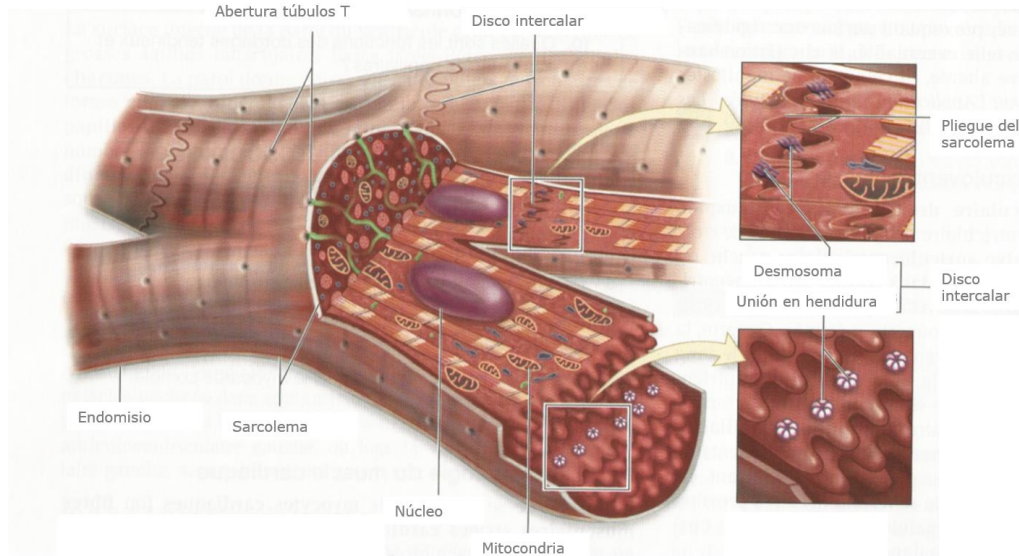


Figura 18: Estructura del cardiomiocito. Figura tomada y modificada de McKinley y cols., 2014.

Los cardiomiocitos representan aproximadamente el 25-35% de todas las células de corazón (Pinto y cols., 2016) y el 70-80% de la masa cardíaca total (Bernardo y cols., 2010). Son células musculares estriadas y diferenciadas que se encargan de los movimientos de contracción y distensión del corazón (Nadal-Ginard y cols., 2003). Son fibras musculares grandes, en torno a 50-100 μm de longitud y 10-18 μm de diámetro que contienen uno o dos núcleos y se conectan entre sí gracias a la red de tejido conectivo denominada endomisio (Olivetti y cols., 1996) (**Figura 18**). La membrana plasmática de las células musculares, también denominada sarcolema, forma túbulos T y contiene canales iónicos y receptores. Los cardiomiocitos se unen entre sí gracias a los pliegues del sarcolema. El incremento de la superficie de contacto permite una fuerte interconexión entre las células, aumentando la estabilidad estructural del músculo cardíaco y facilitando la comunicación entre las células. La unión de dos fibras musculares se caracteriza por una estructura particular: el disco intercalar. El disco intercalar está constituido por dos elementos, los desmosomas y las uniones en hendidura (uniones Gap). Otro elemento importante es el retículo endoplasmático, o retículo sarcoplásmico, que interviene en la regulación de la contracción muscular debido a que es reservorio del Ca^{2+} intracelular. La mayor parte del volumen intracelular de los cardiomiocitos lo ocupan las proteínas contráctiles o miofibrillas, numerosas proteínas que se posicionan de manera paralela entre ellas a lo largo de toda la célula. Cada miofibrilla está formada por una sucesión de unidades estructurales repetitivas denominadas sarcómeros. Los sarcómeros son las estructuras causantes del acortamiento celular que acaba produciendo la contracción coordinada del órgano completo, y se trata de entramados de proteínas (principalmente actina, troponina y miosina) que en los tejidos musculares permite la contracción de la célula. El funcionamiento del miocardio requiere mucha energía y para satisfacer la demanda

continua de oxígeno y nutrientes las fibras musculares contienen una gran cantidad de mitocondrias y se rodean de vasos sanguíneos (Iaizzo, 2009; McKinley y cols, 2014).

El corazón tiene una importancia primordial en el mantenimiento de la vida, siendo las enfermedades cardiovasculares la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2015). Por ello, en las últimas décadas, las enfermedades cardiovasculares han sido amplio objeto de estudio, tanto desde el punto de vista clínico como molecular.

3.2 Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico en el que anomalías de la estructura o de la función del corazón originan su incapacidad para bombear adecuadamente la sangre en respuesta a las necesidades de los tejidos del organismo o bien lo consigue a expensas de una elevación anormal de sus presiones de llenado (Harrison y Braunwald, 2005).

La IC es hoy en día un importante problema de salud debido a que su incidencia y prevalencia van en ascenso a causa del aumento progresivo de la edad de la población (Farré y cols., 2017). La prevalencia de IC en la población española por encima de los 45 años es de un 6,8%, y se eleva hasta el 16% cuando se considera la población de más de 75 años (Anguita y cols., 2008). Asimismo, la IC es la segunda causa de ingreso hospitalario en España y la primera de pacientes mayores de 65 años (Miró y cols., 2009). Todo ello condiciona una necesidad cada vez mayor de atención sanitaria y un elevado consumo de recursos sanitarios para su tratamiento, con el consiguiente aumento del coste económico. Es por tanto imprescindible ahondar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la fisiopatología de este síndrome clínico.

La etiología de la IC es diversa e incluye, entre otras, las miocardiopatías y las cardiopatías isquémica, valvular, hipertensiva, y congénita (Harrison y Braunwald, 2005).

La IC representa el punto final de un proceso que ha estado en continua evolución desde el deterioro de la función de la bomba del corazón, ya sea por la anomalía en la contracción, o en la relajación, o en ambas. Dicha evolución se desarrolla a través de un proceso de hipertrofia cardíaca y cambios adaptativos que intentan mantener la tensión arterial y la perfusión periférica, y que posteriormente

conlleva al deterioro progresivo de la función cardíaca hasta la fase terminal (Vélez y cols., 2002).

3.3 Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca es un mecanismo de adaptación encaminado a reducir la tensión de la pared (Ley de Laplace) y que se desarrolla como respuesta a una variedad de estímulos biomecánicos (Maillet y cols., 2013). Macroscópicamente se define como un incremento del grosor de la pared y/o el septo interventricular (Carreño y cols., 2006); mientras que a nivel celular, se caracteriza por un incremento del tamaño del cardiomiocito, con aumento de la síntesis proteica y un cambio en la organización de la estructura sarcomérica (Frey y cols., 2004).

El corazón es capaz de inducir el crecimiento de los cardiomiocitos en respuesta a una gran variedad de estímulos, y la hipertrofia cardíaca puede clasificarse en dos tipos: hipertrofia fisiológica e hipertrofia patológica. La hipertrofia fisiológica ocurre como una adaptación a una situación en la que el cuerpo necesita más aporte de sangre en su actividad diaria, como es el caso del crecimiento postnatal, el de los deportistas o el de mujeres embarazadas, y no está asociada a daño cardíaco. La hipertrofia patológica, en cambio, ocurre en respuesta a la sobrecarga de presión o de volumen en un contexto de condiciones patológicas, como por ejemplo, durante el infarto de miocardio, las estenosis valvulares, la hipertensión o las cardiomiopatías (Bernardo y cols., 2010; Maillet y cols., 2013).

Tanto la hipertrofia cardíaca fisiológica como la patológica están asociadas al incremento del tamaño del corazón, sin embargo, se diferencian no sólo en sus causas, sino en sus características morfológicas y funcionales, así como en las rutas de señalización intracelular que están implicadas en su desarrollo.

La hipertrofia fisiológica se caracteriza por una función contráctil normal o aumentada junto con una estructura cardíaca normal donde el miocardio crece de manera uniforme, y la reversibilidad de la hipertrofia al cesar el estímulo que lo provoca (McMullen y Jennings, 2007). Las señales bioquímicas que subyacen a la hipertrofia fisiológica incluyen hormonas del crecimiento que se unen a receptores tirosina quinasa, así como señales mecánicas (Maillet y cols., 2013). Diferentes ligandos como la hormona tiroidea, la insulina, la hormona del crecimiento y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) activan vías de señalización que convergen en el eje de señalización fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) – Akt – proteína quinasa activada por AMP – diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, de *mammalian Target of Rapamycin*), afectando la transcripción de genes, la traducción de proteínas y el

metabolismo (Maillet y cols., 2013; Tham y cols., 2015; Shimizu y Minamino, 2016) (**Figura 20**).

La hipertrofia patológica, por el contrario, se caracteriza por la disfunción contráctil, junto con cambios estructurales cardíacos, fibrosis del miocardio, activación de genes fetales normalmente expresados durante la fase embrionaria, desorganización del aparato contráctil o de las miofibrillas, y al aumento de riesgo de sufrir insuficiencia cardíaca y muerte súbita (Woodcock y cols., 2008). (Tema desarrollado en mayor profundidad en el próximo punto 3.3.1 *Hipertrofia cardíaca patológica* de este apartado).

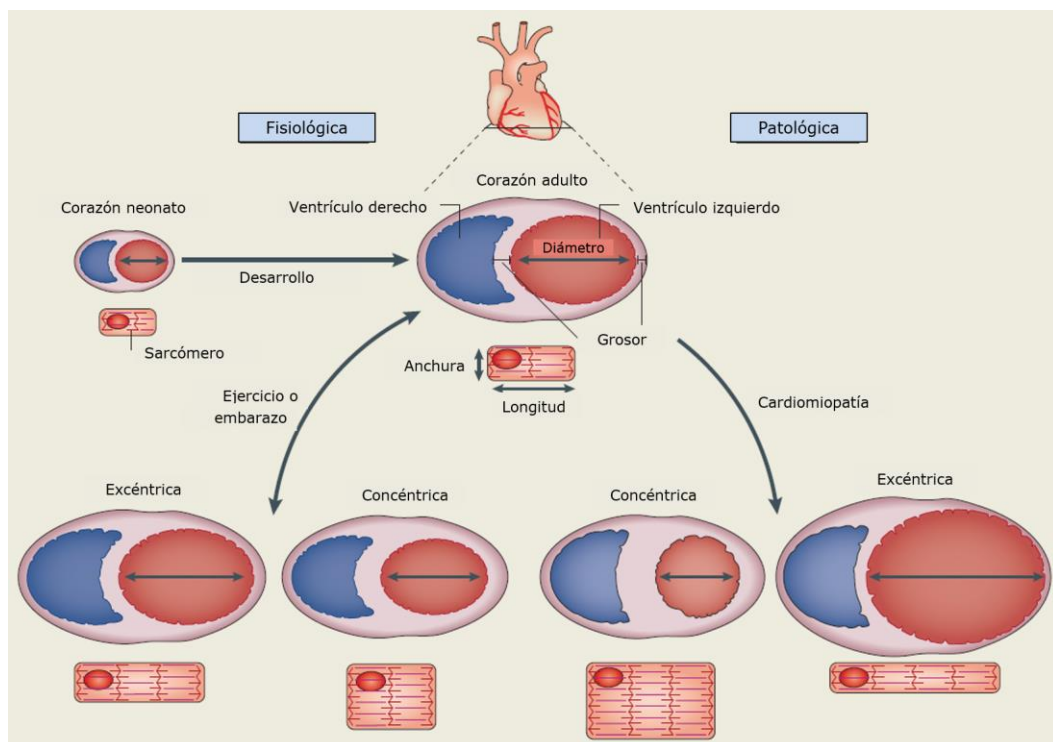


Figura 19: Geometrías de la hipertrofia cardíaca fisiológica y patológica. La imagen muestra el aumento relativo de las paredes y el volumen ventricular, y el crecimiento del cardiomiocito en cada grupo. Figura tomada y modificada de Maillet y cols., 2013.

Desde un punto de vista geométrico la hipertrofia puede clasificarse en dos subgrupos: excéntrica y concéntrica. Esta clasificación se basa en los cambios producidos en la forma del corazón y en los cardiomiocitos individuales, y depende del estímulo de inicio (Bernardo y cols., 2010; Maillet y cols., 2013) (**Figura 19**). La hipertrofia excéntrica fisiológica se caracteriza por el aumento del volumen ventricular con un crecimiento uniforme del grosor de la pared y del septo, donde los cardiomiocitos crecen tanto en longitud como en anchura. La hipertrofia excéntrica patológica, en cambio, se desarrolla con enfermedades como el infarto de miocardio o la cardiomiopatía dilatada, y conduce a la dilatación de la pared ventricular y al

alargamiento de los cardiomiocitos por la adición en serie de sarcómeros. Por otro lado, la hipertrofia concéntrica muestra un aumento relativo del grosor de la pared junto con la reducción de la dimensión de la cámara ventricular izquierda. La adición en paralelo de sarcómeros contribuye al engrosamiento de los cardiomiocitos. La hipertrofia concéntrica suele desarrollarse en condiciones patológicas como la hipertensión crónica o estenosis valvulares; sin embargo, el ejercicio como la lucha libre o el levantamiento de pesas también induce una forma leve de hipertrofia concéntrica no patológica. En general, la sobrecarga de volumen produce hipertrofia excéntrica y la sobrecarga de presión hipertrofia concéntrica (Carreño y cols., 2006; Bernardo y cols., 2010; Maillet y cols., 2013).

3.3.1 Hipertrofia cardíaca patológica

La hipertrofia cardíaca patológica es el proceso que sufre el corazón como respuesta temprana y progresiva a las situaciones como isquemia, sobrecarga de presión o de volumen, o daños mecánicos, y puede constituir el paso inicial a la IC.

Cuando el ventrículo es sometido a estrés, el rendimiento cardíaco se mantiene, inicialmente, mediante mecanismos adaptativos como la hipertrofia adaptativa y la dilatación ventricular a lo que hay que añadir una sobreactivación de diferentes vías neurohormonales (sistema renina-angiotensina-aldosterona, sistema nervioso simpático, vasopresina y péptidos natriuréticos). Sin embargo, si la sobrecarga es severa y prolongada, estos mecanismos compensadores se ven superados y el corazón hipertrofiado puede dilatar, decaer la función cardíaca, progresar hasta la insuficiencia cardíaca, y finalmente, sobrevenir la muerte por fallo cardíaco (Oka y Komuro, 2008; Bernardo y cols., 2010).

En la hipertrofia cardíaca patológica la transición desde la hipertrofia compensadora a la IC comprende cambios a nivel de expresión génica, molecular, celular e intersticial, como:

- hipertrofia de los cardiomiocitos
- cambios en la matriz extracelular, fibrosis
- cambios en el fenotipo de los cardiomiocitos a causa de la reexpresión de genes fetales y de la disminución de la expresión de genes adultos
- alteraciones en la expresión y/o función de las proteínas implicadas en la contracción
- muerte de los cardiomiocitos por necrosis o apoptosis
- anomalías metabólicas

Conjuntamente, estos eventos se manifiestan clínicamente como cambios en el tamaño, la estructura (aumento de la masa cardíaca, dilatación de la cavidad) y la función del corazón (disfunción sistólica y/o diastólica) (Cohn y cols., 2000; Oka y Komuro, 2008).

A diferencia de la hipertrofia fisiológica, la hipertrofia patológica es provocada por catecolaminas, hormonas y factores humorales liberados durante la tensión biomecánica. Un número creciente de vías de señalización intracelulares han sido caracterizados como importantes transductores de la respuesta hipertrofica, entre los cuales se encuentran las proteínas G ($G_{q/11}$, G_s , G_i), las GTPasas de bajo peso molecular (Ras, RhoA y Rac), las cascadas de MAPK (proteína quinasas activadas por mitógeno), la PKC, y la calcineurina, entre otros (Molkentin y Dorn II, 2001; Tham y cols., 2015). Su activación resulta en múltiples cascadas de señalización intracelular, las cuales finalmente afectan a factores nucleares y a la regulación de la expresión génica (Molkentin y Dorn II, 2001; Mudd y Kass, 2008). De modo que la hipertrofia patológica no es regulada a través de una única vía de señalización, sino que se compone de un entramado de vías de transducción integradas (**Figura 20**).

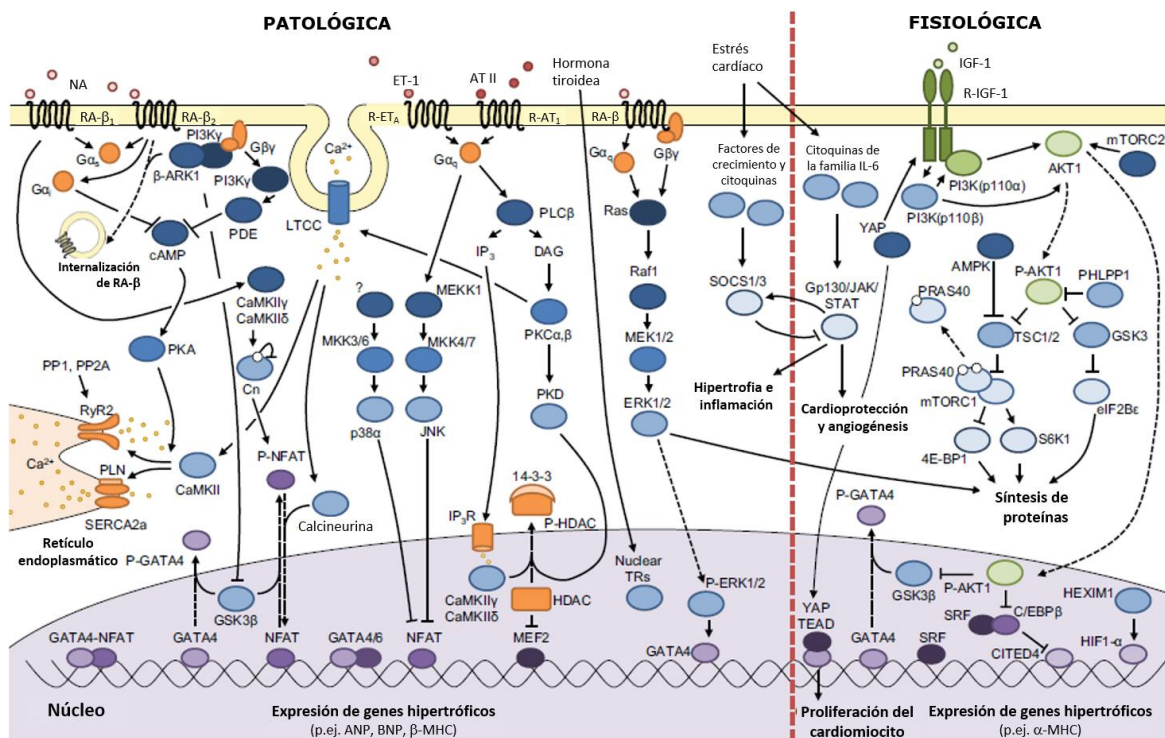


Figura 20: Esquema de las principales vías de señalización involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica. La señalización es compleja y se compone de un entramado de vías de transducción integradas. Las líneas discontinuas indican translocación a un compartimiento intracelular diferente. Figura tomada y modificada de Tham y cols., 2015.

3.3.2 Fibrosis

El depósito y la acumulación de tejido fibroso en la matriz extracelular (MEC) es uno de los cambios que acompaña a la hipertrofia en el remodelado cardíaco, y

puede promover la progresión de la enfermedad en muchas causas de IC (Schelbert y cols., 2014).

En el corazón adulto de los mamíferos, la MEC consiste en una red de proteínas estructurales (colágeno y elastina) y macromoléculas (glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas) que actúa como base de anclaje para los componentes celulares y la microvasculatura coronaria del miocardio (Weber y cols., 2013). El componente principal de la MEC es el colágeno fibrilar. Aproximadamente el 85% del colágeno miocárdico total es de tipo I, el cual forma fibras gruesas que confieren resistencia al estiramiento. Mientras que el colágeno tipo III, que representa el 11% del colágeno total, forma finas fibras y aporta elasticidad a la matriz (Weber, 1989).

El colágeno se distribuye en la MEC en tres estructuras denominadas, endomisio, perimisio y epimisio (**Figura 21**). El endomisio rodea e interconecta las fibras musculares individuales y la microvasculatura, y actúa como sitio de unión para las proteínas del citoesqueleto de los cardiomiocitos a través de la membrana plasmática. El perimisio rodea a grupos de fibras musculares y segrega a los cardiomiocitos en grupos. Sus fibras a menudo forman configuraciones en espiral capaces de almacenar energía y proporcionar resistencia al estiramiento. El epimisio se localiza en las superficies endocárdicas y epicárdicas y rodea y agrupa un gran número de fibras musculares preservando su orientación a lo largo del miocardio (Weber y cols., 2013; Kong y cols., 2014).

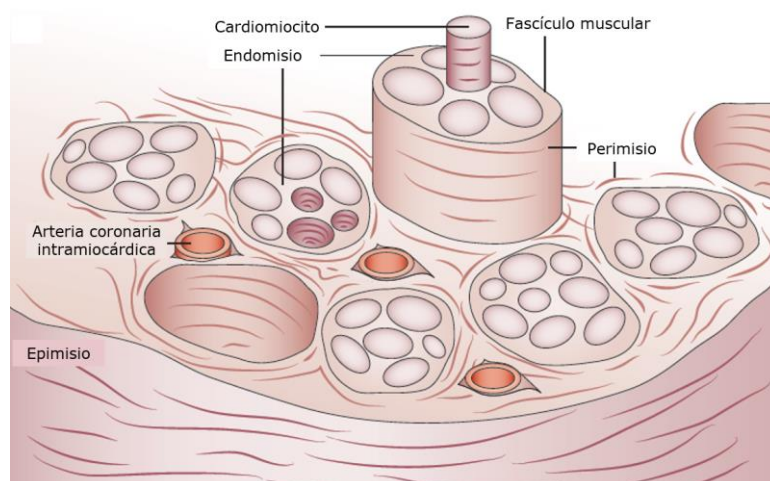


Figura 21: Matriz del colágeno fibrilar. En endomisio rodea e interconecta los cardiomiocitos y los capilares adyacentes. El perimisio rodea y segrega las fibras musculares en fascículos. El epimisio rodea y agrupa un gran número de miofibras. Figura tomada y modificada de Weber y cols., 2013.

La MEC, además de ser la base de anclaje para los componentes celulares, es también una estructura importante para la transmisión de la fuerza contráctil. Asimismo, el almacenamiento en la MEC de factores de crecimiento y proteasas latentes hace que su activación tras el daño cardíaco pueda desencadenar una respuesta fibrótica (Kong y cols., 2014).

El intersticio cardíaco contiene diferentes tipos celulares. Los fibroblastos cardíacos se enredan en la matriz intersticial endomisial que rodea a los cardiomiocitos y son esenciales para la producción del colágeno y la homeostasis de la MEC. Los fibroblastos segregan cadenas extracelulares de procolágeno que deben ser procesadas por proteinasas para ensamblarse en fibrillas e incorporarse a la MEC (González y cols., 2011). El colágeno fibrilar maduro es altamente estable con una vida media de 80-120 días. Posteriormente, las fibras de colágeno son degradadas por la acción consecutiva de diferentes enzimas de la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*), que a su vez pueden ser inhibidas por la interacción de inhibidores tisulares específicos de las MMPs (TIMPs, *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (López y cols., 2004). El control homeostático de la MEC implica un equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de colágeno (Kong y cols., 2014).

La fibrosis es un proceso esencial en la reparación de tejidos, pero su acumulación en el corazón puede conducir a cicatrices, al deterioro de la función sistólica y diastólica y, en última instancia, al fallo cardíaco (Kong y cols., 2014). La fibrosis miocárdica ocurre como resultado del desequilibrio entre el aumento de la secreción de colágeno por fibroblastos activos, los miofibroblastos, y la disminución de la degradación del colágeno. Los miofibroblastos responden a factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), a péptidos vasoactivos como la AT II, hormonas derivadas de la circulación como la aldosterona y a citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas (IL) (Segura y cols., 2014).

En el miocardio, la fibrosis puede clasificarse en fibrosis intersticial, fibrosis perivascular y fibrosis de reemplazo, según su promotor y localización anatómica (Schelbert y cols., 2014) (**Figura 22**). Por un lado, la fibrosis intersticial reactiva se acumula en el miocardio a consecuencia del incremento del estrés parietal y de factores humorales. Se define como la expansión de la MEC sin pérdida de cardiomiocitos y se caracteriza por la deposición generalizada en todo el miocardio. Por otro lado, la fibrosis perivascular es aquella en la que el colágeno fibrilar se acumula en la adventicia de la microvasculatura intramiocárdica. Por último, la fibrosis reparativa o de reemplazo ocurre tras la necrosis de cardiomiocitos, donde la acumulación de colágeno reemplaza el tejido muerto formando tejido cicatricial. Es un proceso de reparación esencial tras el infarto de miocardio (Talman y Ruskoaho, 2016); no obstante, la fibrosis reparativa o de reemplazo también ocurre en otras

condiciones patológicas como la hipertensión crónica, las cardiomiopatías o las insuficiencias valvulares, en las cuales, en última instancia, la viabilidad de los cardiomiocitos se ve afectada (Segura y cols., 2014; Piek y cols., 2016).

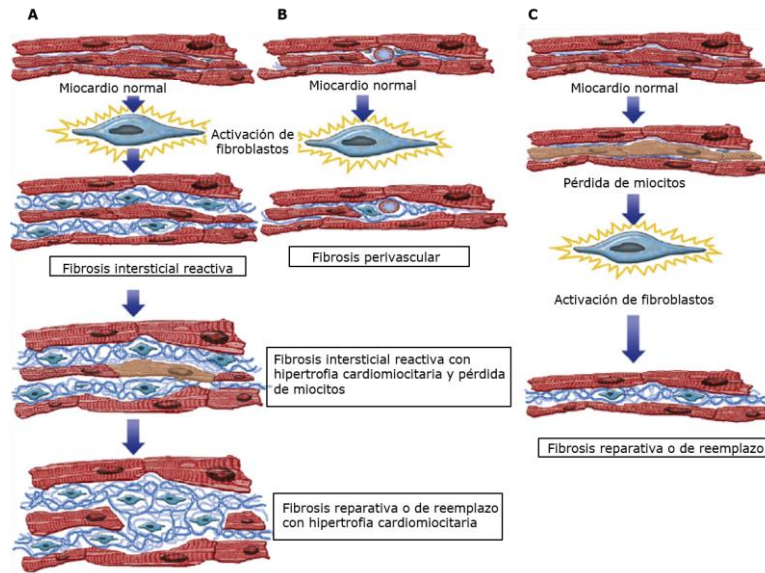


Figura 22: Diferentes tipos de fibrosis miocárdica. La expansión de la matriz extracelular puede ocurrir a través de diferentes mecanismos en la fibrosis miocárdica. **A.** La activación de fibroblastos genera fibrosis intersticial reactiva. Si los estímulos persisten, los cardiomiocitos hipertrofiados mueren y serán reemplazados por fibrosis reparativa o de reemplazo. **B.** La activación de fibroblastos genera fibrosis perivascular por acumulación de colágeno alrededor de los vasos. **C.** La pérdida de cardiomiocitos activa los fibroblastos y el tejido muerto es reemplazado por fibrosis reparativa o de reemplazo. Figura tomada y modificada de Schelbert y cols., 2014.

3.3.3 Activación humoral

El remodelado cardíaco también se acompaña de un aumento de la activación neurohumoral (Cohn y cols., 2000). Cuando la función cardíaca se deteriora, el organismo activa el sistema nervioso simpático y la liberación de factores humorales y hormonas (AT II, aldosterona, ET-1 y péptidos natriuréticos) con el objetivo de ayudar a mantener el gasto cardíaco mediante la retención de fluidos y el aumento del cronotropismo, inotropismo y dromotropismo (Mudd y Kass, 2008). En pacientes con insuficiencia cardíaca se ha comprobado que los niveles de las neurohormonas como la NA están relacionados con la función cardíaca, y que la estimulación sostenida es deletérea y augura un pobre pronóstico (Cohn y cols., 1984).

La adrenalina, NA, AT II y ET-1 han sido identificados como los factores neurohumorales más importantes en estimular la hipertrofia patológica y en contribuir

a su progresión hacia la IC (Simpson, 1985; Shubeita y cols., 1990; Sadoshima y Izumo, 1993a; Dorn II y Force, 2005).

- **Adrenalina y noradrenalina.** La activación neurohumoral de la IC se caracteriza por una elevada liberación de adrenalina y NA (Thomas y Marks, 1978). La adrenalina y NA son catecolaminas que se liberan en el sistema nervioso autónomo cuando el gasto cardíaco disminuye (Roig, 2004). En el miocardio activan dos clases principales de receptores adrenérgicos: receptores adrenérgicos- α_1 (RA- α_1) y receptores adrenérgicos- β (RA- β). El receptor adrenérgico más abundante en el corazón es el RA- β_1 , aunque también hay poblaciones funcionalmente importantes de RA- β_2 y RA- α_1 . Todos los receptores adrenérgicos son GPCRs con siete dominios transmembrana que activan diferentes familias de proteínas G. Los RA- β activan predominantemente la proteína G_s , y los RA- α_1 la proteína G_q ; aunque los RA- β_2 y RA- α_1 también pueden acoplarse la proteína G_i (Jensen y cols., 2011). Los pacientes con IC tienen catecolaminas circulantes elevadas y un aumento de la actividad simpática, lo que inicialmente aumenta la contractilidad y puede ser beneficioso (Hasking y cols., 1986; Bristow, 2000). Sin embargo, la activación adrenérgica prolongada es perjudicial y está asociado con la desensibilización y la regulación negativa de los RA- β (Bristow, 2000; Bernardo y cols., 2010). Asimismo, la activación de los RA- α_1 parece desempeñar un papel importante en el mantenimiento del rendimiento cardíaco y en la remodelación cardíaca (Woodcock y cols., 2008).

- **Angiotensina II.** La AT II es la principal sustancia vasoactiva del sistema renina-angiotensina. Desempeña una gran variedad de acciones fisiopatológicas en el sistema cardiovascular a través de efectos sistémicos y locales. Es un potente vasoconstrictor periférico, y un importante estimulador de la hipertrofia cardíaca y de la fibrosis (Balakumar y Jagadeesh, 2010). Se han identificado dos subtipos de receptores para la AT II, receptor tipo 1 (AT₁) y receptor tipo 2 (AT₂) para la AT II, ambos pertenecen a la familia GPCRs. Los receptores AT₁ señalizan a través de la proteína G_q , mientras que los receptores AT₂ a través de la proteína G_i y están vinculados a la producción de óxido nítrico (Koitabashi y Kass, 2011). La mayoría de los efectos inducidos por AT II en los cardiomiocitos están mediados por el receptor AT₁ (Schluter y Wenzel, 2008). La inhibición de la formación de AT II mediante inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), así como los antagonistas de receptores AT₁, atenúan la hipertrofia cardíaca inducida por sobrecarga de presión (Bernardo y cols., 2010; Yasunari y cols., 2004).

- **Endotelina-1.** La ET-1 es un importante regulador autocrino y paracrino de la fisiología y la patología cardíaca. Producido localmente por cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales la ET-1 modula la contractilidad cardíaca a corto plazo e induce hipertrofia cardiomiocitaria a largo plazo (Drawnel y cols., 2013). La ET-1 ejerce su acción uniéndose a dos GPCRs: ET_A y ET_B. Los receptores ET_A ejercen su acción a

través de $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_s$ y $G\alpha_{12}$, activando la PLC y la producción de AMPc. Los receptores ET_B también se acomplan a $G\alpha_{q/11}$, sin embargo, interactúa preferentemente con $G\alpha_{i/o}$ y $G\alpha_{13}$ (Drawnel y cols., 2013). Aunque el miocardio exprese ambos receptores, los ET_A representan el 90% de los receptores para la ET-1 de los cardiomiocitos (Bernardo y cols., 2010). Se ha demostrado que durante el desarrollo de condiciones patológicas como la isquemia y la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) los niveles de ET-1 están elevados, favoreciendo el remodelado cardíaco y su progresión a la IC (Roig, 2004).

3.4 Estenosis aórtica

La estenosis aórtica (EAo) es una enfermedad común en la que el estrechamiento progresivo de la válvula aórtica impone una carga de presión anormalmente alta sobre el VI (Yarbrough y cols., 2012). La reducción del orificio valvular se debe a un daño degenerativo congénito o adquirido, principalmente secundaria a la calcificación degenerativa asociada a la edad, aunque también puede deberse a una enfermedad reumática o a anomalías congénitas del aparato valvular (Gavira y cols., 2005). Cerca del 2-7% de la población mayor de 65 años de edad se ve afectada por la forma degenerativa, por lo que la EAo es la enfermedad valvular más frecuente en Europa y Estados Unidos (Urso y cols, 2014).

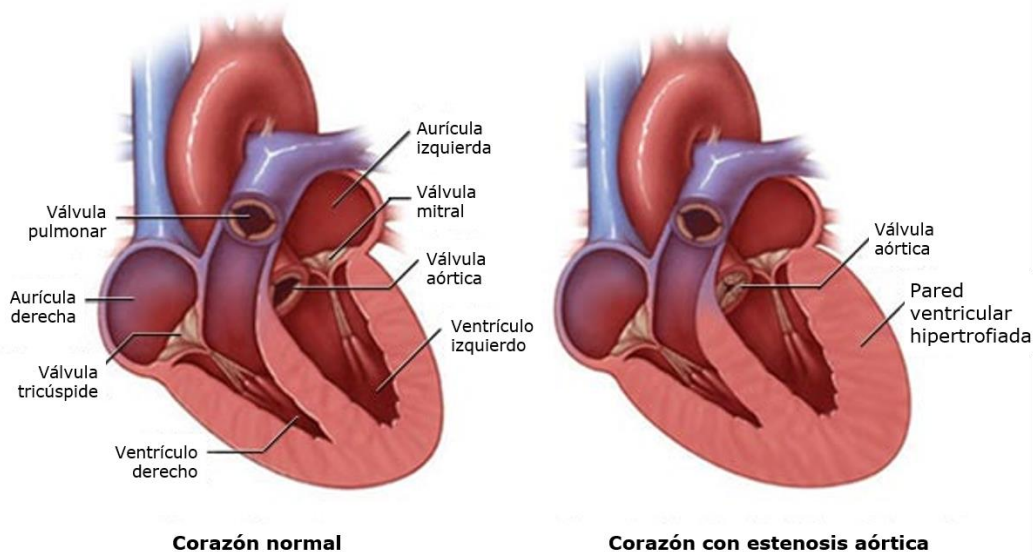


Figura 23: Desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda en la estenosis aórtica. La disminución progresiva del orificio de la válvula aórtica requiere una mayor presión del ventrículo izquierdo (VI) durante la fase de expulsión. Como consecuencia la pared ventricular izquierda y el septo interventricular hipertrofian, y los fibroblastos activos aumentan la deposición de colágeno en la matriz extracelular, conduciendo a la fibrosis miocárdica. Figura tomada y modificada de <http://dxline.info/diseases/aortic-stenosis>.

Por una parte, la EAo se caracteriza por la hipertrofia cardiomiocitaria y el incremento del grosor de la pared y la masa ventricular conduciendo a una hipertrofia concéntrica. Inicialmente, la hipertrofia del miocardio actúa para normalizar la tensión de la pared, pero en última instancia demuestra ser una respuesta maladaptativa (Dweck y cols., 2012a). Por otra parte, la EAo conduce a fibrosis miocárdica progresiva, rigidez del VI y a un deterioro del llenado diastólico (Yarbrough y cols., 2012); procesos que contribuyen a la progresión de la disfunción diastólica del VI y de la IC (Hein y cols., 2003).

Es por ello que la EAo es un modelo humano de HVI originado exclusivamente por sobrecarga de presión, característica que lo hace interesante para la profundización de los mecanismos asociados a la hipertrofia cardíaca.

4. Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en el miocardio

4.1 Expresión de PLCs en el miocardio

Entre los diferentes miembros de PLC, las familias PLC γ , PLC δ , PLC ϵ y PLC β son las predominantes en corazón (Tappia y Dalla, 2014). Y su activación es regulada a través de diferentes mecanismos, tal y como se ha descrito en secciones anteriores del presente manuscrito.

En tejido cardíaco postnatal se han descrito tres de las cuatro isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$, la isoenzima PLC β_1 , PLC β_2 y PLC β_3 (Schnabel y cols., 2000; González-Yanes y cols., 2001). La isoenzima PLC β_1 se expresa en dos variantes transcripcionales, PLC β_{1a} y PLC β_{1b} . Si bien ambas variantes se expresan en cardiomiocitos de rata neonata (Arthur y cols., 2001), la expresión de PLC β_{1a} se pierde durante el desarrollo postnatal y en cardiomiocitos de rata adulta solo se expresa la variante PLC β_{1b} (Grubb y cols., 2008). Asimismo, es la variante transcripcional PLC β_{1b} la única expresada en tejido auricular humano (Woodcock y cols., 2009). En cuanto a la isoenzima PLC β_4 , los resultados del análisis a gran escala del patrón de expresión génica en embriones de ratón (Visel y cols., 2004; www.genepaint.org), y la publicación de Suh y cols. en 2008 basada en el análisis de marcadores de secuencias expresadas (EST, *expressed sequences tag*) sugieren la expresión de la isoenzima PLC β_4 en corazón humano y de ratón. Sin embargo, hasta el inicio del presente trabajo de investigación ningún estudio había demostrado la existencia de esta isoenzima en tejido cardíaco adulto ni la posible función que podría desempeñar en el desarrollo hipertrófico.

4.2 Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y su función cardíaca

La escisión de fosfoinosítoles de membrana en IP₃ y DAG mediante las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras la activación de receptores acoplados a proteínas G_{q/11} aumenta la contractilidad cardíaca. El incremento de segundos mensajeros provocado por la proteína G_{q/11} eleva los niveles de Ca²⁺ dependientes del retículo endoplasmático y activa diferentes isoformas de PKC, proteína quinasa D (PKD) y CAMKII cardíacas (Dorn II y Force, 2005; Avkiran y cols, 2008; Mishra y cols., 2010). Quinasas que modulan proteínas implicadas en la contractilidad cardiomiocitaria, como la PKA (Braz y cols., 2004).

Asimismo, se ha demostrado que la señalización de la vía proteína G_{q/11}-PLC β juega un papel importante en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica (Filtz y cols., 2009; Tilley, 2011).

4.3 Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y la hipertrofia cardíaca

Las evidencias indican que la fase inicial del desarrollo de la hipertrofia cardíaca implica la liberación de factores humorales y hormonas (Heineke y Molkentin, 2006). La adrenalina, NA, AT II y ET-1 han sido identificados como los factores neurohumorales más importantes en estimular la hipertrofia cardíaca patológica y en contribuir a su progresión hacia la insuficiencia cardíaca (Simpson, 1985; Shubeita y cols., 1990; Sadoshima y Izumo, 1993a; Dorn II y Force, 2005). Todos estos factores hipertróficos comparten el hecho de que dentro del complejo entramado de señalización activan la PLC β a través de receptores (α_1 , AT₁, ET_A y ET_B) acoplados a proteínas heterotriméricas G_{q/11} (Heineke y Molkentin, 2006).

Cuando la sobrecarga biomecánica y los mediadores neurohumorales activan la PLC β a través de la proteína G_{q/11}, conduce a la generación de los segundos mensajeros IP₃ y DAG. El continuo aumento de la concentración del Ca²⁺ citosólico mediado por el IP₃, activa la fosfatasa calcineurina. La calcineurina desfosforila varios residuos de la región N-terminal del factor nuclear del linfocito T activado (NFAT, *nuclear factor of activated T cells*), permitiendo su translocación al núcleo y activando la transcripción de genes de la respuesta hipertrófica (Dorn II y Force, 2005). El DAG junto con el Ca²⁺ liberado del retículo endoplasmático activa la PKC, que a su vez activa la PKD. Una vía de señalización que inhibe las histona deacetilasas (HDAC) que regulan específicamente la hipertrofia celular (McKinsey y Olson, 2005) (**Figura 24**).

Los estudios más detallados sobre la implicación de la vía de transducción proteína G_{q/11} - PLC β en la hipertrofia cardíaca patológica se han realizado en cardiomiocitos de rata neonata. *In vitro*, la hipertrofia puede determinarse en el

incremento del tamaño o del área celular, así como en el patrón de expresión de genes de expresión rápida, y en el cambio de isoformas de las proteínas contráctiles similares a las observadas en la hipertrofia patológica *in vivo* (Izumo y cols., 1988). Por una parte, los primeros estudios en cardiomiocitos de rata neonata demostraron que agonistas de GPCRs como la NA, la AT II o la ET-1 aumentaban el tamaño celular de manera dependiente de la dosis (Simspon, 1985; Sadoshima e Izumo, 1993a, Shubeita y cols., 1990). Los efectos hipertróficos de estos agonistas se asociaron a la activación de la PLC, demostrado por el incremento del contenido de IP₃ y DAG en los cardiomiocitos (Adams y cols., 1998, Sadoshima y Izumo 1993b, Shubeita y cols., 1990). Por otra parte, se observó que la sobreexpresión de receptores que se acoplan a la vía proteína G_{q/11}-PLC conduce a hipertrofia, mientras que la expresión de receptores con mutaciones que bloquean el acoplamiento a la proteína G_q no median respuestas hipertróficas (Ramirez y cols., 1995). Asimismo, la sobreexpresión de la subunidad G α_q en cardiomiocitos de rata neonata incrementa la actividad de PLC, provocando el aumento del tamaño celular y la reorganización de miofilamentos (Adams y cols., 1998).

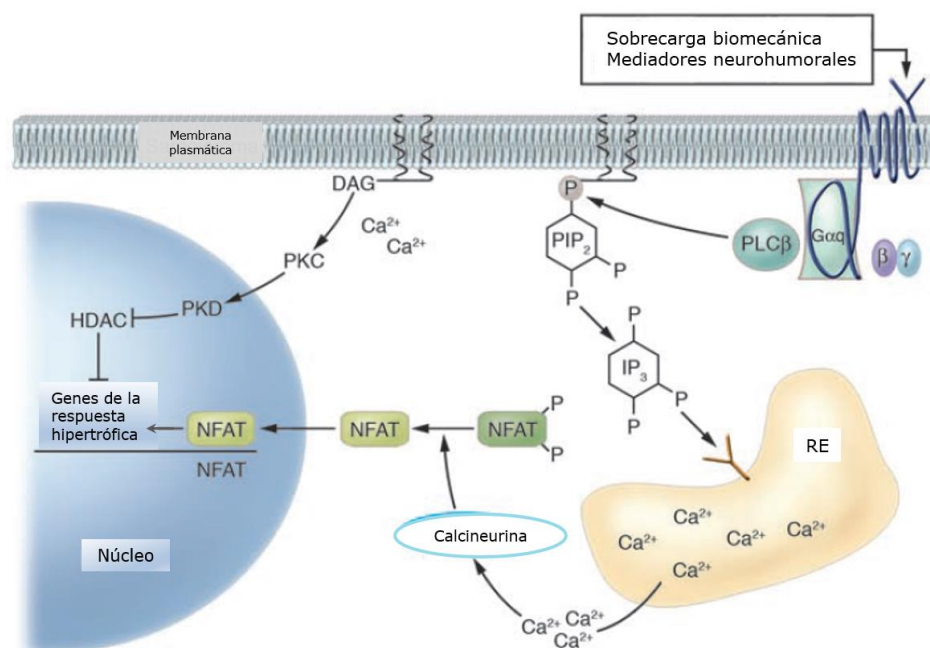


Figura 24: Vía de señalización proteína G_{q/11}-PLCβ en la hipertrofia cardíaca patológica. El estímulo hipertrófico, a través de la proteína G_{q/11} recluta la PLCβ a la membrana, donde hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) liberando inositol(1,4,5)-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ se une a receptores del retículo endoplasmático (RE) liberando calcio (Ca²⁺). El incremento de la concentración de Ca²⁺ citosólico activa la calcineurina y su diana, el factor de transcripción nuclear del linfocito T activado (NFAT), permitiendo su translocación al núcleo y activando los genes de la respuesta hipertrófica. El DAG junto con el Ca²⁺ liberado activan la proteína quinasa C (PKC), que a su vez activa la proteína quinasa D (PKD). Una vía de señalización que inhibe las histona deacetilasas (HDAC) que regulan específicamente la hipertrofia celular. Figura tomada y modificada de Dorn II y Force, 2005.

En estudios realizados *in vivo* se ha demostrado que el aumento de la actividad de la proteína heterotrimérica G_q causa hipertrofia y agudiza las respuestas hipertróficas de la sobrecarga de presión (Milano y cols., 1994). A su vez, la sobreexpresión de G_q desarrolla un fenotipo parecido al de la hipertrofia cardíaca humana (D'Angelo y cols., 1997). Por otro lado, la inhibición de la señal de $G_{q/11}$, a través de la sobreexpresión de un péptido carboxilo-terminal de G_{α_q} , redujo la respuesta hipertrófica inducida por la sobrecarga de presión sin causar dilatación, a pesar de aumentar la presión de la pared ventricular (Akhter y cols., 1998; Esposito y cols., 2001; Wettschureck y cols., 2001). Asimismo, tanto el aumento de los niveles de inositol fosfato en cardiomiocitos que sobreexpresaban la proteína G_{α_q} (Adams y cols., 1998) como la incapacidad de ratones transgénicos que expresan una G_{α_q} que no puede unirse a $PLC\beta$ de generar dilatación del corazón (Fan y cols. 2005) apoya la implicación de la activación de $PLC\beta$ en el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

De las tres isoenzimas $PLC\beta_{(1-3)}$ descritas en el miocardio, sólo las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_3$ han sido relacionadas con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Schnabel y cols., 2000; Arthur y cols., 2001). Woodcock y su grupo determinaron en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata que la respuesta hipertrófica a la activación de los receptores adrenérgicos α_1 – proteína G_q implica exclusivamente a la isoenzima $PLC\beta_1$, en concreto a la variante $PLC\beta_{1b}$, aunque la isoenzima $PLC\beta_3$ también se exprese (Grubb y cols., 2008). Asimismo, demostraron que la sobreexpresión de la isoenzima $PLC\beta_{1b}$ en cardiomiocitos de rata neonata, no en cambio el de la $PLC\beta_{1a}$, incrementa el tamaño celular, eleva el ratio proteína/ADN, y agudiza la expresión del marcador génico de la hipertrofia, el péptido natriurético aricular (ANP) (Filtz y cols., 2009). Además, revelaron que únicamente la expresión de la variante $PLC\beta_{1b}$ está elevada en aurícula izquierda de pacientes con insuficiencia mitral, no, en cambio, la expresión de las demás isoenzimas PLC estudiadas (Woodcock y cols., 2009). Sugiriendo que la isoenzima $PLC\beta_{1b}$ está implicada selectivamente en la respuesta hipertrófica.

Sin embargo, se desconoce, tal y como lo sugieren varios trabajos (Visel y cols., 2004; Suh y cols., 2008), si la isoenzima $PLC\beta_4$ también se expresa en tejido cardíaco y qué función podría desempeñar en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Ninguno de los trabajos mencionados estudiaron todas las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en sus ensayos. Asimismo, se desconoce la regulación diferencial que podrían sufrir las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ tras los diferentes estímulos hipertróficos recibidos en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica.

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

A continuación se detallan las hipótesis relativas a cada uno de los capítulos tratados en este trabajo:

Capítulo 1. Caracterización de la expresión de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco de diferentes especies:

- La isoenzima PLC β_4 podría expresarse en tejido cardíaco.

Capítulo 2. Estudio de la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras diferentes estímulos hipertróficos:

- Los diferentes estímulos hipertróficos podrían regular de manera diferencial las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en tejido cardíaco.

Capítulo 3. Estudio de la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de ventrículo izquierdo en pacientes con estenosis aórtica severa:

- La isoenzima PLC β_4 podría tener una expresión significativa en el miocardio ventricular de los pacientes con EAo severa.
- En el VI de pacientes con EAo severa, modelo de sobrecarga pura de presión, la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ debería estar alterada.
- La expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ podría asociarse con la activación humoral, el diámetro de los cardiomiocitos de VI, el grado de fibrosis de VI, y las variables clínicas de función cardíaca en pacientes con EAo severa.

2. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

Capítulo 1. Caracterización de la expresión de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco de diferentes especies:

1.1. - Evaluar la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en VI de diferentes especies y en cardiomiocitos murinos HL-1.

1.2.- Determinar el patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI de diferentes especies y en cardiomiocitos murinos HL-1.

Capítulo 2. Estudio de la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras diferentes estímulos hipertróficos:

2.1.- Determinar si existe una regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras diferentes estímulos hipertróficos en cardiomiocitos murinos HL-1.

Capítulo 3. Estudio de la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de ventrículo izquierdo en pacientes con estenosis aórtica severa:

3.1.- Determinar y establecer si existen diferencias en el patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en PL y en SI de pacientes con EAo y en pacientes control mediante biopsias cardíacas obtenidas durante la cirugía de sustitución valvular.

3.2.- Determinar la asociación de la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI de pacientes con EAo con:

- los niveles séricos de NA y AT II
- la hipertrofia cardiomiocitaria del VI
- la fibrosis miocárdica del VI
- la morfología ventricular, la función sistólica y la función diastólica

Material y métodos

1. Material biológico

1.1 Muestras de rata y ratón

En todo momento los animales de este estudio fueron manipulados siguiendo la directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC y el Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre de 2005 sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Se utilizaron ratas adultas Wistar-Kyoto machos y ratones adultos BALB/c machos de entre 20 y 22 semanas de vida. Los animales fueron suministrados por Charles River® (Barcelona) y estabulados en el animalario de la Unidad Experimental del Hospital Donostia con las siguientes condiciones medioambientales de estabulación: 15 renovaciones de aire/hora, alternancia luz/oscuridad 12/12 horas y 20 ± 2 °C de temperatura. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de mantenimiento rata/ratón, y tuvieron libre acceso a la comida y agua.

1.1.1 Biopsias de ventrículo izquierdo

Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y los ratones por dislocación cervical. Tras proceder a la disección del corazón, la mitad de los ventrículos izquierdos se guardó directamente a -80 °C para la posterior extracción de proteínas. La otra mitad se sumergió en el agente estabilizador RNA later ® (ref. AM7020, Ambion, Life Technologies) y se incubó durante 24 h a 4 °C, tras lo cual se retiró del estabilizador y se almacenó a -80 °C para la extracción de ARN.

1.1.2 Cerebelo de ratón

Tras el sacrificio por dislocación cervical del ratón, se procedió a abrir con tijeras curvas el cráneo del animal por la línea media. Con la ayuda de pinzas se apartó la bóveda craneal y con una espátula se extrajo la masa cefálica, finalmente, separando el cerebelo. Se pesó el cerebelo y se incluyó en 20 volúmenes del tampón Tris-EGTA a 4 °C (**Anexo 1, apartado A**), para proceder seguidamente con la extracción de proteínas.

1.1.3 Sangre de ratón

La extracción de sangre de ratón se hizo a través de punción cardíaca. El anestesiado del animal se realizó mediante la administración inhalatoria de isoflurano (Forane®) al 5% y oxígeno al 100% a 1 L/min durante 1 minuto aproximadamente, hasta la eliminación de reflejos. Tras anestesarlo, el animal se colocó en decúbito lateral derecho y se procedió a punzar el ventrículo izquierdo mediante una aguja de

25 G. Se recogió en una jeringa un volumen máximo de 1 mL de sangre. Posteriormente el ratón fue sacrificado mediante la sobredosificación de anestésico.

1.2 Cultivos celulares

1.2.1 *Cardiomiocitos murinos HL-1*

1.2.1.1 Características generales

La línea celular HL-1 fue establecida por Claycomb y colaboradores a partir de cardiomiocitos murinos AT-1, linaje tumoral de cardiomiocitos de aurícula inducido en ratones transgénicos. Se trata de una línea celular estable, capaz de dividirse indefinidamente, de mantener su fenotipo cardíaco adulto diferenciado a lo largo de distintos pases y de contraerse espontáneamente. La preservación de estas características tras la descongelación de las células de *stocks* congelados en nitrógeno líquido hace que actualmente constituya un modelo de cardiomiocitos adultos proliferativos útil para el estudio de la compleja regulación celular y molecular de la función cardíaca (Claycomb y cols., 1998).

Los cardiomiocitos HL-1 contienen un único núcleo central rodeado de sarcómeros bien organizados, gránulos perinucleares de factor natriurético auricular, así como filamentos de miosina y desmina. Presentan un perfil de expresión génica similar al de los cardiomiocitos adultos, y estudios farmacológicos han demostrado que responden apropiadamente a agonistas inotrópicos y cronotrópicos, indicativo de la expresión de receptores funcionales, como los receptores adrenérgicos α_1 (McWhinney y cols., 2000) o los receptores AT₁ para la AT II (Alfarano y cols., 2008), y de proteínas intracelulares necesarios para la señalización de las diferentes vías de transducción (White y cols., 2004).

1.2.1.2 Condiciones de cultivo para el mantenimiento y crecimiento de cardiomiocitos HL-1

A lo largo de todo el proceso de cultivo se mantuvieron estrictas condiciones de esterilidad. Las manipulaciones se realizaron en el interior de una cabina de seguridad biológica BIO II, y todo el material y reactivos que estuvieron en contacto con las células era estéril. De modo que, cuando fue necesario, el material y las soluciones no termosensibles se esterilizaron en autoclave, y las soluciones termosensibles mediante filtros comerciales con un tamaño de poro de 0,22 μm (Millex®-OR, ref. SLGL0250 S, Millipore).

Los cardiomiocitos murinos HL-1 utilizados en este estudio fueron donados por el Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, EEUU). Los cardiomiocitos (pases entre 61 y 65) fueron sembrados en frascos de cultivo de 42

75 cm² (Corning® 75cm², ref. 430641, Corning Incorporated), pretratados durante toda la noche a 37 °C con gelatina/fibronectina (**Anexo 1, apartado B**), en medio de cultivo Claycomb suplementado con NA. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, con 5% de CO₂ y una atmósfera humidificada. Cuando el cultivo alcanzaba la confluencia era necesario dividirlo en subcultivos, para ello los cardiomiocitos se tripsinizaron con tripsina/EDTA durante dos incubaciones de 3 minutos y se recogieron tras añadir la solución inhibidora de tripsina y el medio de lavado. La suspensión recogida se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos y el *pellet* obtenido fue resuspendido en medio de cultivo Claycomb suplementado con NA fresco y sembrado dividido en frascos nuevos.

Con el objetivo de tener *stocks* de cardiomiocitos HL-1 parte de los cultivos se congelaron cuando llegaron a la confluencia. La congelación se hizo a partir de *pellets* obtenidos tras la tripsinización y centrifugación de las células, resuspendiéndolos en medio de congelación. La suspensión se guardó en criotubos (Nunc® CyoTubes®, ref. V7759, Sigma-Aldrich) y se congeló paulatinamente (-1 °C/minuto) en un contenedor para congelación Nalgene® con isopropanol a -80 °C. Tras 6 horas el vial fue almacenado en nitrógeno líquido. Para la descongelación, el criotubo se sumergió en un baño a 37 °C durante 2 minutos, y la suspensión se centrifugó junto al medio de lavado a 500 x g durante 5 minutos. El *pellet* obtenido fue resuspendido en medio de cultivo Claycomb suplementado con NA fresco y sembrado en un frasco nuevo pretatado con gelatina/fibronectina.

Para el conteo de los cardiomiocitos, se resuspendieron alícuotas de 100 µL en un ratio 1:1 con azul de tripán (0,4%) y se contaron en un contador de células automatizado (TC20™, BioRad) o en un hemocitómetro Neubauer.

1.2.1.3 Condiciones de cultivo de cardiomiocitos HL-1 con estimuladores hipertróficos

Para poder determinar el efecto que diferentes estimuladores hipertróficos podrían provocar sobre la regulación de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ en cardiomiocitos HL-1, estos fueron tratados con AT II y con el agonista α₁-adrenérgico fenilefrina (PE).

Previo al inicio del tratamiento, se procedió a retirar el medio de las células HL-1 reemplazándolo por medio de cultivo Claycomb sin NA ni suero fetal bovino (*FBS*). Tras 24 h, se procedió a sustituirlo por el medio correspondiente al tratamiento: AT II 1 µM en ausencia de NA y *FBS* durante 24 h, o PE 10 µM en ausencia de NA y *FBS* durante 48 h (Vinciguerra y cols., 2009; Ferguson y cols., 2013). Asimismo, junto a cada tratamiento se llevaron a cabo sus respectivos controles, a los que se les añadió medio Claycomb en ausencia de NA y *FBS* (**Figura 25**). En el caso de las células tratadas con PE y de su control, el medio se renovó transcurridas las primeras 24 h de tratamiento.

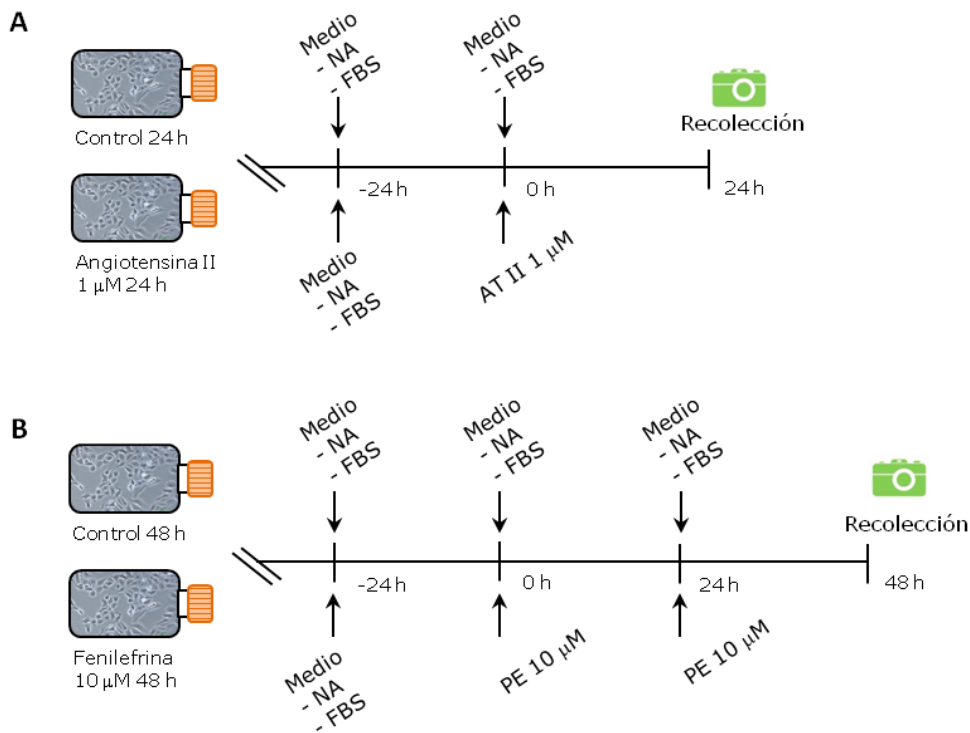


Figura 25: Diagrama temporal de los tratamientos administrados a los cardiomiocitos HL-1. **A.** Desarrollo del tratamiento de las células con angiotensina II $1 \mu\text{M}$ y control 24 h. **B.** Desarrollo del tratamiento de las células con fenilefrina $10 \mu\text{M}$ y control 48 h. NA: noradrenalina, FBS: suero fetal bovino; AT II: angiotensina II; PE: fenilefrina.

La recolección de los cardiomiocitos tratados y control se realizó tras la obtención de imágenes digitalizadas de microscopio para la cuantificación del área celular (ver apartado 1.2.1.4 *Cuantificación del área celular de los cardiomiocitos HL-1*). La recolección se realizó a partir de *pellets* obtenidos tras la tripsinización y centrifugación. Después de resuspender los *pellets* en DPBS 1X y centrifugarlos 5 minutos a $500 \times g$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$, operación repetida tres veces, se retiró el sobrenadante y se almacenaron los *pellets* a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta la posterior extracción de ARN.

1.2.1.4 Cuantificación del área celular de los cardiomiocitos HL-1

El área de las células se cuantificó manualmente mediante imágenes digitalizadas de microscopio. La obtención de imágenes digitales de los cardiomiocitos se llevó a cabo con el microscopio de fase contraste Nikon Eclipse TS100-F (Nikon corporation) y la cuantificación del área celular con el programa NIS-Elements AR v3.0 (Nikon Instruments Europa). Para ello se midió el área celular de 40 células aleatorias en cada imagen digitalizada y los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos se compararon estadísticamente con los obtenidos en su grupo control.

1.3 Muestras humanas

1.3.1 Aspectos éticos

Todos los sujetos incluidos en la investigación fueron informados sobre las características del estudio y firmaron el consentimiento informado permitiendo su inclusión en el mismo. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa, así como por el Comité de Ética para las Investigaciones relacionadas con Seres Humanos (CEISH/GIEB) de la UPV/EHU. Todos los aspectos del estudio se ajustaron a los principios de las Declaraciones de Helsinki.

1.3.2 Diseño del estudio

En el periodo de tiempo comprendido entre junio de 2011 y julio de 2012 se reclutaron 18 pacientes consecutivos diagnosticados de EAo severa con indicación quirúrgica de reemplazo valvular.

Los pacientes eran reclutados de entre los remitidos para estudio hemodinámico y coronariográfico al Servicio de Hemodinámica de Policlínica Gipuzkoa con diagnóstico clínico de EAo severa. Se incluyeron todos aquellos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y no presentaron criterios de exclusión.

Los criterios de inclusión:

1. Varones y mujeres con edad superior a 60 años diagnosticados de EAo severa con indicación quirúrgica de reemplazo valvular.
2. Aceptación expresa y firmada del paciente para participar en el proyecto de investigación.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con EAo sin indicación quirúrgica de reemplazo valvular.
2. Insuficiencia valvular aórtica superior a leve.
3. Insuficiencia mitral superior a ligera.
4. Enfermedad coronaria significativa que requiriese de algún procedimiento de revascularización.
5. Infarto de miocardio previo.
6. Algún procedimiento de revascularización percutánea previo.
7. Insuficiencia hepática, definida por una cifra de transaminasas igual o superior al doble de los valores de referencia del Hospital Universitario Donostia (gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT) >42 U/L, aspartato aminotransferasa (AST/GOT) >31 U/L, alanina aminotransferasa (ALT/GPT) >33 U/L).
8. Insuficiencia renal significativa, definida por un valor de filtrado glomerular renal (FGR) <30.
9. *Diabetes mellitus*.

10. Otras enfermedades inflamatorias o fibrogénicas (*arthritis reumatoide*, fibrosis pulmonar).

A todos los pacientes se les realizó un estudio ecocardiográfico 2D-doppler en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Donostia. La intervención quirúrgica y, por tanto, la toma de material biopsico se realizó en el Servicio de Cirugía Cardíaca de Policlínica Gipuzkoa en un plazo no superior a 7 días desde la realización del estudio ecocardiográfico.

Como muestra control se reclutó una mujer de 79 años diagnosticada de estenosis mitral (EM) con indicación quirúrgica que aceptó participar en el estudio y que presentaba una fracción de eyección normal, normofunción diastólica, y no presentaba antecedentes de hipertensión arterial, ni historia previa de infarto de miocardio, ni tampoco HVI. La EM es una valvulopatía caracterizada por el estrechamiento de la válvula mitral en la que el VI no resulta afectado. Las muestras del único paciente con EM disponible fueron consideradas como VI humano control con EM de edad similar a la edad media de los pacientes con EAo. La dificultad de encontrar pacientes con estenosis mitral desde que se trata la fiebre reumática de forma precoz con antibióticos, hizo que únicamente se reclutara una paciente que cumplieran los criterios de inclusión a lo largo del estudio.

Para estudiar la expresión génica relativa de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en VI humano sano, se adquirió ARN *poli-A* purificado de VI de 15 sujetos caucásicos control, de edad entre los 22 y 59 años, fallecidos por traumatismo (*Human Heart, Ventricle (left) Poly A+ RNA*, ref. 636173, Clontech Laboratories).

1.3.3 Obtención y procesado de muestras

1.3.3.1 Biopsias de ventrículo izquierdo

Durante la intervención quirúrgica, mediante biopsia peroperatoria, se obtuvieron 2 muestras de PL a media distancia entre la arteria descendente anterior y la arteria circunfleja, previo a la entrada del paciente en bomba de circulación extracorpórea; y 2 muestras de miocardio del SI en su porción basal, tras la entrada. Las muestras fueron extraídas mediante una aguja para biopsia Tru-Cut® de 14 G x 15 cm (ref. 2N2704X, CareFusion), obteniendo muestras cilíndricas de 12 mm de longitud y 1,6 mm de diámetro de media. En el caso de un paciente se obtuvo una tercera muestra de SI para la determinación de la expresión proteica de la isoenzima $PLC\beta_4$ en VI humano.

La finalidad de cada muestra determinó las condiciones de recogida y procesamiento de las mismas: una muestra de PL y de SI se fijaron inmediatamente

en formaldehído al 4% (Histofix®, ref. 256462, Panreac) para incluirlas después en parafina; y el otro par (PL y SI), se sumergió en el agente estabilizador RNA $later$ ® (ref. AM7020, Ambion, Life Technologies) y se incubó durante 24 h a 4 °C, tras lo cual se retiró del estabilizador y se almacenó a -80 °C, para su posterior extracción de ARN. La muestra de SI para el estudio proteómico se guardó directamente a -80 °C.

1.3.3.2 Muestras sanguíneas

A lo largo de la coronariografía se obtuvieron muestras de sangre de SC y sangre periférica de vena antecubital (SP) de los pacientes seleccionados. Se obtuvieron 8,5 mL de sangre en un tubo de extracción para la obtención de suero (SST™ II Advance, ref. 367953, BD Vacutainer®), y 10 mL en un tubo de extracción con K₂ EDTA para la obtención de plasma (K₂ EDTA, ref. 367525, BD Vacutainer®) de cada localización de extracción. Tras la extracción se transportaron en hielo hasta el Instituto de Investigación Biodonostia, donde las muestras se centrifugaron a 1258 x g (2500 rpm) y a 4 °C durante 20 minutos. Tanto las alícuotas de suero como las de plasma se conservaron a -80 °C.

Por otro lado, como muestra control para el estudio correspondiente a la caracterización de la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en humano, se obtuvieron 2 mL de sangre periférica de vena antecubital de un varón sano de 33 años que aceptó participar en el estudio.

2. Análisis de la expresión de proteínas

2.1 Obtención de extractos proteicos

La extracción de proteínas se realizó de las biopsias de VI de rata, ratón y humano, del cerebelo de ratón y de las células en cultivo.

2.1.1 Extracción de proteínas de biopsias de ventrículo izquierdo y de cerebelo de ratón

Las biopsias de VI humano, rata y ratón y el cerebelo de ratón se descongelaron, se pesaron y se incluyeron en 20 volúmenes del tampón Tris-EGTA a 4 °C (**Anexo 1, apartado A**). Tras varios lavados con suero fisiológico, las muestras se homogenizaron a velocidad máxima durante 30 segundos (Ultra-Turrax® T18) hasta la total disgregación del tejido. Proceso que se mantuvo en todo momento a 4 °C. A continuación, con el objetivo de obtener el extracto crudo de membranas del tejido cardíaco, los homogenizados se centrifugaron a 40000 x g durante 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en Tris-EGTA a 4 °C. Tras lo cual, las muestras se rehomogenizaron, se alicuotaron y se volvieron a centrifugar,

descartando el sobrenadante. Una alícuota se destinó a la determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford (ver apartado 2.1.3 *Cuantificación de proteínas por el método Bradford*). Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

2.1.2 Extracción de proteínas de cardiomiocitos HL-1 en cultivo

El día anterior al procedimiento de extracción de proteínas, se sembraron 10^6 células por pocillo en placas de 6 pocillos (ref. 3506, Costar®) con medio Claycomb suplementado con NA. Transcurridas 24 h, se aspiró el medio de los pocillos mediante la bomba de vacío, se procedió a realización de tres lavados con DPBS 1X, y se añadieron 200 μ L de tampón RIPA a 4 °C por pocillo. Los cardiomiocitos se incubaron en este medio en un agitador durante 15 minutos a 4 °C, hasta comprobar la lisis celular. Posteriormente, mediante un cepillo (Nunc™ Cell Scraper, ref. 179693, Thermo Scientific) y con la ayuda de una micropipeta la solución se transfirió a micro tubos de 1,5 mL (Micro tube 1.5 mL, ref. 72.690.001, Sarstedt). Por último, se centrifugaron a 18000 x g durante 5 minutos a 4 °C, recogándose el sobrenadante. Una alícuota se destinó a la determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

2.1.3 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

En primer lugar, se procedió a la preparación de la solución stock de albúmina de suero bovino (BSA), a partir de la cual se preparó una curva patrón (0,031 mg/mL - 2 mg/mL). En segundo lugar, se recogieron 10 μ L de cada alícuota y se diluyeron (1:15) con Tris-HCl 250 mM. A continuación, de dichas soluciones se recogieron 20 μ L y se les añadió 1 mL de reactivo Bradford. Como blanco se utilizó la dilución de 20 μ L Tris-HCl y 1 mL de reactivo Bradford. Tras 10 minutos, se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Gene Quant Pro (Amersham Biosciences).

Los resultados de las absorbancias obtenidas en la curva patrón de BSA se analizaron mediante análisis no-lineal en el programa GraphPad Prism v5.01, procediéndose a la interpolación de las absorbancias de las muestras. Las concentraciones finales se obtuvieron tras la corrección con el factor de dilución (1:15).

2.2. Análisis de proteínas

2.2.1 Western Blot

El ensayo de inmunodetección o *Western Blot* permite la detección de proteínas previamente separadas por peso molecular en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida)-SDS y transferidas a una membrana mediante un anticuerpo específico.

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida-SDS de 1,5 mm de grosor a una concentración de acrilamida del 10% en tampón de electroforesis 1X. Las muestras de extracto crudo de membranas de cerebelo de ratón y ventrículo izquierdo se disolvieron en 200 μ L de PBS 1X con la ayuda de una jeringa de insulina de 1 mL. Para la determinación de las proteínas, tanto el homogenado de tejido cardíaco y de cerebelo, como el lisado de cardiomiocitos, se mezclaron con tampón de muestra 2X a una concentración final 1X. A continuación, se procedió a calentar las muestras a 100 °C durante 5 minutos para su desnaturalización y a cargarlos en los geles (20 μ g del homogenado de tejido cardíaco y de cerebelo en la determinación proteica de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco; y 100 μ g del lisado de cardiomiocitos y del homogenado de cerebelo en la determinación proteica de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1). Las muestras migraron en un equipo Mini-PROTEAN® 3 Cell (BioRad) durante 2 h a 120 V. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador comercial Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (ref. 161-0375, BioRad).

Una vez migradas las proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (ref. GE10600117, Amersham Pharmacia) durante 1 hora a 90 V a 4 °C en tampón de transferencia 1X en el equipo Mini Trans-Blot® Cell de Bio-Rad. Con objeto de evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, las membranas se bloquearon en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación continua. Se procedió a continuación a incubar las membranas durante 2 h en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal de conejo anti-PLC β_4 (ref. SC-404, Santa Cruz Biotechnology) diluido en solución de bloqueo (1:400). El exceso de anticuerpo primario se eliminó con 3 lavados de 10 minutos en solución TBS-Tween 20 y fueron de nuevo incubados durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (conjugado a peroxidasa de rábano, Sigma Chemicals) diluido en solución de bloqueo (1:1000). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos en solución TBS-Tween 20.

Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante el agente quimiluminiscente ECL PLUS Western Blotting Detection Reagents (ref. RPN2106, Amersham Pharmacia) y analizadas con la ayuda de analizador de imágenes ChemiDoc™ XRS System (Bio-Rad). Para confirmar la identidad de la banda visualizada se procedió a bloquear la señal con un péptido bloqueador específico para el anticuerpo anti-PLC β_4 (Santa Cruz Biotechnology), y como control positivo se utilizó cerebelo de ratón.

2.2.2 Inmunofluorescencia

Se cultivaron 4×10^4 cardiomiocitos HL-1 sobre cubreobjetos circulares de 12 mm (ref. 0111520, Marienfeld) pretratados durante toda la noche con gelatina/fibronectina a 37 °C, en condiciones de cultivo habituales (placa de 24 pocillos, Costar®, ref. 3526). Tras 24 h, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células 3 veces con DPBS 1X. A continuación, se procedió a fijar las células con paraformaldehído 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron con DBPS 1X y se bloquearon en solución de bloqueo durante 10 minutos. Posteriormente los cardiomiocitos fijados y prebloqueados se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-PLC β_4 (ref. SC-404, Santa Cruz Biotechnology) diluido en solución de bloqueo (dilución 1:50) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras varios lavados con DPBS 1X, se volvieron a incubar con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor®594 (ref. A11037, Life Technologies) durante 1 h a temperatura ambiente, protegiéndolos siempre de la luz. Las células se lavaron de nuevo 3 veces con DPBS 1X, se tiñeron con solución DAPI durante 1 minuto y se volvieron a lavar 5 veces con DPBS 1X. Por último, se montaron en portas de cristal sobre una gota de medio de montaje (Prolong® Gold Antifade Mountant, ref. P36930, Life Technologies), y se dejaron secar toda la noche a oscuras.

Con el objetivo de comprobar la especificidad de la detección se realizaron ensayos de reactividad cruzada, y como control positivo de la técnica se utilizó la detección de miosina (MYH) con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-MYH (ref. sc-376157, Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado al fluoróforo Alexa Fluor®488 (ref. A11029, Life Technologies).

Para observar las células inmunomarcadas se utilizó un microscopio invertido Nikon Eclipse 80i (Nikon), que permitió la captura de imágenes en contraste de fases y de inmunofluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas con el software Nis-Elements AR v3.0 (Nikon).

Para definir la localización subcelular exacta de la isoenzima PLC β_4 fue necesario el empleo de microscopía con láser confocal. Para ello se contó con la ayuda de los técnicos del Centro de Investigación en medicina regenerativa INBIOMED y se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM Meta510 (Carl Zeiss) con objetivos de aceite de inmersión.

3. Análisis de la expresión génica

3.1 Aislamiento de ARN

Para la cuantificación de los transcritos de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ se extrajeron ARN total de ventrículo izquierdo, de sangre de ratón, de sangre humana y de células en cultivo.

Tanto la extracción de ARN total a partir del tejido muscular del VI de rata, ratón y humano, como de la sangre de ratón y de humano, y de cultivos celulares se realizó con el kit RNeasy Mini Kit (ref. 47104, Qiagen). Como indican las instrucciones del fabricante, el método de lisis y de homogenización de las muestras fue diferente según el tejido, posteriormente, todos siguieron el mismo protocolo (**Figura 26**).

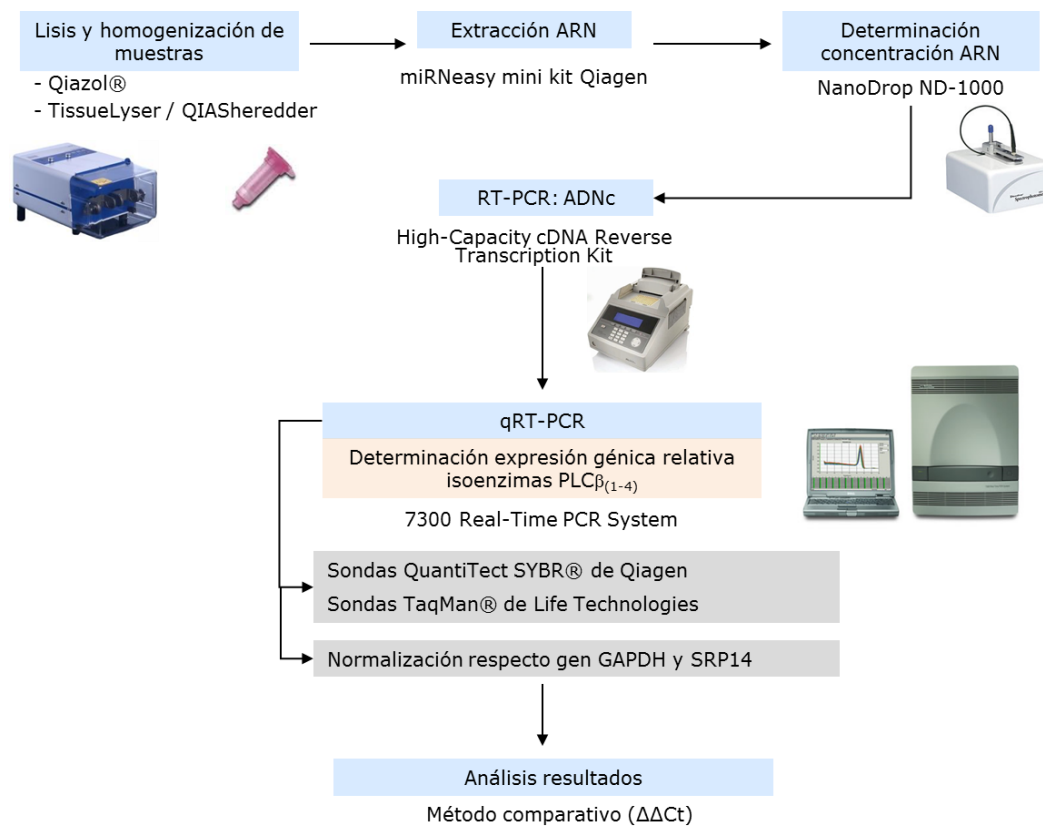


Figura 26: Esquema representativo del procedimiento para el análisis de la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$.

3.1.1 Extracción de ARN de músculo cardíaco

Las biopsias de VI de rata, ratón y humano se introdujeron en 700 μ L de QIAzol Lysis Reagent (ref. 79306, Qiagen) a 4 °C y se homogeneizaron mecánicamente con una bola de acero en el equipo TissueLyser (Qiagen). Las

muestras se homogeneizaron durante 2 minutos a 20 Hz, y se volvieron a homogenizar hasta la total disgregación del tejido. Después, los homogenizados se transfirieron a tubos libres de ARNasas nuevos para separarlos de las bolas de acero y se prosiguió con el protocolo general, manteniéndose las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras añadir 140 µL de cloroformo se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. Una vez reposados 2-3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió sin tocar la interfase a tubos nuevos. Posteriormente, se añadió 1,5 volúmenes de etanol y se traspasó a columnas RNeasy mini spin para proseguir con varias centrifugaciones como indican las instrucciones del fabricante. Para finalizar, el ARN se eluyó con 30 µL de agua libre de ARNasas, se cuantificó su concentración y se almacenó a -20 °C.

3.1.2 Extracción de ARN de sangre de ratón y sangre humana

Para la extracción de ARN total de sangre de ratón y sangre humana, se añadieron 5 volúmenes del tampón indicado por el fabricante a la muestra de sangre y se incubó 15 minutos a 4 °C. Seguidamente, se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos a 4 °C y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en el mismo tampón. Tras repetir el ciclo de centrifugación anterior y eliminar el sobrenadante, se añadieron 700 µL de QIAzol Lysis Reagent, se homogenizó, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se prosiguió con el protocolo general descrito brevemente en el punto anterior.

3.1.3 Extracción de ARN de células en cultivo

La extracción de ARN total de cardiomiocitos murinos HL-1 se realizó a partir del *pellet* celular obtenido de la manera que se indica en el punto 1.2.1.3 *Condiciones de cultivo de cardiomiocitos HL-1 con estimuladores hipertróficos* del apartado *Material y métodos* de este manuscrito.

Para la homogeneización del lisado celular se utilizaron las columnas QIAshredder (ref. 79654, Qiagen). Se añadieron 700 µL de QIAzol Lysis Reagent al *pellet*, se homogenizaron y se transfirieron a las columnas QIAshredder, centrifugándose a máxima velocidad durante 2 minutos. Posteriormente, se recogió el volumen recolectado en el colector y se transfirió a tubos nuevos libres de ARNasas. Tras mantenerlos a temperatura ambiente durante 5 minutos se prosiguió con el protocolo general descrito anteriormente.

3.2 Determinación de la concentración de ARN

La concentración de ARN se midió a partir de 1 µL de la solución de ácidos nucleicos en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

La pureza de los ácidos nucleicos, en concreto la presencia de proteínas contaminantes en la solución, se evaluó a través de la relación de absorbancia obtenida a 260 y a 280 nm. Los ácidos nucleicos con un ratio de absorbancia A260/A280 de 1,8-2,0 se consideraron óptimos para el ensayo.

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR): generación del ADNc

Para la síntesis de ADNc empleando cebadores aleatorios se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ref. 4374966, Life Technologies). 1 µg de ARN se retrotranscribió en un volumen final de 10 µL en presencia de tampón RT a una concentración final 1X, 1 mM de cada dNTP, 1 µL de cebadores aleatorios a 10X, 1 U/µL de inhibidor de ARNasas y 2,5 U/µL de transcriptasa reversa Multiscribe™. El programa para la retrotranscripción consistió en 10 minutos a 25 °C, seguidos de 2 h a 37 °C y 5 minutos a 85 °C. El proceso se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Life Technologies). El ADNc recién sintetizado se mantuvo a 4 °C y se almacenó a -20 °C.

3.4 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para el estudio del nivel de expresión génica de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ por qRT-PCR, por una parte, se utilizaron sondas prediseñadas QuantiTect SYBR® de Qiagen en muestras de VI de rata y ratón, de sangre de ratón y de cardiomiocitos HL-1; mientras que para el estudio de muestras humanas, se utilizaron sondas prediseñadas TaqMan® de Life Technologies (**Tabla 1**). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante y los ensayos se llevaron a cabo en el equipo 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies).

Para la cuantificación relativa de la expresión de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ en VI de rata y ratón, en sangre de ratón, y en cardiomiocitos HL-1, en cada amplificación de PCR se utilizaron 50 ng de ADNc (basándonos en la concentración de ARN anterior a la RT-PCR), *Power SYBR® Green PCR Master Mix* al 1X (ref. 4367659, Life Technologies) y la sonda QuantiTect SYBR® (Qiagen) de interés al 1X. El volumen final fue de 24 µL en placas de 96 pocillos.

En el caso de la expresión de las isoenzimas en VI humano y sangre humana, en cada amplificación de PCR se utilizaron 50 ng de ADNc (basándonos en la concentración de ARN anterior a la RT-PCR), TaqMan® Gene Expression Master Mix al 1X (ref. 4304437, Life Technologies) y la sonda TaqMan® de interés al 1X. El volumen final fue de 10 µL en placas de 96 pocillos.

En todos los ensayos cada muestra se analizó por triplicado y el programa de amplificación utilizado fue: (i) 2 minutos a 50 °C; (ii) 10 minutos a 95 °C; (iii) 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y (iv) 1 minuto a 60 °C.

Tabla 1. Sondas prediseñadas utilizadas en este estudio.

Gen	Referencia de la sonda	Tránsito detectado	Especie	Tipo
PLC β ₁	QT01685537	XM_001081270	Rata	SYBR®
PLC β ₂	QT00188062	NM_053478	Rata	SYBR®
PLC β ₃	QT01620563	NM_033350	Rata	SYBR®
PLC β ₄	QT00175266	NM_024353	Rata	SYBR®
GAPDH	QT00199633	NM_017008	Rata	SYBR®
PLC β ₁	QT00173817	NM_001145830	Ratón	SYBR®
PLC β ₂	QT01052324	NM_177568	Ratón	SYBR®
PLC β ₃	QT00155274	NM_008874	Ratón	SYBR®
PLC β ₄	QT00117621	NM_013829	Ratón	SYBR®
GAPDH	QT00309099	NM_001001303	Ratón	SYBR®
PLC β ₁	Hs00248563_m1	NM_015192.3 NM_182734.2	Humano	TaqMan®
PLC β ₂	Hs01080542_m1	NM_004573.2	Humano	TaqMan®
PLC β ₃	Hs00184504_m1	NM_000932.2	Humano	TaqMan®
PLC β ₄	Hs00168656_m1	NM_000933.3 NM_182797.2 NM_001172646.1	Humano	TaqMan®
GAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.4	Humano	TaqMan®
SRP14	Hs03055045_g1	NM_003134.4	Humano	TaqMan®

PLC β : fosfolipasa C β ; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; SRP14: partícula de reconocimiento de señal 14 kDa.

La cuantificación relativa de los genes diana se determinó mediante el método comparativo ($\Delta\Delta C_t$). El ciclo C_t es un ciclo en el que se alcanza un nivel de fluorescencia preestablecido. Al valor medio C_t de cada gen a testar de cada muestra, se le resta el valor medio C_t del gen endógeno (ΔC_t). Posteriormente, los valores ΔC_t de diferentes muestras se comparan con el valor ΔC_t de la muestra calibradora ($\Delta\Delta C_t$). Al valor $\Delta\Delta C_t$ de la muestra calibradora se le da un valor arbitrario de 1 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), y así, el resto de las muestras obtienen un valor relativo al calibrador. Como gen de referencia suele utilizarse un gen endógeno con un nivel de expresión constante en las distintas muestras que permita corregir diferencias en la cantidad de ARN de partida. Los genes endógenos utilizados en este trabajo fueron GAPDH y SRP14. Como el gen GAPDH mostró la expresión más estable entre las diferentes muestras, se seleccionó como endógeno.

Las muestras de sangre de ratón y de sangre humana se utilizaron como control positivo de la expresión de la isoenzima PLC β_2 , ya que esta isoenzima se expresa abundantemente en células de origen hematopoyético (Lee y cols., 1996).

4. Estudio histomorfológico

Para la evaluación histomorfológica del VI de pacientes con EAo severa, una biopsia de PL y otra del SI de cada paciente fueron inmediatamente fijadas en formaldehído al 4%. Transcurridas 6 h, las muestras se procesaron y se incluyeron en bloques de parafina en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Donostia. La **Figura 27** muestra un esquema representativo del proceso seguido por las muestras. Después, se realizaron cortes seriados de 4 μ m de grosor de cada una de las muestras con el micrótopo Leitz 1512 (Leica) y se dejaron secar durante 40 minutos a 60 °C para proseguir posteriormente con las tinciones para la determinación del diámetro cardiomiocitario y la cuantificación del colágeno fibrilar.

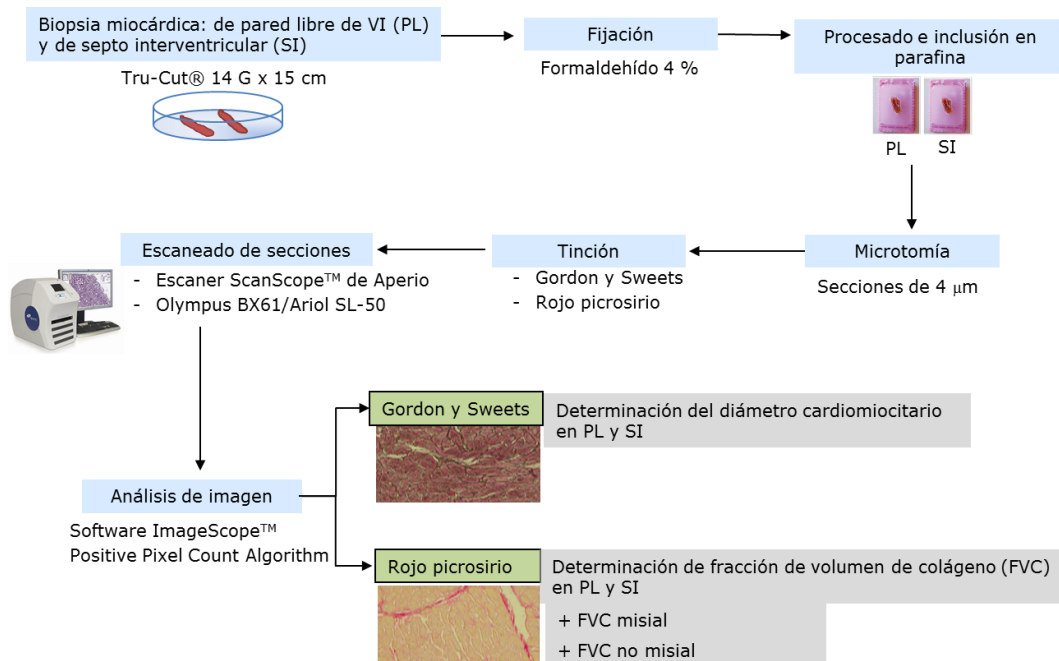


Figura 27: Esquema representativo del proceso seguido por las muestras miocárdicas para el estudio histomorfológico.

4.1 Cuantificación del diámetro cardiomiocitario

El diámetro de los cardiomiocitos se cuantificó en secciones de 4 μ m del miocardio de PL y de SI de los 18 pacientes con EAo severa. Para ello, se procedió a la

tinción Gordon y Sweets (Gordon y Sweets, 1936), técnica que permite visualizar la reticulina de color negro, mostrando el tamaño cardiomiocitario. Todas las muestras fueron digitalizadas con el escáner ScanScope™ de Aperio (Leica Biosystems) y el análisis se realizó mediante el software ImageScope™. El diámetro cardiomiocitario se determinó como la media de 80 mediciones del diámetro más corto de cardiomiocitos seccionados transversalmente (**Figura 28**).

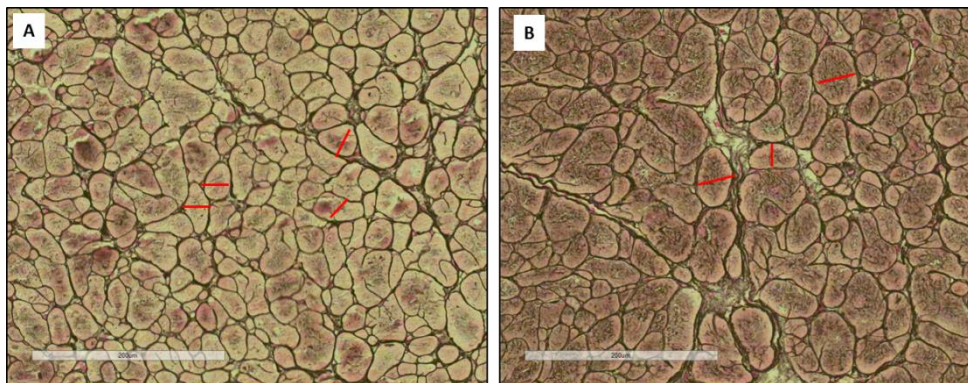


Figura 28: Tinción Gordon y Sweets para la reticulina. La membrana de los cardiomiocitos se tiñe de negro mostrando el tamaño cardiomiocitario. **A.** Imagen representativa de PL. **B.** Imagen representativa de SI. Barra de calibración: 200 μm .

4.2 Determinación del colágeno fibrilar

4.2.1 Determinación de la fracción de volumen de colágeno

La fracción de volumen de colágeno (FVC) se determinó en secciones de miocardio de PL y de SI de 4 μm teñidas con el colorante específico para colágeno (Rojo Picosirio F3BA) de acuerdo con Dolber y Spach (1987) (**Figura 29**). Las tinciones se realizaron en 3 secciones por cada región del VI estudiado y por paciente. Las muestras de los 18 pacientes con EAo fueron digitalizadas con un microscopio automatizado (Olympus BX61, Genetix Ltd) y el análisis se realizó mediante morfometría cuantitativa con el algoritmo *Positive Pixel Count Algorithm* del sistema de análisis de imagen automatizado Imagescope (Aperio Technologies). La umbralización interactiva de las imágenes por saturación de intensidad permitió segmentar las áreas teñidas correspondientes al colágeno del resto del tejido cardíaco. La FVC se calculó como el área de colágeno total dividido por la suma entre el área de colágeno y el del tejido muscular en cada sección. Cada muestra se analizó por triplicado y por dos observadores de forma independiente, cuando el coeficiente de variación interobservador superaba el 12,5% la muestra se volvió a analizar.

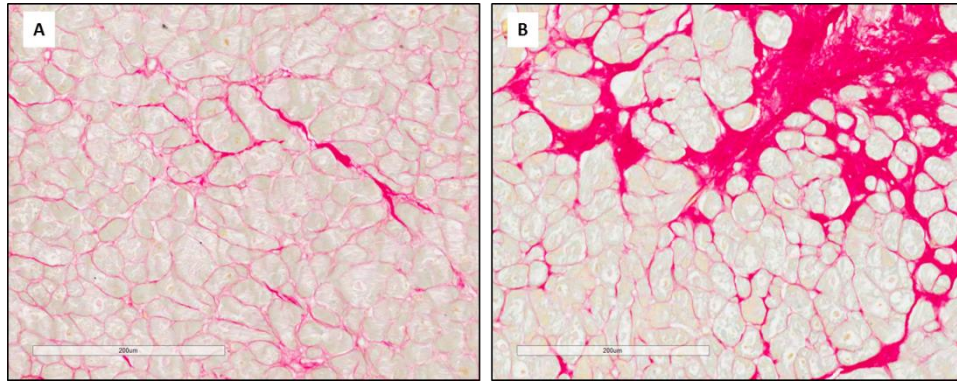


Figura 29: Tinción rojo picrosirio para el colágeno. Imágenes representativas de la distribución del colágeno fibrilar de pacientes con EAo. **A.** Imagen representativa de PL de VI. **B.** Imagen representativa de SI. Barra de calibración: 200 μm .

4.2.2 Determinación de la distribución del colágeno fibrilar

Según la localización del depósito de colágeno en el miocardio se definieron y cuantificaron dos patrones:

- **depósito misial**, colágeno asociado con grupos de células (perimisio) y aquel que rodea e interconecta células individuales (endomisio).
- **depósito no misial**, colágeno localizado rodeando los vasos intramiocárdicos (perivascular) y depósitos de colágeno desorganizados no relacionados con las fibras musculares (cicatricial).

Se calculó de forma automatizada la FVC total y misial. El depósito de colágeno no misial se derivó como la diferencia entre la FVC total y la misial (**Figura 30**).

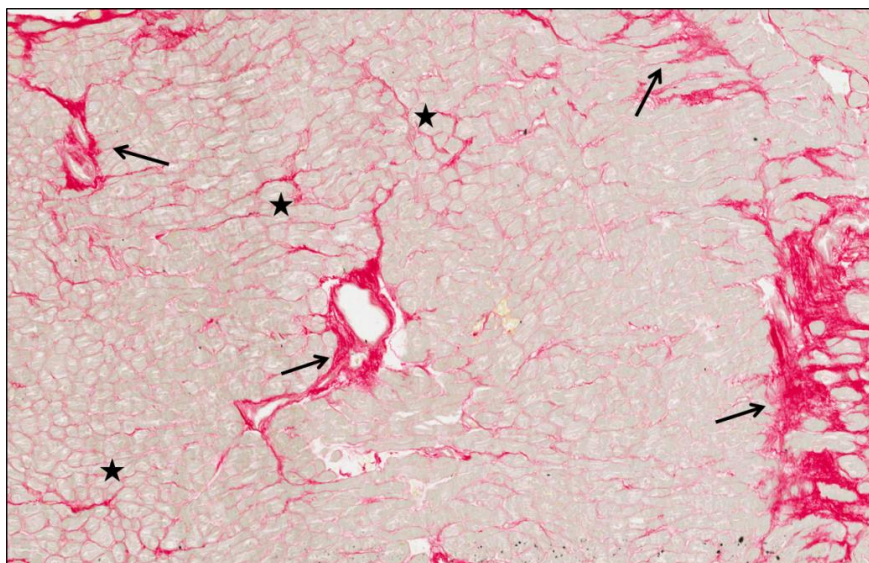


Figura 30: Imágen descriptiva de la determinación de la distribución del colágeno fibrilar en un paciente con EAo. Las estrellan muestran el depósito misial y las flechas el no misial, tanto la fibrosis perivascular como la cicatricial.

5. Estudio bioquímico

Para determinar los distintos parámetros séricos se extrajeron muestras de sangre de los 18 pacientes con EAO, tanto de la vena antecubital como de seno coronario, de manera que se indica en el punto 1.3.3.2 *Muestras sanguíneas* del apartado *Material y métodos* de este manuscrito. Para la determinación de todos los marcadores se siguieron las instrucciones del fabricante y la lectura de las absorbancias se determinaron en lector de placas Multiskan Ascent de Thermo Scientific. Las determinaciones se efectuaron simultáneamente para todos los pacientes.

5.1 Determinación de las concentraciones en sangre de angiotensina II y noradrenalina

5.1.1 Angiotensina II

La concentración sérica de AT II se determinó mediante técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), tanto en suero de SC como de SP, con el ensayo comercial ELISA Kit for Angiotensin II (ref. CEA005HU, USCN Life Sciences). El límite inferior de detección fue de 8,85 pg/mL.

5.1.2 Noradrenalina

La concentración sérica de NA se determinó mediante ELISA tanto en suero de SC como en suero de SP. El ensayo comercial utilizado para la detección fue ELISA Kit for Noradrenaline (ref. E90907Ge, USCN Life Sciences). El límite inferior de detección fue de 23,5 pg/mL.

5.2 Determinación de las concentraciones en sangre de los marcadores bioquímicos del metabolismo del colágeno

5.2.1 Metaloproteinasa de matriz tipo I

La concentración sérica de la MMP-1 se determinó mediante ELISA en suero de SC con el ensayo comercial ELISA Kit for Matrix Metalloproteinase 1 (ref. SEA097Hu, USCN Life Sciences). El límite inferior de detección fue de 5,9 pg/mL.

5.2.2 Inhibidor de la metaloproteinasa de matriz tipo I

La concentración sérica del TIMP-1 se determinó mediante ELISA en suero de SC. El ensayo comercial utilizado para la detección fue el TIMP-1 Human Biotrak assay (ref. RPN2611, GE Healthcare Life Sciences). El límite inferior de detección fue de 1,25 ng/mL.

5.2.5 Cociente metaloproteinasa de matriz tipo I y su inhibidor (MMP-1:TIMP1)

El balance entre la MMP-1 y su inhibidor se determinó dividiendo la concentración sérica de MMP-1 por la de TIMP1 para cada paciente estudiado. El cociente se utilizó como un indicador indirecto de la actividad proteásica.

5.3 Determinación de la concentración en sangre del propéptido N-terminal del péptido natriurético cerebral

El propéptido N-terminal del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP, de *N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*) se determinó en plasma de SP en el Laboratorio central del Hospital Universitario Donostia mediante ELISA (Biomedica Gruppe). Valores plasmáticos superiores a 125 pg/mL se consideran indicativos de la insuficiencia cardíaca crónica (McMurray y cols., 2012).

6. Estudios clínicos

6.1 Variables estudiadas

Tabla 2. Variables determinadas a los pacientes con EAo.

Variables	Parámetros
Demográficas	Edad (años) Sexo (H/M) Talla (m) Superficie corporal (m ²) Índice de masa corporal (IMC) (kg/m ²)
Clínicas	Presión arterial sistólica (PAS) (mmHg) Presión arterial diastólica (PAD) (mmHg) Hipertensión arterial (HTA) (No/Sí) Clase funcional NYHA Medicación: IECAs, ARA-II, β -bloqueantes
Morfológicas	Grosor parietal relativo (GPR) Índice masa ventricular izquierda (IMVI) (g/m ²) HVI (No/Sí) Índice área valvular aórtica (IAVAo) (cm ² /m ²)
Función sistólica	FE-Simpson (%) Media de desplazamiento anillo mitral (MDAM) (mm) Fracción de acortamiento mesoparietal (MWFS) (%)
Función diastólica	Onda E (m/s) Onda A (m/s) Relación E/A e' promedio (cm/s) E/e' promedio

EAo: estenosis aórtica severa; NYHA: clasificación de la New York Heart Association; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina;

ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; FE: fracción de eyección.

En cada paciente se determinaron variables demográficas, clínicas y ecocardiográficas para determinar las características generales, la morfología, la función sistólica y la función diastólica ventricular (**Tabla 2**).

6.2 Estudio de variables demográficas y clínicas

A todos los pacientes con EAo severa que cumplieron los criterios de inclusión se les citó con un cardiólogo para una entrevista personal en una consulta hospitalaria, donde se comprobaron y completaron algunas variables obtenidas de los registros hospitalarios.

De esta manera, de cada paciente se recogieron variables clínicas como la edad (años), el sexo (hombre o mujer), la talla (m), la superficie corporal (SCp) (m²) y el índice de masa corporal (IMC) (kg/m²). La superficie corporal se calculó mediante la fórmula descrita por Du Bois y Du Bois (1916) y el índice de masa corporal a través de la fórmula de Quetelet (IMC = peso/talla²).

Simultáneamente, se determinaron variables clínicas como la presión arterial sistólica (PAS) (mmHg), la presión arterial diastólica (PAD) (mmHg), si el paciente era hipertenso o no (HTA no/sí), la clase funcional de la *New York Heart Association* (NYHA) para la disnea y el tratamiento farmacológico habitual (si tomaban inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores de la AT II (ARA-II) o β -bloqueantes (β -bloqs)). La PAS y PAD se determinaron inmediatamente antes de la realización del estudio ecocardiográfico con el paciente sentado usando para ello un esfigmomanómetro de mercurio. Se consideró HTA cuando la PAS/PAD \geq 140/90 mmHg en tres tomas separadas. La clasificación NYHA se determinó según el síntoma de la disnea, clase I (paciente sin síntomas), clase II (paciente con ligera limitación a la actividad física habitual), clase III (paciente con marcada limitación a la actividad física habitual, solo asintomático en reposo) y clase IV (paciente con síntomas severos incluso en reposo).

6.3 Estudio ecocardiográfico

A todos los pacientes con diagnóstico clínico de EAo severa reclutados e incluidos en el presente estudio de investigación se les realizó un estudio ecocardiográfico 2D-doppler utilizando el modelo Philips SONOS 5500, en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Donostia. El estudio ecocardiográfico fue realizado y consensuado por dos ecocardiografistas expertos.

Este estudio permitió recopilar de cada paciente variables indicativas de la morfología cardíaca, de la función ventricular sistólica y la función ventricular diastólica.

6.3.1 Morfología

- El grosor parietal relativo (GPR) es la relación que existe entre el grosor de la pared del VI y su diámetro. Se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{GPR} = 2 \times \text{PPd}/\text{DTD}$$

Donde PP es el grosor de la pared posterior en diástole y DTD es el diámetro telediastólico. A menor valor, mayor es la dilatación relativa al grosor de la pared del VI (hipertrofia excéntrica). Un valor alto es indicativo de que el grosor de la pared es anormalmente alto para el tamaño del VI (hipertrofia concéntrica).

- El índice de masa ventricular izquierda (IMVI) es la cantidad de masa ventricular total del VI en relación con la superficie corporal de la persona. La masa ventricular izquierda se calculó utilizando la fórmula de Devereux (Lang y cols., 2015):

$$\text{MVI} = 0,8 \times \{1,04[\text{DTD} + \text{PPd} + \text{PSd}]^3 - (\text{DTD})^3\} + 0,6 \text{ g}$$

Donde DTD es el diámetro telediastólico, PPd es el grosor de la pared posterior en diástole y PSd es el grosor de la pared del septo en diástole.

Y el IMVI se obtuvo dividiendo la masa ventricular izquierda entre la superficie corporal:

$$\text{IMVI} = \text{MVI}/\text{SCp}$$

Donde MVI es la masa ventricular izquierda y el SCp es la superficie corporal.

- La HVI se determinó cuando el IMVI era superior a 115 g/m² en hombres y superior a 95 g/m² en mujeres (Lang y cols., 2015).

- El índice de área valvular aórtica (IAVAo) es el área de apertura de la válvula aórtica en relación la superficie corporal. Cuanto menor es el IAVAo indexado más severa es la estenosis, de manera que indicará la severidad de la enfermedad valvular. Valores IAVAo inferiores a 0,6 cm²/m² serán indicativos de estenosis aórtica severa (Jander y cols., 2014).

El área valvular aórtica (AVAo) se calculó mediante la Ecuación de Continuidad:

$$\text{AVAo} = (\text{área TSVI} \times \text{VTI TSVI}) / \text{VTI Ao}$$

Donde área TSVI es el área del tracto de salida de VI (calculado como $\pi \times r^2$), VTI TSVI es la integral velocidad-tiempo del flujo sistólico a nivel de tracto de salida del VI, y VTI Ao es la integral velocidad-tiempo del flujo transvalvular sistólico aórtico.

El IAVAo:

$$\text{IAVAo} = \text{AVAo}/\text{SCp}$$

6.3.2 Índices de función ventricular sistólica

- La fracción de eyección (FE) es la proporción de sangre que se expulsa en cada latido en relación al volumen total del ventrículo en telediástole. Es un índice de la fuerza de contracción del corazón y, por tanto, de función sistólica.

$$\text{FE} = \frac{\text{VTD} - \text{VTS}}{\text{VTD}} \times 100$$

Donde VTD es el volumen telediastólico y VTS es el volumen telesistólico. Concretamente, en el presente estudio, la FE se determinó mediante el método Simpson (Lang y cols., 2015).

- La media del desplazamiento sistólico anterior del anillo mitral (MDAM) hace referencia al desplazamiento del anillo mitral hacia el ventrículo izquierdo en la sístole y es una medida de la función sistólica longitudinal global. Se obtuvo al realizar la media de los valores de desplazamiento del anillo mitral obtenidos en la zona septal y en la zona lateral (Herrmann y cols., 2011).

- La fracción de acortamiento mesoparietal (MWFS, de *midwall fractional shortening*) es una medida de la función sistólica que analiza el acortamiento de la zona intermedia de la pared ventricular durante la sístole. Se considera un mejor índice de contractilidad del ventrículo izquierdo que la FE porque ésta magnifica su valor en presencia de hipertrofia parietal. Se calculó según el modelo descrito por Shimizu y cols. (1985), y modificado por de Simone y cols. (1994):

$$\text{MWFS} = \frac{[(\text{DIVId} + \text{PPd}/2) - (\text{DIVIs} + \text{PPs}/2)]}{(\text{DIVId} + \text{PPd}/2)}$$

Donde DIVId es el diámetro interior de VI en diástole, PPd es el grosor de la pared posterior en diástole, DIVIs es el diámetro interior de VI en sístole y PPs es el grosor de la pared posterior en sístole.

6.3.3 Índices de función ventricular diastólica

El flujo diastólico mitral se evaluó con el transductor en la ventana apical, en el plano de cuatro cámaras, con el volumen de muestra posicionado en el punto de máximo flujo diastólico de la válvula mitral. La función ventricular diastólica del VI se evaluó mediante las medidas Doppler más importantes:

- Onda E, es la máxima velocidad del flujo transvalvular mitral en protodiástole.
- Onda A, es la máxima velocidad del flujo transvalvular mitral en telediástole y es debida a la contracción de la aurícula izquierda que ocurre al final de la diástole.

- Relación E/A. Normalmente la onda E es mayor que la onda A, pero cuando la relajación está alterada, la E/A se reduce por debajo de 1. No obstante, cuando el VI es muy rígido (patrón restrictivo) puede que los valores de la onda E sean muy superiores.
- e' promedio, es el promedio del desplazamiento (velocidad) hacia la aurícula izquierda del anillo mitral en protodiástole. Se obtuvo al realizar la media de e' lateral y e' septal, este último medido a nivel septal.
- Relación E/ e' , es la relación entre la velocidad de llenado mitral en protodiástole y la velocidad del desplazamiento del anillo mitral en protodiástole. Se considera el parámetro más fiable para determinar de forma no invasiva la presión de llenado del VI (o PTDVI) (Tschöpe y Paulus, 2009).

10. Análisis estadístico

En primer lugar, se analizó si las variables cuantitativas continuas seguían una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk y si sus varianzas eran homogéneas a través de la prueba de Levene. Una vez comprobada la normalidad y la homocedasticidad de los resultados, aquellos que seguían una distribución normal y sus varianzas eran homogéneas se expresaron como la media \pm desviación estándar, mientras que aquellos que no cumplían estos requisitos como la mediana (rango intercuartílico).

En las determinaciones donde se compararon dos grupos independientes, el análisis se realizó mediante el t-test de Student desapareado para variables distribuidas normalmente o mediante el test de U de Mann-Whitney en caso de no alcanzarse la normalidad. En aquellos casos donde los dos grupos comparados eran dependientes, el análisis se llevó a cabo mediante el t-test de Student pareado para variables distribuidas normalmente o mediante la prueba de Wilcoxon para variables no normales.

Las comparaciones entre subgrupos se llevaron a cabo mediante el análisis de las varianzas (ANOVA) seguido del análisis post hoc de Bonferroni para variables distribuidas normalmente, en caso contrario se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

El grado y dirección de la asociación entre variables continuas distribuidas normalmente se analizó mediante la correlación de Pearson. Para ello, aquellas variables que inicialmente no cumplían el supuesto de normalidad fueron

transformadas logarítmicamente, alcanzándose en todos los casos una distribución normal. Asimismo, la influencia sobre las correlaciones que factores de confusión potenciales (edad, sexo, índice de masa corporal, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, índice masa ventricular izquierda, índice área valvular aórtica, tratamiento con IECAs, tratamiento con β -bloqueantes) pudieran estar ocasionando fue estudiada mediante el análisis de correlaciones parciales. Las tablas de resultados de las asociaciones muestran el coeficiente de Pearson (r) y el valor de probabilidad (P), las asociaciones que resultaron significativas están marcadas con asteriscos y subrayadas. Las asociaciones que siguieron siendo significativas una vez excluidos los factores de confusión están marcadas en color azul.

Para todos los análisis se estableció como significativo un valor de P menor a 0,05. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS® versión 22.0 (software SPSS®, IBM) y el sistema estadístico y gráfico GraphPad Prism® v5.0 (GraphPad software).

Resultados

Capítulo 1:

**Caracterización de la expresión de la
isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco de
mamíferos y cardiomiocitos murinos HL-1**

1. Expresión de la proteína de la isoenzima PLC β_4 en ventrículo izquierdo

Con el objetivo de caracterizar la expresión de PLC β_4 en VI de diferentes especies se realizó, en primer lugar, el estudio de su expresión proteica mediante la técnica *western blot*.

El análisis por *western blot* de la expresión de PLC β_4 realizado en membranas de VI de humano, rata y ratón reveló la presencia de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco de las especies mencionadas. La **Figura 31** muestra las bandas correspondientes a PLC β_4 detectadas tanto en VI de humano, rata y ratón. La especificidad de la señal viene determinada por la ausencia de señal en presencia del péptido bloqueador específico del anticuerpo anti-PLC β_4 utilizado. Si bien las bandas se encontraron alrededor de los 130 kDa, las cuatro presentaron diferencias en relación al peso molecular.

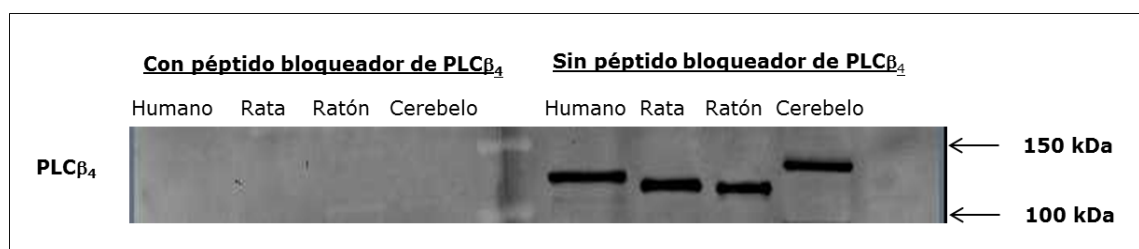


Figura 31: Representación del western blot de la isoenzima PLC β_4 en tejido cardíaco patológico humano, de rata y de ratón. La preincubación con péptido bloqueador de PLC β_4 como control de la especificidad de la señal y la expresión en cerebelo de ratón como control positivo. Experimento representativo de cuatro experimentos.

2. Patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo

Una vez confirmada la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en VI humano, de rata y ratón, se procedió al estudio del patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI de las especies mencionadas.

2.1 Ventrículo izquierdo de rata y ratón

El análisis del estudio de la expresión génica relativa de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ reveló que la PLC β_4 es la isoenzima de mayor transcripción en VI de rata y

ratón (**Figura 32**). De este modo, la expresión relativa del ARNm de PLC β_4 es 127 y 135 veces mayor respecto a PLC β_2 de ratón en las dos especies estudiadas, siendo, por tanto, de orden similar. Sin embargo, el patrón de expresión de los diferentes isoenzimas de PLC $\beta_{(1-4)}$ varía entre dichas especies. Mientras que en VI de rata el patrón de expresión obtenido fue PLC β_4 > PLC β_3 > PLC β_2 > PLC β_1 , en VI de ratón fue PLC β_4 > PLC β_1 > PLC β_3 > PLC β_2 .

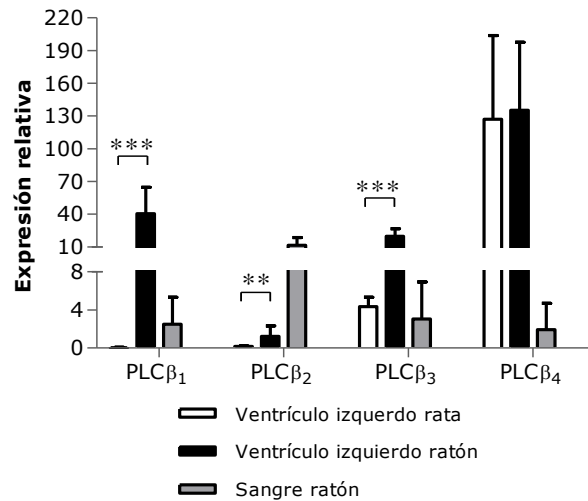


Figura 32: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de rata y ratón, y en sangre de ratón. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen GAPDH, y los datos están expresados respecto a la expresión de PLC β_2 de ventrículo izquierdo de ratón. La expresión en sangre de ratón como control positivo. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cada grupo (n=4) (**P<0,01, ***P<0,001. t-test de Student desapareado).

En este sentido es de destacar, que las diferencias en la expresión relativa de PLC β_1 y PLC β_3 en VI de rata respecto a PLC β_2 de ratón fueron de menor entidad (0,038 y 4 veces mayor) respecto a las encontradas en VI de ratón (41 y 20 veces mayor). De este modo, las diferencias encontradas en la expresión relativa de estas dos isoenzimas fueron estadísticamente significativas entre las dos especies estudiadas (t-test de Student desapareado, P<0,001).

La sangre de ratón se utilizó como control positivo para la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 , los resultados confirmaron que la expresión de la isoenzima PLC β_2 es la predominante en sangre de ratón.

2.2 Ventrículo izquierdo humano

Los resultados obtenidos revelaron que en VI humano sano la PLC β_4 es la isoenzima más expresada (**Figura 33**). El patrón de expresión obtenido de las diferentes isoenzimas de PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano control fue el siguiente: PLC β_4 > PLC β_3 > PLC β_2 > PLC β_1 . Respecto a la expresión de la isoenzima PLC β_2 , la PLC β_4 y PLC β_3 se expresaron 2,2 y 1,39 veces más, respectivamente, mientras que la isoenzima PLC β_1 0,49 veces.

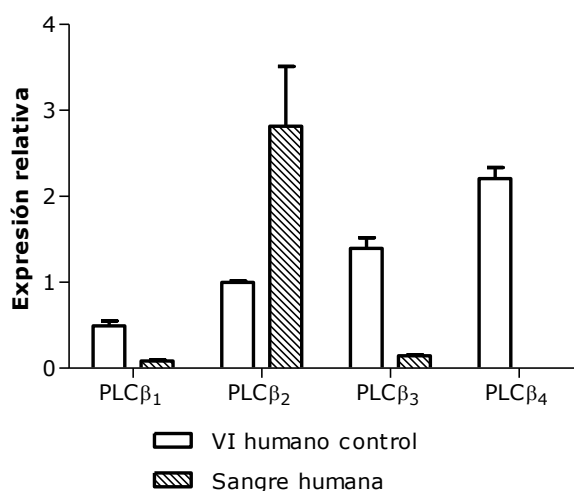


Figura 33: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano control y en sangre humana. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen GAPDH, y los datos están expresados respecto a la expresión de PLC β_2 de VI humano control. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cada grupo ($n=3$).

La sangre de un varón sano de 33 años se utilizó como control positivo para la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 , los resultados confirmaron que la expresión de la isoenzima PLC β_2 es la predominante en sangre humana.

3. Expresión de la proteína de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos murinos HL-1

El análisis por *western blot* de la expresión de PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1 permitió determinar la presencia de la isoenzima PLC β_4 en esta línea celular (**Figura 34A**), aunque la intensidad de la señal fue mucho menor a la encontrada en tejido cardíaco de las diferentes especies estudiadas.

Asimismo, se procedió a estudiar a través de ensayos de inmunofluorescencia la distribución celular de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1 (**Figura 34B**). La especificidad de la señal viene determinada por la ausencia de señal en los ensayos de reactividad cruzada.

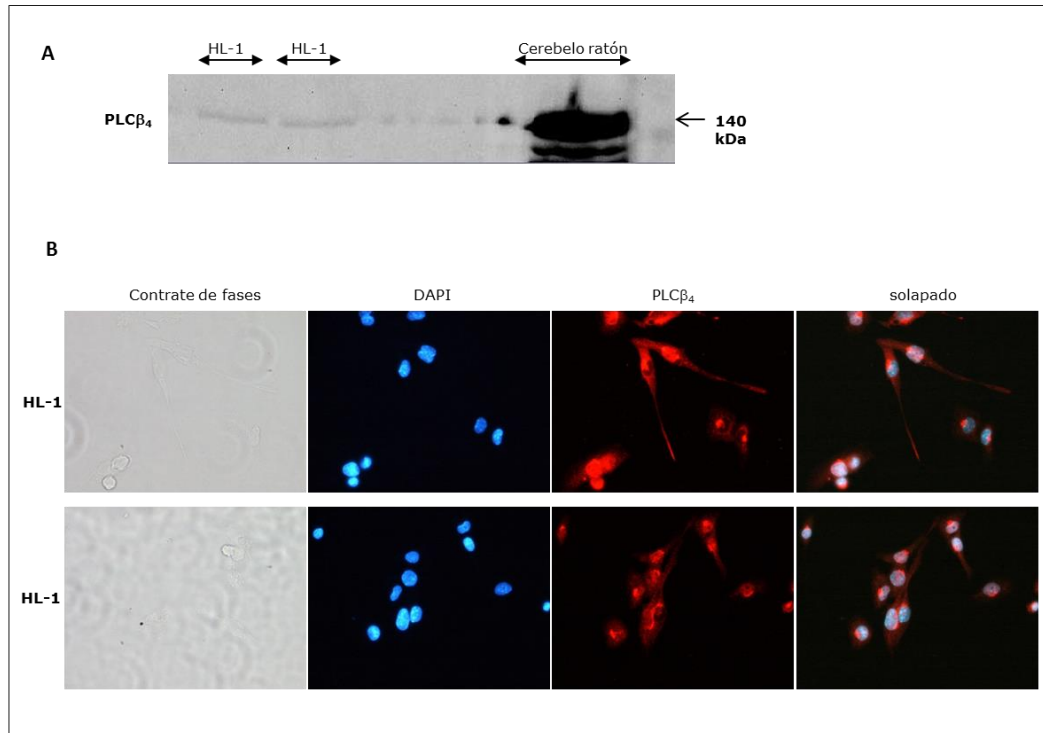


Figura 34: Caracterización de la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1. **A.** Representación del western blot de la isoenzima PLC β_4 en células HL-1. La expresión en cerebro de ratón como control positivo. Experimento representativos de cinco ensayos. **B.** Imágenes representativas del marcaje obtenido en cardiomiocitos HL-1. Imagen de contraste de fases, marcaje nuclear con DAPI (en azul), marcaje con anticuerpo primario anti-PLC β_4 y secundario anti-conejo Alexa Fluor® 594 (en rojo), e imágenes solapadas.

El estudio mediante microscopía de fluorescencia confirmó la expresión de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos murinos HL-1. El análisis mostró una distribución sarcoplásmica de la proteína, descartando su disposición en el sarcolema (**Figura 34B**). Asimismo, todas las células presentaron un cúmulo de PLC β_4 alrededor del núcleo, pero la microscopía de fluorescencia convencional no permitió determinar si las pequeñas aglomeraciones también se encontraban en el núcleo. Fue necesario el empleo de microscopía con láser confocal para definir su localización subcelular exacta. Los resultados del análisis por microscopía confocal permitieron observar los cúmulos de PLC β_4 por diferentes ángulos y posibilitaron delimitar su expresión al sarcoplasma (**Figura 35**).

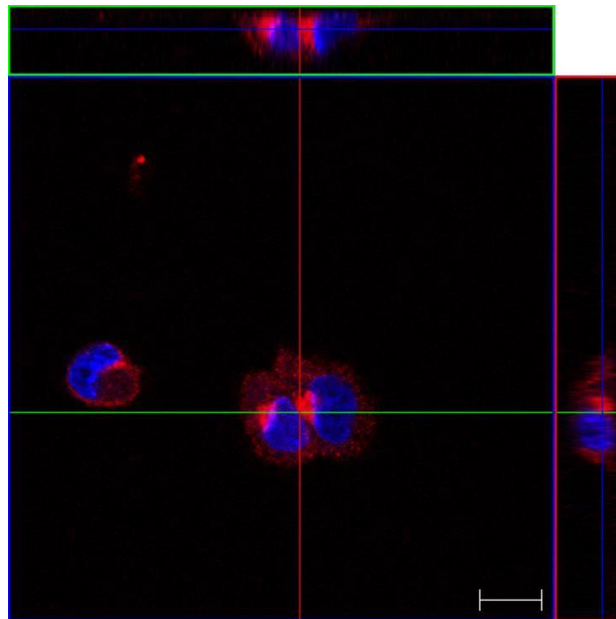


Figura 35: Localización subcelular de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1. Análisis por microscopía confocal de la localización de la isoenzimas PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1. Marcaje con anticuerpo primario anti-PLC β_4 y secundario anti-conejo Alexa Fluor® 594 (en rojo), y marcaje nuclear con DAPI (en azul). Se examinaron al menos 100 células. Barra de calibración: 10 μm .

4. Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos murinos HL-1

Una vez confirmada la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1, se procedió al estudio de la expresión del ARNm de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en la misma línea celular. Los resultados exhibieron un patrón cualitativo diferente al encontrado en tejido cardíaco de la misma especie. Las isoenzimas más expresadas en cardiomiocitos HL-1 son la PLC β_3 y la PLC β_4 (38 y 35 veces mayor que la PLC β_2 , respectivamente), mientras que los niveles de expresión de la isoenzima PLC β_1 son relativamente inferiores a los hallados en tejido de VI de ratón (únicamente 3 veces mayor con respecto a la expresión de PLC β_2 en cardiomiocitos HL-1) (**Figura 32 y Figura 36**).

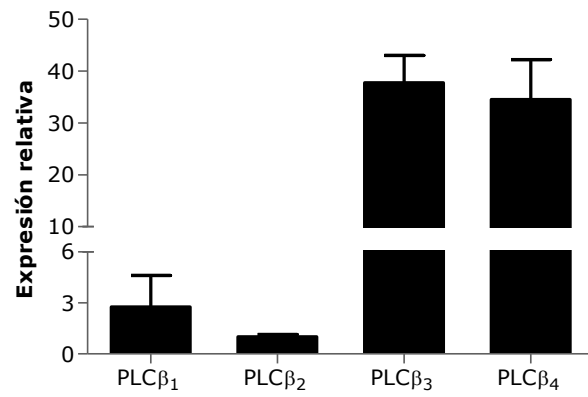


Figura 36: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1 control. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen GAPDH, y los datos están expresados respecto a la expresión de PLC β_2 . Los valores representan la media \pm desviación estándar de cada grupo (n=4).

Capítulo 2:

Estudio de la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras el tratamiento con diferentes agentes hipertróficos

1. Efecto de diferentes estimuladores hipertróficos sobre la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1

1.1 Efecto del tratamiento con angiotensina II 1 μ M durante 24 horas en cardiomiocitos murinos HL-1

1.1.1 Efecto sobre el área celular

El tratamiento con AT II 1 μ M durante 24 h incrementó el área celular de los cardiomiocitos HL-1 un $12 \pm 30\%$ respecto células control (*t-test* de Student desapareado, $P < 0,05$), confirmando el efecto hipertrófico de la AT II (**Figura 37**). El promedio del área celular de los cardiomiocitos HL-1 control fue de $656,4 \pm 210,3 \mu\text{m}^2$, mientras que el de los cardiomiocitos HL-1 tratados con AT II 1 μ M durante 24 h fue de $735,4 \pm 196,7 \mu\text{m}^2$.

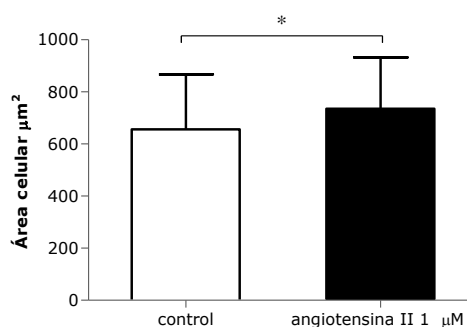


Figura 37: Efecto sobre el área celular de los cardiomiocitos HL-1 del tratamiento con angiotensina II 1 μ M durante 24 h. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cada grupo ($n=3$) (* $P < 0,05$, *t-test* de Student desapareado).

1.1.2 Efecto sobre la expresión génica relativa de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$

Los resultados determinaron que el tratamiento con AT II 1 μ M durante 24 h modificó significativamente la expresión de las isoenzimas de PLC $\beta_{(1-4)}$ respecto control, y que el efecto fue heterogéneo en función de la isoenzima (ANOVA de dos factores; $P < 0,05$). El análisis mediante el test *post-hoc* de Bonferroni reveló que la PLC β_4 es la única isoenzima incrementada significativamente por el tratamiento con AT II ($P < 0,01$) (**Figura 38**).

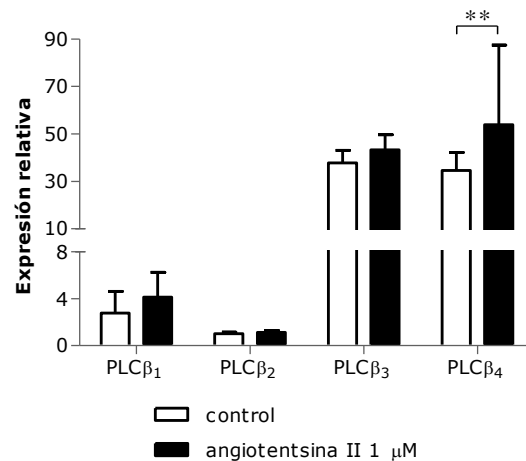


Figura 38: Expresión relativa de los genes de PLCβ₍₁₋₄₎ en cardiomiocitos HL-1 control y tras 24 h de tratamiento con angiotensina II 1 μM. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen GAPDH, y los datos están expresados respecto a la expresión de PLCβ₂ de las células control. Los valores representan la media ± desviación estándar de cada grupo (n=4) (**P<0,01. ANOVA de dos factores seguido del test post-hoc de Bonferroni).

1.2 Efecto del tratamiento con fenilefrina 10 μM durante 48 horas en cardiomiocitos murinos HL-1

1.2.1 Efecto sobre el área celular

El tratamiento con PE 10 μM durante 48 h indujo un incremento del $13,8 \pm 34,1\%$ en el área celular de los cardiomiocitos HL-1 respecto control (*t*-test de Student despareado, $P < 0,05$), confirmando el efecto hipertrófico del tratamiento con PE (**Figura 39**). Si bien el promedio del área celular de células control fue de $640,9 \pm 219,4 \mu\text{m}^2$, el de los cardiomiocitos HL-1 tratados con PE 10 μM durante 48 h fue de $735,5 \pm 205,4 \mu\text{m}^2$.

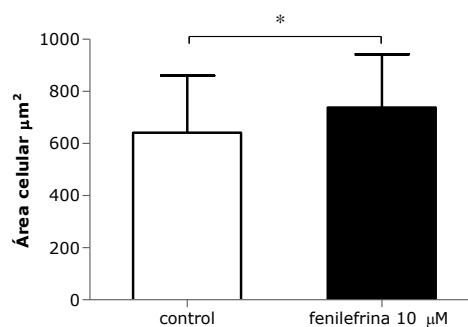


Figura 39: Efecto sobre el área celular de los cardiomiocitos HL-1 del tratamiento con fenilefrina 10 μM durante 48 h. Los valores representan la

media \pm desviación estándar de cada grupo ($n=3$) (* $P<0,05$, t-test de Student desapareado).

1.2.2 Efecto sobre la expresión génica relativa de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$

En los cardiomiocitos tratados con PE 10 μM durante 48 h se pudo concluir que el tratamiento también modificó significativamente la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ (**Figura 40**). En este caso, los resultados determinaron que, si bien el tratamiento modificó significativamente la expresión de las isoenzimas de PLC $\beta_{(1-4)}$ respecto a control (ANOVA de dos factores; $P<0,05$), el efecto producido en la expresión de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ resultó homogéneo, existiendo una tendencia generalizada al incremento de los niveles de todas las isoenzimas de PLC $\beta_{(1-4)}$. El análisis mediante el test post-hoc de Bonferroni reveló que la isoenzima PLC β_4 fue incrementada significativamente respecto control por el tratamiento ($P<0,05$).

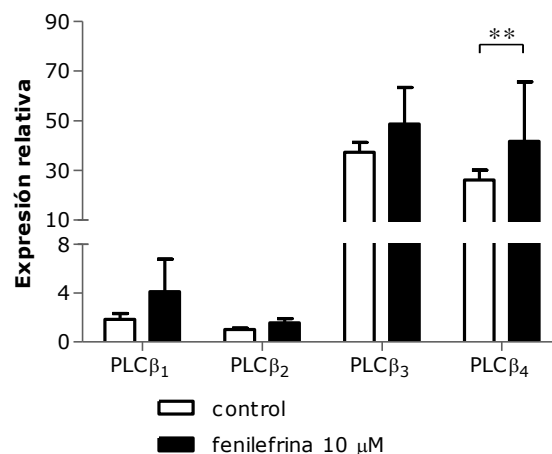


Figura 40: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1 control y tras 48 h de tratamiento con 10 μM fenilefrina. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen GAPDH, y los datos están expresados respecto a la expresión de PLC β_2 de las células control. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cada grupo ($n=2$ control 48 h y $n=4$ fenilefrina) (* $P<0,05$. ANOVA de dos factores seguido del test post-hoc de Bonferroni).

Capítulo 3:

Estudio de la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa

1. Características clínicas generales de los pacientes con estenosis aórtica severa

En este estudio se incluyeron 18 pacientes diagnosticados de EAo severa con indicación quirúrgica de reemplazo valvular y sus características generales se detallan en la **Tabla 3**.

El sexo predominante fue el masculino (12 de 18 pacientes, el 67%), la edad media de $73,4 \pm 7,7$ años, y el índice de masa corporal media de $26,4 \pm 4,1$ kg/m². La mayoría de pacientes (un 83%) se encontraban en la clase funcional NYHA II, excepto 3 pacientes que eran de la clase III. El 56% de los enfermos sufría hipertensión arterial. En cuanto al tratamiento farmacológico de los pacientes que podría interaccionar con nuestro estudio, 5 de los 18 pacientes (28%) estaban tratados con IECAs, 4 pacientes (22%) con β -bloqs, y ninguno de ellos con ARA-II. Los pacientes presentaron una mediana de 400 (124-1046) pg/mL en los niveles de NT-proBNP. Todos los pacientes excepto uno (94%) mostraron hipertrofia ventricular izquierda. Y el IAVAo medio determinado fue de $0,35 \pm 0,08$ cm²/m².

Tabla 3. Características generales de los pacientes con EAo

Características generales	EAo n=18
Sexo, n (%)	
Hombre	12 (67%)
Mujer	6 (33%)
Edad (años)	$73,4 \pm 7,7$
Índice de masa corporal (kg/m²)	$26,4 \pm 4,1$
Presión arterial sistólica (mm Hg)	$136,2 \pm 19,2$
Presión arterial diastólica (mm Hg)	$77,28 \pm 9,9$
Clase funcional NYHA, n (%)	
I	0
II	15 (83%)
III	3 (17%)
IV	0
Antecedentes médicos	
Hipertensión Arterial, n (%)	10 (56%)
Tratamiento, n (%)	
IECA	5 (28%)
ARA-II	0
β -bloqueantes	4 (22%)
NT-proBNP (pg/mL)	400 (124-1046)
HVI, n (%)	17 (94%)
IAVAo (cm²/m²)	$0,35 \pm 0,08$

EAo: estenosis aórtica severa; NYHA: clasificación de la New York Heart Association; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II; NT-proBNP: péptido natriurético cerebral N-terminal; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; IAVAo: índice de área valvular aórtica. Los valores representan la media \pm desviación estándar, mediana (rango intercuartílico) o número de pacientes (%) (n=18).

2. Estudio de la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo humano patológico con estenosis aórtica severa y ventrículo izquierdo humano control con estenosis mitral

El análisis del estudio de la expresión génica relativa de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en pacientes con EAo reveló que el patrón de expresión obtenido en PL era el siguiente: $PLC\beta_1 > PLC\beta_4 > PLC\beta_2 \sim PLC\beta_3$, mientras que en SI de los mismos pacientes: $PLC\beta_1 > PLC\beta_4 > PLC\beta_3 \sim PLC\beta_2$ (**Figura 41**). De modo que la $PLC\beta_1$ es la isoenzima de mayor transcripción en pacientes con EAo, siendo 3,97 y 3,16 veces mayor en PL y en SI, respectivamente, respecto a $PLC\beta_2$ de SI. La isoenzima $PLC\beta_4$ es la segunda más expresada tanto en PL como en SI, la expresión relativa de su ARNm es 1,72 y 1,91 veces mayor, respectivamente, respecto a $PLC\beta_2$ de SI. El análisis estadístico determinó que la expresión de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en pacientes con EAo no es diferente en PL y SI (prueba de Wilcoxon).

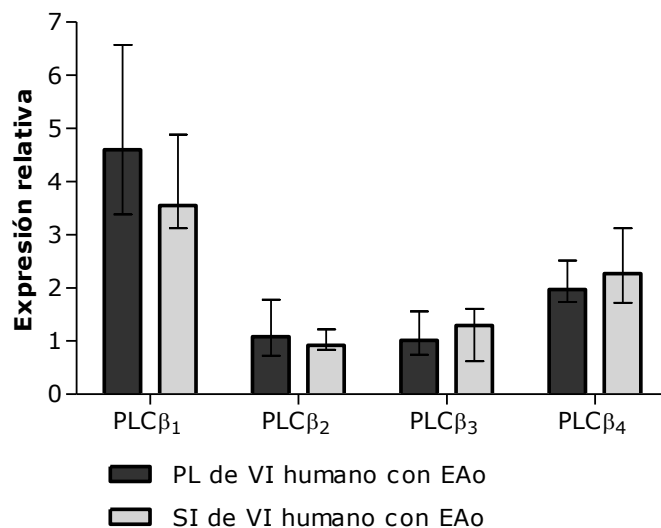


Figura 41: Expresión relativa de los genes de $PLC\beta_{(1-4)}$ en pared libre y septo interventricular de ventrículo izquierdo de pacientes con EAo. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen *GAPDH*, y los datos están expresados respecto a la expresión de $PLC\beta_2$ de septo interventricular de pacientes con EAo. Los valores representan la mediana (rango intercuartílico) de cada grupo ($n=18$) (prueba de Wilcoxon).

Asimismo, los resultados obtenidos en las muestras de PL y de SI del único paciente control con EM mostraron que el patrón de expresión de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ era similar al encontrado en pacientes con EAo (**Figura 42**), siendo el siguiente en las dos localizaciones del VI: $PLC\beta_1 > PLC\beta_4 > PLC\beta_3 > PLC\beta_2$. De manera que la $PLC\beta_1$ es la isoenzima más expresada tanto en PL como en SI, y la isoenzima

PLC β_4 la segunda más expresada. Disponer de un único paciente control con EM impidió poder realizar, por una parte, una comparación estadística entre la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de PL y SI en pacientes control con EM; y por otra, una comparación estadística de la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI entre pacientes con EAo y pacientes control con EM.

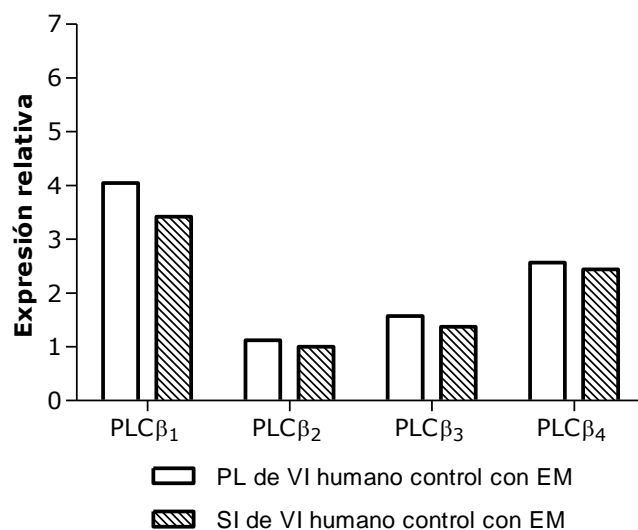


Figura 42: Expresión relativa de los genes de PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano control. La normalización se realizó respecto a la expresión del gen GAPDH, y los datos están expresados respecto a la expresión de PLC β_2 de SI (n=1).

3. Evaluación de niveles séricos de angiotensina II y noradrenalina en sangre de pacientes con estenosis aórtica severa

3.1 Angiotensina II

La concentración sérica de AT II fue determinada tanto en SP como en sangre de SC de los pacientes con EAo. Los resultados determinaron que los niveles de AT II en SP eran menores (13,67 (11,43-25,77) pg/mL) que en sangre de SC (21,81 (17,08-38,51) pg/mL), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (prueba de Wilcoxon, P<0,05) (**Figura 43**). Además, ambas concentraciones mostraron una asociación directa entre ellas (r= 0,730, P< 0,001; correlación de Pearson).

Factor humoral	EAo n=18	
	SP	SC
AT II (pg/mL)	13,7 (11,4-25,8)	21,8 (17,1-38,5)*

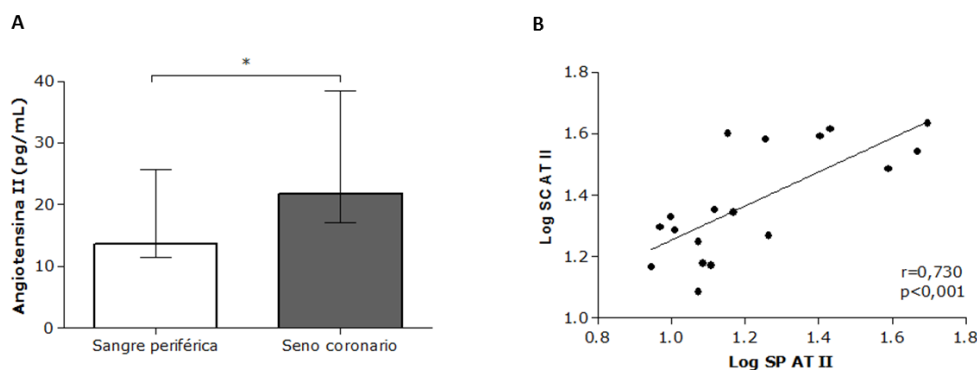


Figura 43: Concentraciones de angiotensina II en suero de sangre periférica y de sangre de seno coronario en pacientes con EAo. **A.** Comparación de concentraciones de AT II en sangre periférica y sangre de seno coronario. Los valores representan la mediana (rango intercuartílico) de cada grupo ($n=18$) ($*P<0,05$, prueba de Wilcoxon). **B.** Diagrama de dispersión y recta de ajuste del análisis univariado entre Log AT II de sangre periférica y Log AT II de seno coronario ($y = 0,55x + 0,7$) ($n=18$). EAo: estenosis aórtica severa; AT II: angiotensina II; SP: sangre periférica; SC: sangre de seno coronario; Log: logaritmo; r : coeficiente de correlación de Pearson; P : P valor de probabilidad.

3.2 Noradrenalina

En cuanto a la NA, la determinación de su concentración sérica reveló que en SP era de 71,7 (63,9-116,1) pg/mL y que en sangre de SC de 69 (59,7-99,6) pg/mL. Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (prueba de Wilcoxon, $P = 0,372$) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Concentraciones de noradrenalina en suero de sangre periférica y de sangre de seno coronario en pacientes con EAo

Factor humoral	EAo n=18	
	SP	SC
NA (pg/mL)	71,7 (63,9-116,1)	69 (59,7-99,6)

EAo: estenosis aórtica severa; NA: noradrenalina; SP: sangre periférica; SC: sangre de seno coronario. Los valores representan la mediana (rango intercuartílico) de cada grupo ($n=18$) (prueba de Wilcoxon).

4. Estudio del diámetro de los cardiomiocitos en pared libre de ventrículo izquierdo y en septo interventricular de pacientes con estenosis aórtica severa

El diámetro de los cardiomiocitos fue determinado en muestras de PL y de SI del ventrículo izquierdo de pacientes con EAo. La determinación se realizó por medio de la tinción Gordon y Sweets. El diámetro medio de PL de pacientes con EAo fue de $21,89 \pm 3,08 \mu\text{m}$, y de $21,78 \pm 2,17 \mu\text{m}$ en SI. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre las dos zonas (*t-test* de Student pareado, $P=0,854$) (**Figura 44**).

Diámetro (μm)	EAo n=18	
	PL	SI
	$21,89 \pm 3,08$	$21,78 \pm 2,17$

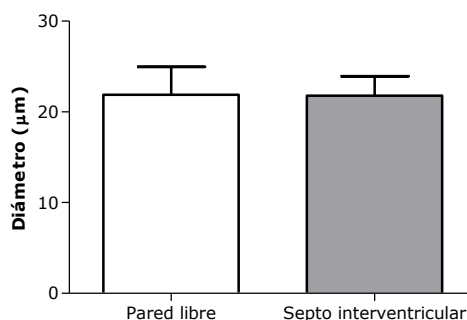


Figura 44: Diámetro de cardiomiocitos en PL y en SI de pacientes con EAo. EAo: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de VI; SI: septo interventricular. Los valores representan la media \pm desviación estándar ($n=18$) (*t-test* de Student pareado).

5. Estudio de la fibrosis miocárdica en pacientes con estenosis aórtica severa

5.1 Fracción de volumen y distribución de colágeno en pared libre de ventrículo izquierdo y en septo interventricular de pacientes con EAo

5.1.1 Fracción de volumen de colágeno

El análisis de la FVC en los pacientes con EAo confirmó una deposición diferencial del colágeno fibrilar entre las dos localizaciones del miocardio (prueba de Wilcoxon, $P= 0,009$). Mientras que la FVC media a nivel de PL fue de 5,48% (4,12-7,41), en SI fue de 9,07% (5,32-15,23) (**Figura 45**).

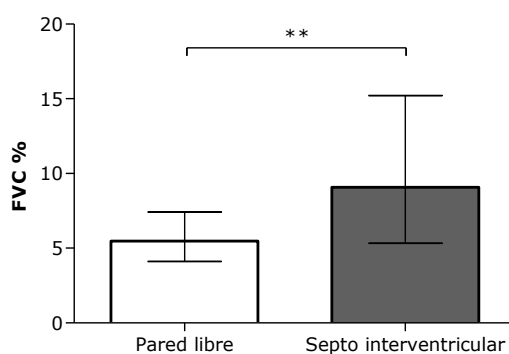


Figura 45: Fracción de volumen de colágeno en PL y en SI de pacientes con EAo. Los valores representan la mediana (rango intercuartílico) de cada grupo ($n=18$) (** $P<0,01$. Prueba de Wilcoxon).

5.1.2 Distribución del colágeno fibrilar

Distribución		EAo $n=18$	
		FVC %	Porcentaje relativo
Pared Libre	Total	5,48 (4,12-7,41)	
	Misial	2,41 (1,89-2,68)	44,47 ± 3,1%
	No misial	2,82 (2-4,06)	55,53 ± 3,1%
Septo interventricular	Total	9,07 (5,32-15,23) **	
	Misial	3,88 (2,94-5,2)*	45,05 ± 4,16%
	No misial	5,4 (2,83-9,12) *	54,95 ± 4,16%

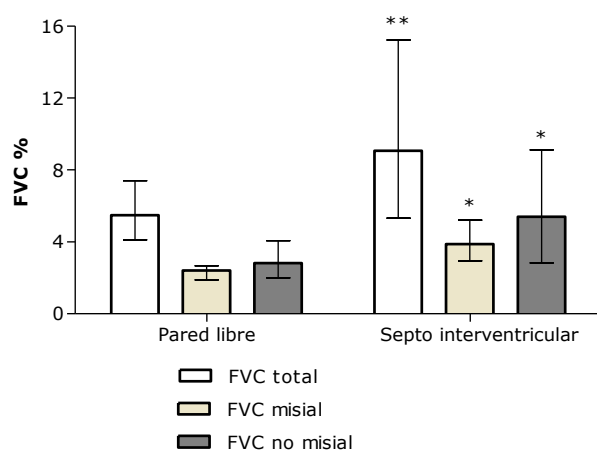


Figura 46: Distribución del depósito de colágeno en PL y en SI de pacientes con EAo. FVC: fracción de volumen de colágeno; EAo: estenosis aórtica severa. Los valores representan la mediana (rango intercuartílico) de cada grupo en FVC y la media ± desviación estándar de cada grupo en porcentaje relativo ($n=18$) (* $P<0,05$, ** $P<0,01$. Prueba de Wilcoxon vs mismo tipo de depósito en pared libre) (ANOVA de dos factores porcentaje relativo del depósito misial y no misial en PL y SI).

A través del análisis histomorfológico se determinó la FVC que se distribuía como depósito misial o como depósito no misial.

Los resultados determinaron que en PL de pacientes con EAo la FVC del depósito de colágeno misial, en términos absolutos, era 2,41% (1,89-2,68), mientras que la del depósito de colágeno no misial, 2,82% (2-4,06) (**Figura 46**). Asimismo, en SI de los mismos pacientes, la FVC del depósito misial y no misial aumentó significativamente respecto al de PL (prueba de Wilcoxon, $P=0,011$ para misial y $P=0,023$ para no misial), siendo la FVC de 3,88% (2,94-5,2) y 5,4% (2,83-9,12), respectivamente.

Sin embargo, la importancia relativa de cada uno de estos componentes, determinada como porcentaje del depósito total, no se modificó según la localización (PL vs SI) (ANOVA de dos factores). De manera que, en términos relativos como componente de la FVC total, ni el depósito misial ni el no misial cambiaron significativamente conforme al incremento del grado de fibrosis del SI.

5.2 Evaluación de la síntesis y degradación del colágeno a nivel bioquímico en pacientes con EAo

Por un lado, la concentración de MMP-1 en suero de sangre de SC fue de 0,65 (0,35-0,93) ng/mL (**Tabla 5**) en los pacientes con EAo. Por otro lado, la concentración TIMP1 en suero de SC fue de 130,1 (77,23-184,5) ng/mL. Por último, el cociente de la metaloproteinasa de matriz tipo I y su inhibidor (MMP1:TIMP1) en suero de SC de los pacientes con EAo fue de 0,004 (0,002-0,01).

Tabla 5. Concentraciones de biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno en suero de sangre de seno coronario en pacientes con EAo

Biomarcadores séricos	EAo n=18
	SC
MMP-1 (ng/mL)	0,65 (0,35-0,93)
TIMP1 (ng/mL)	130,1 (77,23-184,5)
MMP-1:TIMP1	0,004 (0,002-0,01)




EAo: estenosis aórtica severa; SC: sangre de seno coronario; MMP-1: metaloproteinasa de matriz tipo 1; TIMP1: inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz tipo 1. Los valores representan la mediana (rango intercuartílico) de cada grupo.

6. Evaluación de índices de morfología ventricular, función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAO

A través del estudio ecocardiográfico se evaluaron los índices principales de morfología ventricular, de la función sistólica y de la función diastólica ventricular de los pacientes con EAO. Parámetros que se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Parámetros ecocardiográficos de los pacientes con EAO

Parámetros	n=18
GPR	0,58 ± 0,11
IMVI (g/m ²)	160,3 ± 39,33
FE-Simpson (%)	71,32 ± 8,29
Media de desplazamiento anillo mitral (mm)	10,51 ± 2,76
Fracción de acortamiento mesoparietal (%)	22,53 ± 4,27
Onda E (m/s)	82,75 ± 24,11
Onda A (m/s)	95,40 ± 30,01
Relación E/A	0,8 ± 0,15
e' promedio (cm/s)	5,65 ± 1,61
E/e' promedio	16,69 ± 7,77

GPR: grosor parietal relativo; IMVI: índice de masa ventricular izquierda; FE: fracción de eyección.  Índices de morfología ventricular,  índices de función sistólica,  índices de función diastólica. Los valores representan la media ± desviación estándar (n=18).

7. Estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ en ventrículo izquierdo, los niveles séricos de angiotensina II y noradrenalina y el tamaño cardiomiocitario de pacientes con estenosis aórtica severa

7.1 Expresión génica de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ en ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa vs concentración sérica de angiotensina II y noradrenalina

Se estudió la posible asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLCβ₍₁₋₄₎ de VI en pacientes con EAO y los niveles séricos de AT II y NA, tanto en SP como en SC (**Tabla 7**). Los resultados determinaron que no había asociaciones significativas entre estas variables (correlación de Pearson).

Tabla 7. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI en pacientes con EAo y sus niveles de angiotensina II y noradrenalina

Parámetros	Log SP AT II		Log SC AT II		Log SP NA		Log SC NA	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Log PL PLC β_1	0,118	0,642	0,090	0,722	0,151	0,550	0,049	0,847
Log PL PLC β_2	0,159	0,529	0,170	0,501	0,084	0,742	0,052	0,837
Log PL PLC β_3	-0,303	0,237	-0,095	0,717	0,068	0,795	0,190	0,466
Log PL PLC β_4	0,071	0,800	0,360	0,188	0,359	0,189	0,137	0,626
Log SI PLC β_1	-0,179	0,491	-0,213	0,413	0,104	0,693	0,152	0,559
Log SI PLC β_2	-0,191	0,478	-0,397	0,127	-0,047	0,864	0,186	0,490
Log SI PLC β_3	-0,290	0,243	-0,404	0,096	-0,327	0,185	-0,420	0,083
Log SI PLC β_4	0,075	0,775	-0,168	0,520	-0,185	0,478	-0,341	0,180

EAo: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; Log: logaritmo; PLC β : fosfolipasa C β ; SP: sangre periférica; SC: sangre de seno coronario; AT II: angiotensina II; NA: noradrenalina; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18). (Correlación de Pearson).

7.2 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ vs diámetro cardiomiocitario de ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa

Tabla 8. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y el diámetro cardiomiocitario de VI en pacientes con EAo

Parámetros	Diámetro PL		Diámetro SI	
	r	P	r	p
Log PL PLC β_1	-0,323	0,222		
Log PL PLC β_2	-0,221	0,411		
Log PL PLC β_3	-0,186	0,506		
Log PL PLC β_4	-0,695*	0,008		
Log SI PLC β_1			0,137	0,641
Log SI PLC β_2			0,636**	0,020
Log SI PLC β_3			0,287	0,300
Log SI PLC β_4			-0,219	0,451

VI: ventrículo izquierdo; EAo: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; Log: logaritmo; PLC β : fosfolipasa C β ; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18). (*P<0,05. Correlación de Pearson).

Se analizaron las asociaciones entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y el diámetro medio de los cardiomiocitos a nivel de las dos regiones del VI en pacientes con EAo (**Tabla 8**). Los resultados mostraron que la expresión de la isoenzima PLC β_2 en SI se asoció de forma directa con el diámetro cardiomiocitario (r= 0,636, P= 0,020). Sin embargo, en PL, fue la expresión de la isoenzima PLC β_4 la que se asoció de forma inversa con el diámetro cardiomiocitario (r= -0,695,

P= 0,008). Al estudiar mediante correlaciones parciales la influencia que factores de confusión potenciales como la edad, el sexo, el IMC, la PAS, la PAD, el IAVAo, el tratamiento con IECAs y el tratamiento con β -bloqs pudieran estar ocasionando sobre estas correlaciones, se observó que ambas asociaciones se mantuvieron significativas tras excluir la influencia de estos factores.

7.3 Diámetro cardiomiocitario de ventrículo izquierdo de pacientes con EAo vs concentración sérica de angiotensina II y noradrenalina

Por otro lado, se analizaron las posibles asociaciones entre el diámetro de los cardiomiocitos a nivel de PL y de SI, y los niveles séricos de AT II y NA, tanto de SP como de SC (**Tabla 9**). Los resultados mostraron que la concentración sérica de SP de AT II se asoció de forma inversa con el diámetro cardiomiocitario del SI ($r = -0,864$, $P < 0,001$) y mostró un tendencia a asociarse de la misma forma con el diámetro cardiomiocitario de PL ($r = -0,496$, $P = 0,051$). Asimismo, los niveles en suero de SC de AT II se correlacionaron de forma inversa tanto con el diámetro de cardiomiocitos de PL como de SI ($r = -0,547$, $P = 0,028$; $r = -0,803$, $P < 0,001$, respectivamente). No se encontró ninguna asociación entre los niveles séricos de NA y el diámetro cardiomiocitario en pacientes con EAo.

Tabla 9. Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de VI de pacientes con EAo y sus concentraciones séricas de angiotensina II y noradrenalina

Parámetros	Diámetro PL		Diámetro SI	
	r	p	r	p
Log SP AT II	-0,496	0,051	-0,864**	<u>0,000</u>
Log SC AT II	-0,547*	<u>0,028</u>	-0,803**	<u>0,000</u>
Log SP NA	-0,204	0,449	-0,051	0,857
Log SC NA	-0,134	0,620	0,052	0,855

VI: ventrículo izquierdo; EAo: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; Log: logaritmo; SP: sangre periférica; SC: sangre de seno coronario; AT II: angiotensina II; NA: noradrenalina; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18) (* $P < 0,05$. Correlación de Pearson).

Al estudiar mediante correlaciones parciales la influencia de los factores de confusión potenciales, se observó que la asociación entre la concentración sérica de SC de AT II y el diámetro cardiomiocitario de PL era dependiente de PAD ($r = -0,427$, $P = 0,113$). Sin embargo, las asociaciones entre los niveles de AT II (SP y SC) y el diámetro de los cardiomiocitos de SI se mantuvieron significativas tras controlar la influencia de los factores de confusión.

8. Estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo y la fibrosis miocárdica en pacientes con estenosis aórtica severa

8.1 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs fracción de volumen y distribución del colágeno en ventrículo izquierdo de pacientes con EAo

Respecto al estudio de asociación entre la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y la fracción de volumen y distribución del colágeno en diferentes localizaciones de VI de pacientes con EAo, los resultados determinaron que en PL la expresión génica de la isoenzima PLC β_3 se asocia de forma positiva con el depósito no misial ($r= 0,546$, $P= 0,029$) (**Tabla 10**).

Sin embargo, en SI de pacientes con EAo, fue la expresión génica de la isoenzima PLC β_4 la que se asoció de forma directa con el depósito de colágeno no misial ($r= 0,482$, $P= 0,049$) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y la fracción de volumen de colágeno en pacientes con EAo

Parámetros	Log FVC PL total		Log FVC PL misial		Log FVC PL no misial	
	r	p	r	p	r	p
Log PL PLC β_1	0,014	0,958	0,186	0,474	-0,071	0,787
Log PL PLC β_2	0,052	0,843	0,286	0,266	-0,040	0,880
Log PL PLC β_3	0,405	0,120	-0,239	0,372	0,546*	0,029
Log PL PLC β_4	0,445	0,111	0,126	0,669	0,414	0,141
Parámetros	Log FVC SI total		Log FVC SI misial		Log FVC SI no misial	
	r	p	r	p	r	p
Log SI PLC β_1	0,324	0,205	0,134	0,609	0,392	0,120
Log SI PLC β_2	-0,023	0,932	0,026	0,925	-0,055	0,840
Log SI PLC β_3	-0,049	0,848	0,022	0,931	-0,052	0,839
Log SI PLC β_4	0,420	0,094	0,125	0,632	0,482*	0,049

VI: ventrículo izquierdo; EAo: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; Log: logaritmo; PLC β : fosfolipasa C β ; FVC: fracción de volumen de colágeno; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad ($n=18$). (* $P<0,05$. Correlación de Pearson).

Al comprobar si los factores de confusión potenciales interferían en las correlaciones obtenidas, se observó que la asociación entre la expresión de la isoenzima PLC β_3 y el depósito no misial en PL era dependiente del IMVI y del IAVAo ($r= 0,420$, $P= 0,153$; $r=0,518$; $P= 0,052$, respectivamente). Mientras que la asociación entre la expresión de las isoenzima PLC β_4 y el depósito no misial de fibrosis en SI se

veía disminuida por los factores edad, sexo, PAS, IAVAo, IECAs y β -bloqs ($r= 0,467$, $P= 0,068$; $r= 0,458$, $P= 0,074$; $r= 0,485$, $P= 0,057$; $r= 0,433$, $P=0,094$; $r= 0,478$, $P= 0,061$; $r= 0,482$, $P= 0,059$, respectivamente). Sin embargo, el efecto sobre la significancia estadística fue pequeño, permaneciendo en todos los casos por debajo de 0,1.

8.2 Expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno en pacientes con EAO

Tabla 11. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de VI y los biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno del seno coronario en pacientes con EAO

Parámetros	Log PL $PLC\beta_1$		Log PL $PLC\beta_2$		Log PL $PLC\beta_3$		Log PL $PLC\beta_4$	
	r	p	r	p	r	p	r	p
	Log SC MMP-1	-0,182	0,470	-0,068	0,789	0,164	0,529	-0,059
Log SC TIMP1	-0,199	0,429	-0,079	0,755	-0,093	0,722	0,169	0,548
Log SC MMP-1:TIMP1	-0,110	0,665	-0,037	0,886	0,183	0,481	-0,124	0,659
Parámetros	Log SI $PLC\beta_1$		Log SI $PLC\beta_2$		Log SI $PLC\beta_3$		Log SI $PLC\beta_4$	
	r	p	r	p	r	p	r	p
	Log SC MMP-1	-0,309	0,228	0,021	0,939	-0,193	0,444	-0,426
Log SC TIMP1	-0,053	0,841	-0,069	0,801	0,118	0,640	0,254	0,326
Log SC MMP-1:TIMP1	-0,295	0,251	0,030	0,911	-0,203	0,420	-0,482*	0,049

VI: ventrículo izquierdo; EAO: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; Log: logaritmo; $PLC\beta$: fosfolipasa C β ; SC: sangre de seno coronario; MMP-1: metaloproteinasa de matriz tipo 1; TIMP1: inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz tipo 1; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad ($n=18$) (* $P<0,05$. Correlación de Pearson).

En lo que respecta al estudio de asociación entre la expresión de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de VI y las concentraciones séricas de los biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno en pacientes con EAO, únicamente se halló una asociación negativa entre la expresión génica de la isoenzima $PLC\beta_4$ en SI y el cociente MMP-1:TIMP1 de SC ($r=-0,482$, $P=0,049$) (**Tabla 11**). Esta asociación dejó de ser significativa tras incluir la influencia de los factores sexo, edad, IMC, PAS, PAD, IMVI, IAVAo e IECAs ($r= -0,280$, $P= 0,298$; $r= -0,494$, $P= 0,052$; $r= -0,211$, $P= 0,433$; $r= -0,477$, $P= 0,062$; $r= -0,484$, $P= 0,057$; $r= -0,368$, $P= 0,195$; $r= -0,487$, $P= 0,056$; $r= -0,491$, $P= 0,054$, respectivamente).

9. Estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de ventrículo izquierdo y parámetros generales, índices de morfología ventricular, función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAO

9.1 Expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs características generales de los pacientes con estenosis aórtica severa

Tal y como muestra la **Tabla 12**, al estudiar la asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ y las características generales de los pacientes (edad, IMC, PAS, PAD e IAVAo), se observó que las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_2$ de PL se asociaron de forma positiva con la PAD ($r= 0,540$, $P= 0,021$; $r= 0,485$, $P= 0,042$, respectivamente), mientras que la isoenzima $PLC\beta_3$ de PL se asoció de forma negativa con el IAVAo ($r= -0,483$, $P= 0,049$). Por otro lado, la isoenzima $PLC\beta_4$ de SI se asoció de forma directa con el IMC ($r= 0,569$, $P= 0,017$).

Tabla 12. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de VI y las características generales de pacientes con EAO

Parámetros	Edad		IMC		PAS		PAD		IAVAo	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Log PL $PLC\beta_1$	-0,095	0,708	0,035	0,890	0,311	0,209	0,540*	<u>0,021</u>	0,111	0,662
Log PL $PLC\beta_2$	0,028	0,912	-0,035	0,891	0,219	0,382	0,485*	<u>0,042</u>	0,100	0,692
Log PL $PLC\beta_3$	0,098	0,707	-0,348	0,171	-0,035	0,894	-0,118	0,651	-0,483*	<u>0,049</u>
Log PL $PLC\beta_4$	0,158	0,573	-0,089	0,752	0,056	0,842	0,242	0,385	-0,088	0,756
Log SI $PLC\beta_1$	0,007	0,978	0,153	0,557	0,230	0,374	0,364	0,151	0,145	0,579
Log SI $PLC\beta_2$	0,151	0,577	-0,350	0,184	-0,245	0,361	-0,088	0,745	-0,253	0,344
Log SI $PLC\beta_3$	0,020	0,938	0,090	0,723	-0,092	0,717	-0,241	0,336	-0,299	0,228
Log SI $PLC\beta_4$	-0,138	0,597	0,569*	<u>0,017</u>	-0,086	0,742	0,005	0,986	0,299	0,252

EAO: estenosis aórtica severa; VI: ventrículo izquierdo; IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; IAVAo: índice área válvula aórtica; Log: logaritmo; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; $PLC\beta$: fosfolipasa C β ; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad ($n=18$) (Correlación de Pearson).

9.2 Expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs índices de morfología ventricular izquierda

Tal y como muestra la **Tabla 13**, al estudiar las posibles asociaciones del GPR y del IMVI con la expresión de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de VI en pacientes con EAO, los resultados determinaron que el GPR se asoció directamente con la expresión de las

isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_2$ en PL ($r=0,631$, $P=0,009$; $r=0,572$, $P=0,021$, respectivamente). En cuanto al IMVI, no se asoció con la expresión génica de ninguna de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$. Al estudiar mediante correlaciones parciales la influencia de los factores de confusión potenciales, se observó que la asociación entre la expresión de la isoenzima $PLC\beta_2$ en PL y el GPR era dependiente de la PAD ($r= 0,512$, $P=0,052$), mientras que la asociación entre la expresión de la isoenzima $PLC\beta_1$ en PL y el GPR se mantuvo significativa tras controlar la influencia de los factores de confusión.

Tabla 13. Análisis de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de VI y los índices de morfología ventricular izquierda en pacientes con EAo

Parámetros	GPR		IMVI	
	r	p	r	p
Log PL $PLC\beta_1$	0,631**	<u>0,009</u>	-0,081	0,765
Log PL $PLC\beta_2$	0,572*	<u>0,021</u>	-0,229	0,393
Log PL $PLC\beta_3$	0,088	0,756	0,147	0,600
Log PL $PLC\beta_4$	-0,165	0,591	-0,198	0,518
Log SI $PLC\beta_1$			0,343	0,193
Log SI $PLC\beta_2$			0,074	0,802
Log SI $PLC\beta_3$			0,407	0,118
Log SI $PLC\beta_4$			0,475	0,073

EAo: estenosis aórtica severa; VI: ventrículo izquierdo; GPR: grosor parietal relativo; IMVI: índice de masa ventricular izquierda; Log: logaritmo; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; $PLC\beta$: fosfolipasa C β ; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad. (n=16) (Correlación de Pearson).

9.3 Expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs índices de función sistólica en pacientes con estenosis aórtica severa

Los resultados del estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ de VI y los índices de función sistólica determinaron que la expresión de la isoenzima $PLC\beta_2$ de SI se asoció de forma negativa con la media del desplazamiento del anillo mitral ($r= -0,620$, $P= 0,018$) (**Tabla 14**). Además, esta asociación se mantuvo significativa tras controlar la influencia de los factores de confusión.

9.4 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo vs índices de función diastólica en pacientes con estenosis aórtica severa

En el caso de la asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y los índices de función diastólica (**Tabla 14**), en primer lugar, la expresión de la isoenzima PLC β_2 en SI se asoció de forma directa con la onda E ($r= 0,540$, $P= 0,038$) y con el promedio E/e' ($r= 0,580$, $P= 0,024$). Y en segundo lugar, la isoenzima PLC β_4 de PL se asoció de forma positiva con el promedio e' ($r= 0,558$, $P= 0,031$). Al estudiar la influencia de los factores de confusión potenciales, se observó que la asociación entre la expresión de la isoenzima PLC β_2 en SI y el promedio E/e' era independiente de los factores de confusión. Mientras que la asociación entre la isoenzima PLC β_2 en SI y la onda E fue dependiente de la PAS, IMVI, IAVAo e IECAs ($r= 0,499$, $P=0,069$; $r= 0,544$, $P= 0,056$; $r= 0,495$, $P= 0,072$; $r= 0,521$, $P= 0,056$, respectivamente), y la asociación entre la expresión de la isoenzima PLC β_4 en PL y el promedio e' dependiente de la PAD, IMVI e IECAs ($r= 0,528$, $P= 0,053$; $r= 0,279$, $P= 0,380$; $r= 0,530$, $P= 0,051$, respectivamente).

Tabla 14. Análisis de asociación entre expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de VI y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo.

Parámetros	Log PL PLC β_1		Log PL PLC β_2		Log PL PLC β_3		Log PL PLC β_4	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FE-Simpson	0,229	0,394	0,441	0,087	-0,393	0,132	-0,099	0,737
Media de desplazamiento anillo mitral	-0,107	0,695	-0,007	0,981	-0,362	0,185	0,234	0,441
Fracción de acortamiento mesoparietal	-0,185	0,492	-0,154	0,568	0,277	0,300	0,147	0,616
Onda E	0,009	0,972	-0,112	0,668	0,114	0,675	-0,031	0,917
Onda A	0,077	0,784	-0,017	0,953	0,028	0,925	-0,136	0,674
Relación E/A	0,111	0,705	-0,330	0,249	0,177	0,562	0,131	0,684
e' promedio	0,407	0,094	0,366	0,136	-0,270	0,295	0,558*	<u>0,031</u>
E/e' promedio	-0,256	0,321	-0,337	0,186	0,151	0,577	-0,217	0,457
Parámetros	Log SI PLC β_1		Log SI PLC β_2		Log SI PLC β_3		Log SIPLC β_4	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FE-Simpson	0,050	0,860	0,258	0,373	-0,487	0,056	-0,223	0,424
Media de desplazamiento anillo mitral	-0,434	0,093	-0,620*	<u>0,018</u>	-0,141	0,602	0,100	0,723
Fracción de acortamiento mesoparietal	-0,077	0,786	-0,332	0,245	0,040	0,882	-0,108	0,701
Onda E	0,354	0,178	0,540*	<u>0,038</u>	-0,061	0,815	-0,147	0,588
Onda A	0,297	0,303	0,140	0,649	-0,271	0,328	-0,081	0,782
Relación E/A	0,144	0,640	0,261	0,412	0,202	0,488	0,035	0,910
e' promedio	-0,106	0,686	-0,317	0,232	-0,210	0,402	0,075	0,776
E/e' promedio	0,277	0,298	0,580*	<u>0,024</u>	0,204	0,433	-0,086	0,753

VI: ventrículo izquierdo; EAo: estenosis aórtica severa; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; Log: logaritmo; PLC β : fosfolipasa C β ; FE: fracción de eyección; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad ($n=18$). (* $P<0,05$. Correlación de Pearson).

Con el objetivo de estudiar cómo se asociaban los demás variables entre ellas, se analizaron las posibles asociaciones entre el diámetro cardiomiocitario de PL y de SI, las variables ecocardiográficas asociadas a la morfología cardíaca, la fracción de volumen de colágeno de PL y de SI, los niveles séricos de AT II y NA, y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular. Los resultados se muestran en el **Anexo 2, Anexo 3, Anexo 4 y Anexo 5** de este manuscrito.

Discusión

1. Expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo humano, de rata y de ratón, y en cardiomiocitos murinos HL-1

1.1 Expresión de la isoenzima PLC β_4

Los resultados del presente trabajo confirman que la isoenzima PLC β_4 se expresa en VI humano, de rata y ratón, y en cardiomiocitos murinos HL-1. Los datos obtenidos a través de qRT-PCR sugieren que el transcrito de la isoenzima PLC β_4 es el más expresado en VI de las tres especies estudiadas y uno de los más expresados en cardiomiocitos HL-1. A su vez, los resultados del *western blot* realizado en membranas de VI humano, de rata y ratón, y en cardiomiocitos HL-1 demuestran la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en esta línea celular y en tejido cardíaco de las especies mencionadas. Sin embargo, dichos resultados muestran diferencias en el peso molecular de la PLC β_4 detectada, que pueden deberse a la expresión de distintas variantes de PLC β_4 .

Todas las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tienen un extremo CT de alrededor de 450 aa que parece estar involucrado en la activación de las isoenzimas mediante su interacción con la subunidad G α de la proteína heterotrimérica G $_q$ (Wu y cols., 1993). Además, varios trabajos han descrito diferentes variantes de la isoenzima PLC β_4 , los cuales se diferencian por su extremo CT.

Lee y cols. (1993) describieron por primera vez en retina bovina y en cerebro de rata una isoenzima PLC formada por 1176 aa y de 134 kDa no caracterizada hasta entonces, la denominaron PLC β_4 . Posteriormente, Kim y cols. (1998) y Adamski y cols. (1999) describieron dos nuevas variantes de la isoenzima PLC β_4 en cerebro de rata, y las denominaron PLC β_{4b} y PLC β_{4c} , clasificando la descubierta por Lee y cols. como PLC β_{4a} . La isoenzima PLC β_{4b} de rata descrita por Kim y cols. (1998) es un polipéptido de 1022 aa con una masa molecular calculada de 116 kDa que contiene una estructura idéntica a la PLC β_{4a} de rata a excepción de 162 aa de la región CT reemplazados por 10 aa, y que a diferencia de la isoenzima PLC β_{4a} se encuentra en el citoplasma y no es activada por la G α_q . En cuanto a la isoenzima PLC β_{4c} de rata identificada por Adamski y cols. (1999), es una variante de 1193 aa que contiene un dominio CT extendido como la isoenzima PLC β_{4a} de rata pero diferente por la sustitución de 22 aa por otros 41 aa. Actualmente, en la base de datos *NCBI Gene Database* se describe una única variante de PLC β_4 provisional en rata de 1176 aa. Sin embargo, otros catálogos de información sobre proteínas como *Uniprot* contemplan tres variantes revisadas de la isoenzima PLC β_4 en rata: PLC β_{4a} de 1175 aa, PLC β_{4b} de 1022 aa y PLC β_{4c} de 1193 aa.

Si bien en rata se han descrito tres variantes de la isoenzima PLC β_4 , en ratón, *NCBI Gene Database* describe una única variante provisional de 1175 aa. Mientras que *Uniprot* contempla dos variantes provisionales de la isoenzima PLC β_4 en ratón: una de 1175 aa (134 kDa) y otra de 1022 aa (116 kDa). De manera que en la actualidad no existen variantes de la isoenzima PLC β_4 en ratón revisadas y clasificadas.

En cuanto a las variantes de la isoenzima PLC β_4 en humano, Alvarez y cols. (1995) detectaron en homogenados de retina humana mediante anticuerpos específicos anti-PLC β_4 una variante principal de 130 kDa y otra secundaria de 160 kDa. Actualmente, en la base de datos *NCBI Gene Database* se describen tres variantes revisadas de PLC β_4 en humano: PLC β_{4a} de 1194 aa (136 kDa), PLC β_{4b} de 1175 aa (134 kDa) y PLC β_{4c} de 1187 aa (136 kDa). Mientras que *Uniprot* contempla cuatro variantes (**Figura 47**).

Base de datos	Humano		Rata		Ratón	
	Variante	aa	Variante	aa	Variante	aa
NCBI Gene Database	PLC β_{4a}	1194	<i>PLCβ_4</i>	1176	<i>PLCβ_4</i>	1175
	PLC β_{4b}	1175				
	PLC β_{4c}	1187				
Uniprot	PLC $\beta_{4.1}$	1022	PLC β_{4a}	1175	<i>PLC$\beta_{4.1}$</i>	1175
	PLC $\beta_{4.2}$	1175	PLC β_{4b}	1022		
	PLC $\beta_{4.3}$	1194	PLC β_{4c}	1193	<i>PLC$\beta_{4.2}$</i>	1022
	PLC $\beta_{4.4}$	1187				

Figura 47: Resumen de las variantes transcripcionales de la isoenzima PLC β_4 y su longitud en diferentes especies. La tabla muestra las variantes transcripcionales de PLC β_4 y el número de aminoácidos (aa) recogidos en *NCBI Gene Database* y en *Uniprot*. Las secuencias provisionales se muestran en cursiva.

La generación de variantes de la isoenzima PLC β_4 a través de modificaciones en el extremo CT podría ser importante para la distribución subcelular y la activación de la isoenzima, y cada variante podría jugar un papel diferente en la señalización celular. En este sentido, Kim y cols. (1998) determinaron que modificaciones en el dominio CT influyen en la localización y activación de las variantes de PLC β_4 . De manera que, sería interesante identificar las variantes expresadas en cada especie y tipo celular, y caracterizar su distribución celular y activación correctamente.

En los *western blots* del presente trabajo, la banda de PLC β_4 obtenida en la muestra de VI del paciente corresponde al peso molecular de la isoenzima PLC β_4 , pero la discriminación sobre cuál de las tres variantes se trata resulta compleja debido a la similitud de sus pesos moleculares en humano (136 kDa PLC β_{4a} , 134 kDa PLC β_{4b} y 136 kDa PLC β_{4c} , datos recogidos de *NCBI Gene Database*). Por su parte, la banda de la muestra de VI de rata coincide con el peso molecular descrito por Kim y cols. (1998) para la PLC β_{4b} de rata (116 kDa). En cuanto a las bandas de muestra de ratón, los

resultados podrían invitar a adjudicar la banda de VI de ratón a la variante de 116 kDa de PLC β_4 y la banda de cerebelo de ratón a la variante de 134 kDa. Asimismo, los resultados del *western blot* en cardiomiocitos HL-1 confirman la expresión de la proteína de PLC β_4 en esta línea celular, y la banda obtenida en este caso fue de alrededor de 140 kDa. Por tanto, los resultados podrían indicar la expresión de diferentes variantes de PLC β_4 en VI de diferentes especies y cardiomiocitos. De este modo, mientras que en VI de rata y ratón predominaría la variante de PLC β_4 de extremo CT corto, en cerebelo de ratón, VI humano y cardiomiocitos HL-1 lo harían aquellas variantes de extremo CT más largo.

A su vez, los ensayos de inmunofluorescencia permitieron determinar mediante microscopía confocal la disposición celular de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos HL-1. Los resultados mostraron una distribución citoplasmática de la isoenzima, descartando su disposición en la membrana plasmática y en el núcleo. Si bien del estudio realizado por Kim y cols. (1998) se pudiera esperar la disposición de la isoenzima PLC β_4 de extremo CT largo de los cardiomiocitos HL-1 en la membrana plasmática, los resultados de la inmunofluorescencia mostraron que únicamente se localizaba en el citoplasma. No obstante, existe amplia literatura donde se demuestra que las PLCs translocan a membrana en respuesta a diferentes estímulos. En este sentido, son varios los trabajos que han demostrado el reclutamiento de la isoenzima PLC β_2 desde el citoplasma a la membrana plasmática tras la activación mediante diferentes agonistas (Coburn y cols., 1997; Gutman y cols., 2010), así como la translocación de PLC γ_1 del citoplasma a la membrana, y finalmente, a endosomas, en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Matsuda y cols., 2001). Asimismo, pudiera ser que el reclutamiento de la PLC β_4 a la membrana plasmática fuera inducido mediante el incremento de PIP $_2$ o fosfolípidos cargados negativamente en la capa interior de la membrana plasmática, como ocurre con la isoenzima PLC β_{1a} en células HeLa (células epiteliales humanas procedentes de carcinoma de cuello uterino) (Adjobo-Hermans y cols., 2008). De modo que, si bien los resultados del presente trabajo muestran una disposición citoplasmática de la isoenzima PLC β_4 en cardiomiocitos murinos HL-1, no se podría descartar su translocación a membrana plasmática en condiciones experimentales que así lo permitieran.

Por tanto, la variante de PLC β_4 de extremo CT largo de los cardiomiocitos murinos HL-1 no se corresponde a la variante de extremo CT corto encontrado en VI de ratón. Ello podría ser debido a la aportación diferencial de otros tipos celulares en VI de ratón, o a la procedencia auricular de la línea celular HL-1 (Claycomb y cols., 1998). En este sentido, varios estudios han demostrado diferencias a nivel funcional, molecular y de expresión entre cardiomiocitos de aurícula y de ventrículo (Ng y cols., 2010). No obstante, la existencia de variantes PLC β_4 de extremo CT largo tanto en VI humano como en cardiomiocitos HL-1 confirman la idoneidad de este modelo celular

para el estudio de la implicación de la isoenzima PLC β_4 en la función cardíaca en humanos.

1.2 Expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$

El análisis de la expresión génica relativa de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en tejido cardíaco revela que la PLC β_4 es la isoenzima más expresada en VI humano, de rata y de ratón, y una de las más expresadas en cardiomiocitos HL-1.

Sin embargo, los resultados manifiestan una notable diferencia en el patrón de expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ entre especies. Si bien el transcrito de PLC β_3 es el más expresado en cardiomiocitos HL-1 y el segundo más expresado en VI humano y de rata; en VI de ratón, la isoenzima PLC β_1 presenta mayores niveles de expresión que la isoenzima PLC β_3 . En VI humano y de rata la isoenzima PLC β_1 es la menos expresada, mientras que en VI de ratón y cardiomiocitos HL-1 es la isoenzima PLC β_2 .

En la literatura no se ha encontrado ningún trabajo dónde se compare el patrón de expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano, de rata y ratón. No obstante, Hansen y cols. (1995) determinaron que la expresión de la proteína de la isoenzima PLC β_3 es mayor que el de la isoenzimas PLC β_1 en VI adulto de rata; asimismo, Woodcock y cols. (2009) observaron una mayor expresión proteica de la isoenzima PLC β_3 que de la isoenzima PLC β_{1b} en aurícula derecha de pacientes intervenidos de cirugía de revascularización coronaria, mientras que describieron una mayor expresión génica de la isoenzima PLC β_{1a} que de la isoenzima PLC β_3 en aurícula izquierda de ratón, resultados acordes con los obtenidos en el presente trabajo.

De este modo, los resultados demuestran disimilitudes en el patrón de expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI de las diferentes especies estudiadas. En este sentido, existen trabajos donde la actividad de la PLC β , determinada en cardiomiocitos de rata y de ratón, mostraba diferencias en respuesta a agonistas selectivos de receptores acoplados a G $_{q/11}$ según la especie (Hilal-Dandan y cols., 2000; Sabri y cols., 2000). Asimismo, trabajos realizados en otros tejidos como los islotes pancreáticos, demuestran que la expresión proteica de diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ varía según la especie (Zawalich y cols., 2000). Las diferencias encontradas en estos trabajos y los resultados obtenidos en el presente estudio remarcan la necesidad de cautela a la hora de comparar resultados obtenidos en diferentes especies.

Por otro lado, el patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos murinos HL-1, tipo celular fundamental para la función cardíaca, no coincidió con el obtenido en VI de ratón, al igual que los resultados obtenidos en

western blot. Ello podría deberse, por una parte, a la procedencia auricular de la línea celular HL-1, y/o, por otra, a la aportación diferencial de otros tipos celulares al patrón de expresión global del VI de ratón, como los fibroblastos, las células endoteliales o las células vasculares de músculo liso, subtipos celulares donde se ha descrito la existencia de la señalización de PLC β (Meszaros y cols., 2000; Rubio-Gayosso y cols., 2000; Blayney y cols., 1998). Así, estudios de otros laboratorios muestran diferencias en los resultados de transducción de señal del ventrículo entero y de los miocitos de ventrículos aislados, indicativo de que las células no-miocitarias juegan un papel significativo en la respuesta hormonal del tejido cardíaco intacto (Meszaros y cols., 2000). Además, Banerjee y cols. (2007) describieron diferencias en la población de tipos celulares en corazón adulto de rata y ratón, si bien la población predominante en corazón de ratón resultó la de los cardiomiocitos (57 %) seguido de fibroblastos (27 %), en corazón de rata fueron estas últimas la células más abundantes (64 %) seguido por los cardiomiocitos (30 %), resultados que sugieren una gran diferencia en la población celular del corazón entre especies. Todo ello podría explicar las diferencias encontradas en el patrón de expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos murinos HL-1 y VI de ratón, así como las halladas entre diferentes especies.

En resumen, este trabajo demuestra la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 en VI humano, de rata y ratón y en cardiomiocitos HL-1. Además, las bandas del *western blot* revelan la expresión de diferentes variantes de PLC β_4 según el tejido y la especie estudiada. Y a su vez, los resultados de qRT-PCR revelan que el transcrito de la isoenzima PLC β_4 es el más expresado en VI humano, de rata y ratón y uno de los más expresados en cardiomiocitos HL-1.

Por tanto, la confirmación de la expresión de esta cuarta isoenzima PLC β en tejido cardíaco abre nuevas perspectivas acerca de la importancia de esta vía y requiere de nuevos estudios para investigar si la isoenzima PLC β_4 está implicada en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Es por ello que el presente trabajo se ha intentado abordar, por un lado, desde el punto de vista celular, si el tratamiento de cardiomiocitos con agentes hipertróficos altera la expresión de la isoenzima PLC β_4 . Y por otro, desde el punto de vista clínico, si en el desarrollo de la HVI asociada a una enfermedad cardíaca como la estenosis aórtica dicha isoenzima se ve involucrada.

2. Regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras el tratamiento con diferentes agentes hipertróficos

Con el objetivo de determinar si la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ es regulada de manera diferencial a través de distintos agentes hipertróficos, los cardiomiocitos HL-1 fueron tratados con AT II 1 μ M durante 24 h y PE 10 μ M durante 48 h, concentración y duración de tratamientos detallados como hipertróficos en otros trabajos (Vinciguerra y cols., 2009; Ferguson y cols., 2013).

Los resultados del presente trabajo determinan que ambos tratamientos causaron hipertrofia de los miocitos y cambios diferentes en la expresión del ARNm de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$.

El tratamiento con AT II 1 μ M durante 24 h incrementó el área celular de los cardiomiocitos HL-1 y modificó significativamente la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ respecto células control. El efecto fue heterogéneo en función de la isoenzima, y la PLC β_4 fue la única incrementada de forma significativa por el tratamiento. Por otro lado, el tratamiento de los células HL-1 con PE 10 μ M durante 48 h también incrementó el área celular y modificó significativamente la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ respecto a control, sin embargo, los cambios de expresión producidos por este último tratamiento resultaron homogéneos, existiendo una tendencia generalizada al incremento de los niveles de todas las isoenzimas de PLC $\beta_{(1-4)}$, aunque la PLC β_4 fue incrementada significativamente respecto control. De modo que los resultados sugieren que únicamente el tratamiento con AT II produjo un efecto selectivo sobre la isoenzima PLC β_4 aumentando su expresión con respecto al resto de isoenzimas, tal y como lo demuestra la significancia en la interacción de dicho análisis. Lo cual indica que la regulación de la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ mediante el tratamiento de AT II y PE sigue patrones diferentes, aunque no excluye el aumento de los niveles de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$.

Por tanto, si bien los receptores adrenérgicos α_1 y los receptores AT $_1$ para la AT II son capaces de activar vías de transducción intracelular similares, estos resultados refuerzan la idea de que su efecto hipertrófico es mediado a través de señalizaciones diferentes, que a su vez, regulan la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de manera diferente.

A pesar de que las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ compartan estructura primaria y vías de regulación, sigue siendo objeto de debate el porqué de la existencia de diferentes subtipos. El hecho de que cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ exhiba un patrón de expresión diferente en diversos tejidos y que su función se acentúe en ratones *knockout* específicos para cada isoenzima (Kim y cols., 2011), hace pensar que probablemente

cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ tenga su propia función en las respuestas fisiológicas, aunque el mecanismo molecular subyacente se desconozca.

Las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ son activadas y reguladas a través de las mismos componentes de la señalización mediada por GPCR, como las subunidades G $\alpha_{q/11}$ y G $\beta\gamma$ de la proteína heterotrimérica G o sus mismos efectores como la PKC (Suh y cols., 2008; Litosch, 2002). Sin embargo, cada vez más estudios muestran que, aun partiendo de los mismos componentes de señalización, cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ es regulada de manera diferente (Roach y cols., 2008; Choi y cols., 2010; Kim y cols., 2011).

En este sentido, las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ muestran diferentes afinidades para su activación tanto a través de la subunidad G $\alpha_{q/11}$ como de las subunidades G $\beta\gamma$ de la proteína heterotrimérica G (Smrcka y Sternweis, 1993; Lee y cols., 1994; Runnels y Scarlata, 1999; Suh y cols., 2008). Además, el trabajo de Poon y cols. (2009) mostró que la combinación de diferentes subunidades β y γ de la proteína heterotrimérica G exhibía preferencias a la hora de activar diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-3)}$. Asimismo, la propia activación de la isoenzima PLC β_4 por la subunidad G $\alpha_{q/11}$ es regulada de manera diferente al ser inhibida por ribonucleótidos (Lee y cols., 1994). De forma que es razonable asumir que las diferentes combinaciones específicas de subunidades de proteína heterotrimérica G se localizarán cerca de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ afines para mediar la activación de los GPCRs. Siendo estas combinaciones y su regulación las responsables de dirigir la señalización de cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ hacia la respuesta celular.

Asimismo, las diferentes secuencias de anclaje PDZ que contiene cada isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ podrían promover su interacción con diferentes proteínas con dominios PDZ, involucrándolas en diferentes vías de señalización mediadas por GPCRS (Kim y cols., 2011).

De manera que, no solo la diferente afinidad que cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ muestra para interaccionar, ser activada y activar los diversos componentes de las señalización mediada por GPCRs, sino que además, la formación de complejos de señalización a través de dominios PDZ en localizaciones concretas de la célula, permiten que cada isoenzima PLC $\beta_{(1-4)}$ se acople selectivamente a receptores y medie respuestas celulares específicas y efectivas.

El acoplamiento diferencial de receptores a distintas isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ podría explicar por qué determinados receptores acoplados a proteínas G $_{q/11}$ como los receptores adrenérgicos α_1 , los receptores ET $_A$ y los receptores AT $_1$ inducen hipertrofia cardíaca mientras que otros como los receptores purinérgicos P2Y $_2$ no la inducen (Sánchez-Fernández y cols., 2014; Burnstock y Pelleg, 2015). Asimismo, se desconoce

si aquellos receptores que se acoplan a proteínas $G_{\alpha_q/11}$ y producen hipertrofia en cardiomiocitos, interactúan y activan las mismas isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$. En este sentido, varios trabajos muestran diferencias en la activación y en la regulación de las isoenzimas tras estimular los cardiomiocitos con diferentes agentes hipertróficos, en la línea de los resultados obtenidos en este trabajo. Por un lado, Eskildsen-Helmond y cols. (1997) ya demostraron en cardiomiocitos de rata neonata diferencias en la capacidad de estimulación de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ entre AT II ($0,1 \mu\text{M}$) y PE ($10 \mu\text{M}$) tras incubaciones de 10 a 40 minutos. Si bien la PE provocó una fuerte estimulación de la formación de IP_3 (4,3 veces mayor que el basal), la estimulación de la AT II resultó más débil (1,8 veces mayor el basal). Estos resultados fueron explicados por los autores en base a la rápida desensibilización de los receptores AT_1 (Abdellatif y cols., 1991; Turu y cols., 2006). Sin embargo, no estudiaron la posible implicación de diferentes isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$. De igual modo, Ruf y cols. (2002) mostraron en cardiomiocitos de rata adulta que el efecto hipertrófico originado por el tratamiento con PE ($10 \mu\text{M}$, 24 h) o por AT II ($1 \mu\text{M}$, 24 h) comprometía diferentes elementos de la señalización intracelular. La estimulación de los receptores adrenérgicos α_1 incrementó fuertemente la síntesis proteica a través de la activación de un amplio espectro de isoformas PKC y de manera independiente a la vía ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), mientras que la AT II aumentó la síntesis proteica de manera menos eficiente mediante la activación de isoformas PKC dependientes del calcio y la vía ERK. Por otro lado, Bai y cols. (2004) observaron que la AT II inducía la sobrerregulación de $G_{\alpha_q/11}$, $PLC\beta_3$ y ERK1/2 en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata, y que ésta era inhibida por losartan. Asimismo, en 2006, Singal y cols. determinaron en cardiomiocitos de rata adulta que la activación de las $PLC\beta_{(1-4)}$ con NA estimulaba la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_3$ de manera tiempo- y concentración-dependiente, y que la PE resultaba aún más eficiente en la inducción de la expresión génica de estas isoenzimas. Posteriormente, en 2009, Filtz y cols. demostraron que en cardiomiocitos de rata neonata es la isoenzima $PLC\beta_{1b}$ la responsable de la respuesta hipertrófica mediada por la activación de los receptores adrenérgicos α_1 , aunque en este tipo celular estén presentes tanto las isoenzimas $PLC\beta_{1a/b}$ como la $PLC\beta_3$. Sin embargo, la utilización en este estudio de bloqueantes de los receptores adrenérgicos β_1 , como el propanolol, que impiden la generación de AMPc, así como la débil respuesta obtenida en la generación de IP_3 en comparación con otros estudios similares realizados sin la aplicación de β -bloqueantes, hace dudar de si otras isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ no están involucradas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca en condiciones fisiológicas. La disminución de los niveles de AMPc podría estar inhibiendo la actividad de la isoenzima $PLC\beta_4$, enmascarando su implicación en la respuesta hipertrófica. Ninguno de estos trabajos estudió la isoenzima $PLC\beta_4$ en sus ensayos, isoenzima caracterizada por primera vez en tejido cardíaco en 2010, fruto del presente proyecto de tesis (Otaegui y cols., 2010); ni profundizó en las diferencias de acoplamiento que podrían darse entre los receptores y las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en la señalización hipertrófica.

En este sentido, cada vez son más los trabajos que demuestran que no todos los receptores acoplados a proteínas $G_{q/11}$ activan de forma homogénea las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$. Así, por ejemplo, en células derivadas de ovario de hámster chino (células CHO) se observó que la activación de los receptores purinérgicos $P2Y_2$ y de los muscarínicos colinérgicos M_3 generaba diferentes perfiles de activación de las $PLC\beta_{(1-4)}$ (Strassheim y Williams, 2000). Los autores demostraron que la activación de los receptores purinérgicos $P2Y_2$ causaba la asociación de la proteína $G_{q/11}$ a la isoenzima $PLC\beta_3$, mientras que la activación de los receptores muscarínicos M_3 AChR inducía la asociación tanto a la isoenzima $PLC\beta_1$ como a la $PLC\beta_3$. Asimismo, comprobaron que la PKC participaba en un bucle de retroalimentación negativa que inhibía la interacción de $G_{q/11}$ con la isoenzima $PLC\beta_3$, limitando la duración de su actividad. De manera que la activación de isoformas específicas de $PLC\beta_{(1-4)}$ con diferente sensibilidad a la inhibición por PKC, proporciona un mecanismo añadido a la regulación temporal de la actividad de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ mediada por GPCRs. Por otro lado, en células HeLa, Choi y cols. (2010) demostraron, mediante la utilización de ARN interferente (siRNA, *small interfering RNA*) para suprimir la expresión de las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_3$, que la movilización intracelular del Ca^{2+} provocada por la activación de los receptores B2R para la bradiquinina y los receptores LPA_2 para el ácido lisofosfatídico (LPA) era mediada por su interacción con la isoenzima $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_3$, respectivamente. Además, pusieron de manifiesto que la interacción era posible gracias al reclutamiento de dos proteínas PDZ específicas, PAR-3 (*Protease activated receptor-3*) y NHERF2 (*Sodium-hydrogen exchange regulatory cofactor 2*), respectivamente; demostrando que a través de diferentes proteínas PDZ cada isoenzima $PLC\beta_{(1-4)}$ puede acoplarse selectivamente a un receptor y desempeñar una función específica y diferente en el mismo tipo celular. Asimismo, en esta misma línea celular, Ishida y cols. (2014) probaron que las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_4$ contribuían a la variedad intercelular no-génica observada en la señalización del Ca^{2+} provocada por la histamina. Lograron demostrar que la heterogeneidad en la producción de IP_3 era la causa principal de la variabilidad intercelular en los patrones de señalización del Ca^{2+} , y que la activación específica de las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_4$ era el factor que contribuía al diferente patrón en la producción de IP_3 . Observaron que en células donde la isoenzima $PLC\beta_1$ era la dominante el Ca^{2+} sufría oscilaciones de baja frecuencia, mientras que en aquellas donde la isoenzima dominante era la $PLC\beta_4$ las oscilaciones del Ca^{2+} eran de alta frecuencia. Resultados interesantes ya que Colella y cols. (2008) mostraron que el incremento prolongado de la frecuencia de las oscilaciones del Ca^{2+} en cardiomiocitos de rata neonata, es capaz de activar la vía de la calcineurina/NFAT y, finalmente, convertirse en señal hipertrófica. Por su parte, en 2008, Roach y cols. demostraron en macrófagos, obtenidos de ratones *knockout* deficientes en $PLC\beta_{(1-4)}$, que los mediadores de inflamación e infección C5a y UDP activaban selectivamente diferentes isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ a través de sus respectivos receptores C5aR y P246. Sin embargo, la preferencia principal mostrada por la isoenzima $PLC\beta_3$, y parcialmente por la $PLC\beta_4$, no correlacionó con niveles superiores de expresión de los transcritos de ambas

isoenzimas. Este hecho indica que, si bien el nivel de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ suele reflejar su nivel de expresión proteica (Singal y cols., 2009), no será siempre el reflejo de la activación preferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ por parte de las GPCRs.

Por tanto, los resultados de este apartado sugieren que el tratamiento hipertrófico de los cardiomicitos HL-1 con AT II y PE regula de manera diferencial la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$, aunque con aumento de la isoenzima PLC β_4 en ambos casos, subrayando la importancia del papel que esta isoenzima podría desempeñar en la HVI. Las diferencias en la regulación observadas están acorde con aquellos trabajos dónde se ha venido demostrando la complejidad del entramado de señalización de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$. Hasta fechas recientes la activación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ podría simplificarse en el esquema: estimulación del receptor \rightarrow proteína heterotrímica G $_{q/11}$ \rightarrow PLC $\beta_{(1-4)}$. Sin embargo, cuantiosos trabajos reflejan que además de la activación de un determinado tipo de receptor, existen muchos otros factores responsables que regulan la actividad de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y median su respuesta celular específica: la afinidad de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ con las diferentes subunidades de la proteína heterotrimérica G $_{q/11}$ y las proteínas efectoras, su interacción con las proteínas de andamiaje, su susceptibilidad a la inhibición por proteínas reguladoras, su localización subcelular, el tipo celular dónde se encuentren, y sus variaciones de cantidad expresada, entre otros.

Si bien las evidencias sitúan a la activación de la proteína G $_{q/11}$ y las PLC $\beta_{(1-4)}$ en el centro de la señalización de la HVI, en la actualidad existe un gran desconocimiento acerca de la compleja red que rodea a la activación estas isoenzimas. Por lo que será importante desentramar, por una parte, el complejo entramado de señalización de los receptores acoplados a proteínas G $_{\alpha q/11}$ y su específica interacción con las proteínas del entorno. Y por otra, determinar cuál o cuáles de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ están involucradas en cada una de las vías de señalización iniciadas por los receptores inductores de la hipertrofia, así como en los diferentes tipos celulares y localizaciones que comprenden el ventrículo cardíaco hipertrofiado. Todo ello permitirá la generación de herramientas farmacológicamente selectivas, que ayudarán a inhibir específicamente el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica, y a su vez, a reducir la población afectada por insuficiencia cardíaca.

3. Estudio de la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo de pacientes con estenosis aórtica severa

3.1 La expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en VI humano patológico con estenosis aórtica severa y control con estenosis mitral

El análisis de la expresión génica relativa de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en muestras del VI de pacientes con EAo severa reveló que la isoenzima PLC β_1 era la más expresada tanto en PL como en el SI. La segunda isoenzima más expresada en las biopsias fue la PLC β_4 , mientras que las menos expresadas fueron las isoenzimas PLC β_2 y PLC β_3 . No hubo diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de ambas localizaciones.

Por otro lado, el patrón obtenido en las muestras de VI del único paciente control con EM reveló que la expresión génica de las diferentes isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ era similar al encontrado en los pacientes con EAo severa. Disponer de un único paciente control impidió poder realizar una comparación estadística y determinar si la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ se ve alterada en alguna de las localizaciones del miocardio estudiadas en la HVI por sobrecarga de presión.

Sin embargo, los resultados del VI humano patológico mostraron un patrón de expresión diferente al determinado en VI humano control sano, donde la isoenzima PLC β_1 era la menos expresada (**Figura 33**). Teniendo en cuenta la similitud entre el patrón de los pacientes con EAo severa y del único caso de EM, y su diferencia respecto a las muestras control, los resultados podrían indicar que si bien la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ del VI no parece estar alterada en pacientes con EAo, podría variar, entre otros factores, con la edad. Diversos estudios han demostrado variaciones en la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ con la edad. De este modo, Di Pietro y cols. (2000) describieron cambios en la expresión y distribución de las PLC en linfocitos T con la edad, principalmente la disminución de la expresión de la isoenzima PLC β_2 en linfocitos T de pacientes entre 65 y 75 años; Ruiz de Azúa y cols. (2006) demostraron cambios en el patrón de expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ de la corteza prefrontal a lo largo del desarrollo cerebral humano; y Mizutani y cols. (1998) observaron cambios en la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-2)}$ en diversos órganos de ratas ancianas (de entre 82 y 88 semanas).

3.2 Implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en el remodelado cardíaco y la disfunción cardíaca en pacientes con estenosis aórtica severa

Los presentes resultados sugieren que varias isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ podrían estar involucradas en procesos histomorfológicos característicos del remodelado cardíaco, como la hipertrofia cardiomiocitaria o la fibrosis, y en la disfunción sistólica y diastólica de pacientes con EAo. Además, la implicación de las isoenzimas podría variar según la región anatómica del VI estudiada.

Los hallazgos más relevantes son los siguientes:

En SI de pacientes con EAo severa, por un lado, la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 se asocia de forma positiva con el diámetro cardiomiocitario, con la onda E y con el promedio E/e', mientras que lo hace de forma negativa con la media del desplazamiento sistólico anterior del anillo mitral. De manera que estos hallazgos sugieren que el incremento de la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 está asociado a la disfunción sistólica y diastólica del corazón. Y por otro lado, los niveles del transcrito de la isoenzima PLC β_4 se asocian de forma positiva con el depósito de colágeno no misial.

En PL de pacientes con EAo severa, por un lado, la expresión génica de las isoenzimas PLC β_1 y PLC β_2 se asocia de forma positiva con el GPR. Por otro lado, la isoenzima PLC β_3 se asocia de forma positiva con el depósito de colágeno no misial. Y por último, la isoenzima PLC β_4 se asocia de forma negativa con el diámetro cardiomiocitario y de forma directa con el deterioro de la función diastólica (disminución del promedio e').

Los diversos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* sugieren un papel importante de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en varias patologías cardíacas. La isoenzima PLC β_1 ha sido involucrada en la hipertrofia cardíaca por sobrecarga de volumen en ratas (Dent y cols., 2004), en la hipertrofia de cardiomiocitos de rata neonata (Filtz y cols., 2009), en disfunciones contráctiles del corazón en ratones (Grubb y cols., 2015), así como en procesos de infarto de miocardio en rata junto con la isoenzima PLC β_3 (Ju y cols., 1998). Asimismo, la isoenzima PLC β_3 ha sido relacionada con el desarrollo de la hipertensión en ratas (Zhang y cols., 2016). Sin embargo, son escasos los estudios realizados en humano. Si bien la expresión de la isoenzima PLC β_1 ha sido determinada en VI de pacientes con cardiomiopatía dilatada y en aurícula izquierda de pacientes con disfunción mitral (Schnabel y cols., 1996; Woodcock y cols., 2009, respectivamente), los resultados del presente trabajo, son los primeros según la literatura donde las isoenzimas PLC β_2 , PLC β_3 y PLC β_4 han sido relacionadas con procesos hipertróficos patológicos en corazón humano.

La dificultad que a lo largo del tiempo ha habido para demostrar la expresión de la isoenzima PLC β_2 en tejido cardíaco (en VI humano (Schnabel y cols., 1996), en rata (Jhon y cols., 1993)), ha significado un estudio escaso de su implicación en el proceso de la hipertrofia cardíaca. Sin embargo, González-Yanes y cols. (2001) demostraron la expresión proteica de esta isoenzima en corazón de rata, y los resultados del presente trabajo vienen a corroborar la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 tanto en VI de personas sanas, así como en VI de personas con EAo severa.

En SI de nuestros pacientes con EAo, la isoenzima PLC β_2 es una de las menos expresadas, sin embargo, su nivel de expresión génica se asocia con varios parámetros histomorfológicos y funcionales cardíacos determinados a los pacientes. La isoenzima PLC β_2 se expresa mayoritariamente en células de origen hematopoyético, y desempeña un papel importante en la señalización leucocitaria y en los mecanismos inmunitarios (Kawakami y Xiao, 2013). Además, cada vez es más evidente el importante papel que las células inmunitarias desempeñan en el daño cardíaco, donde su actividad precede a la hipertrofia y persiste a lo largo de la respuesta hipertrófica maladaptativa, teniendo un papel importante en el remodelado cardíaco (Frierler y Mortensen, 2015). La disminución del diámetro del tracto de salida del VI que sufren los pacientes con EAo severa conduce al aumento de las fuerzas de cizallamiento a nivel septal, lo que provoca que el septo sufra un mayor estrés mecánico, y por consiguiente, padezca apoptosis, fibrosis no misial e inflamación (Dweck y cols., 2012a; Echegaray y cols., 2017). De manera que la isoenzima PLC β_2 detectada en los resultados del presente trabajo podría tener principalmente una procedencia inmunitaria. Los resultados demuestran que cuanto mayor es la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 , mayor es el diámetro de los cardiomiocitos. En este sentido, Duerr y cols. (2013) estudiaron en muestras de SI de pacientes con EAo la asociación entre hipertrofia miocárdica y mediadores de la inflamación. Observaron que tanto el diámetro cardiomiocitario como la infiltración de macrófagos en el intersticio eran significativamente mayores que los determinados en pacientes control. Y por su parte, Grinberg y cols. (2009) demostraron la importante función que la isoenzima PLC β_2 desempeña en la diferenciación de macrófagos. De modo que todo ello podría indicar que la isoenzima PLC β_2 detectada en nuestros pacientes con EAo podría provenir mayoritariamente de células inmunitarias como los macrófagos y que estos podrían inducir la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como la IL-1 β (Epelman y cols., 2014), la IL-12, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Frierler y Mortensen, 2015) y las quimioquinas CCL2 (de *chemokine (CC motif) ligand 2*) y CCL4 (de *chemokine (CC motif) ligand 4*) (Duerr y cols., 2013), e interactuar con los cardiomiocitos induciendo su hipertrofia.

Por otro lado, en relación a la asociación de la isoenzima PLC β_2 y los parámetros clínicos determinados a los pacientes, los resultados muestran que cuanto

mayor es la expresión génica de la isoenzima PLC β_2 en SI, menor es la media del desplazamiento sistólico anterior del anillo mitral (deterioro de la función sistólica), y mayores son la onda E y el promedio E/e' (deterioro de la función diastólica). De manera que los hallazgos sugieren que la mayor expresión génica de la isoenzima PLC β_2 en SI está asociada al deterioro de parámetros de función sistólica y diastólica ventricular. En este sentido, Krayenbuehl y cols. (1989) demostraron que en pacientes con EAo el diámetro de la fibra muscular se asociaba inversamente con la función contráctil del VI. De modo que, estos resultados permitirían especular que aquellos pacientes con mayor expresión de la isoenzima PLC β_2 en SI, desarrollan un mayor tamaño cardiomiocitario y un mayor deterioro de la función sistólica y diastólica ventricular. Por tanto, dada la estrecha asociación existente entre esta isoenzima y los diferentes parámetros funcionales cardíacos determinados en este trabajo, la isoenzima PLC β_2 debería ser relevante en futuros estudios que se realicen al respecto.

Varios estudios han determinado que el diámetro medio de cardiomiocitos del VI en corazón humano sano es aproximadamente entre 11 y 18 μm (Hess y cols., 1981; Hoshino y cols., 1983; Schoen y cols., 1984; Moreno y cols., 2013), mientras que en pacientes con EAo severa entre 17 y 26 μm (Hess y cols., 1981; Schoen y cols., 1984; Duerr y cols., 2013; Moreno y cols., 2013). Los resultados del diámetro cardiomiocitario obtenidos en el presente trabajo van acorde con estos datos. Asimismo, los resultados muestran que en nuestros pacientes con EAo severa el diámetro cardiomiocitario no difiere significativamente entre ambas regiones del VI estudiadas. En este sentido, Schoen y cols. (1984) demostraron que la hipertrofia celular provocada por sobrecarga de presión ocurre de manera uniforme a lo largo de todo el VI humano. Sin embargo, varios trabajos han determinado que los pacientes con EAo presentan un grosor parietal mayor a nivel del septo basal que de la PL (Dweck y cols., 2012b). De modo que la ausencia de diferencia en el diámetro cardiomiocitario entre ambas regiones observada en nuestros pacientes con EAo severa, podría sugerir la existencia de una alteración en la disposición dimensional (*disarray*) de los cardiomiocitos que conduce a un mayor engrosamiento del SI a nivel basal. Esta disimilitud entre el SI y la PL pondría de manifiesto la existencia de diferencias regionales en la regulación del remodelado cardíaco a lo largo del VI en pacientes con EAo severa. En este sentido, los resultados revelan desigualdades en las asociaciones de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ con los diferentes parámetros determinados entre las dos regiones del VI estudiadas. Si bien la isoenzima PLC β_2 se asocia de forma directa y estrecha con el diámetro cardiomiocitario en SI, esta asociación no se repite en PL, mientras que en esta última región sí que lo hace pero de forma inversa, la isoenzima PLC β_4 . Diversos trabajos han mostrado diferencias regionales a lo largo del miocardio, Smith y cols. (1990) demostraron la existencia de variaciones en la actividad enzimática de enzimas relacionadas con el metabolismo y la contractilidad en diferentes regiones del VI de corazón de rata en la hipertrofia cardíaca, evidenciando

que tanto la composición proteica como la regulación de la expresión génica son diferentes entre células vecinas de un mismo órgano.

A diferencia de lo que otros estudios sugieren (Filtz y cols., 2009, Grubb y cols., 2016), la isoenzima PLC β_1 no se asocia con el diámetro cardiomiocitario ni en SI ni en PL de nuestros pacientes con EAo severa. Sin embargo, los resultados revelan la asociación de las isoenzimas PLC β_1 y PLC β_2 con el GPR en PL, indicador ecocardiográfico de la morfología cardíaca. Una posible explicación a este desacuerdo podría ser que la sonda utilizada en la cuantificación de la expresión de la isoenzima PLC β_1 no discrimina entre las dos variantes. Según los estudios realizados por Woodcock y su grupo (Filtz y cols., 2009, Grubb y cols., 2016) únicamente la variante PLC β_{1b} parece estar involucrada en los procesos hipertróficos de la PLC β_1 . Por lo tanto, la variante PLC β_{1a} detectada en nuestro estudio podría estar enmascarando la posible asociación de la isoenzima PLC β_1 con el diámetro cardiomiocitario y los demás parámetros estudiados.

Por otra parte, los resultados revelan que, en PL de los pacientes con EAo severa, la expresión génica de la isoenzima PLC β_4 se asocia de manera negativa con el diámetro cardiomiocitario. Estos datos implican a la isoenzima PLC β_4 en la regulación del tamaño de los cardiomiocitos, de manera que podría ser importante en el proceso hipertrófico. Los resultados, en un principio, no vendrían a corroborar la hipótesis basada en los hallazgos de Ishida y cols. (2014) y Colella y cols. (2008) donde se podría postular que el incremento del diámetro cardiomiocitario podría ser inducido por las oscilaciones de alta frecuencia del Ca²⁺ provocadas por una mayor activación de la isoenzima PLC β_4 . No obstante, se debe tener en cuenta que los niveles de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ no siempre son reflejo de su activación preferencial por parte de las GPCRs, pudiendo, las isoenzimas más activadas, no ser las más expresadas (Roach y cols., 2008). Por otro lado, los niveles de transcripción de la isoenzima PLC β_4 de PL del presente estudio se asocian de forma directa con el promedio del parámetro de función diastólica e'. De manera que cuanto menor es la expresión génica de la isoenzima PLC β_4 en PL, mayor es el diámetro cardiomiocitario y peor es la capacidad de relajación del corazón (deterioro de la función diastólica).

En el presente estudio se han determinado los valores de AT II en sangre tanto a nivel periférico como de seno coronario en pacientes con EAo severa. La principal vía de síntesis de la AT II es la cadena enzimática del sistema renina-angiotensina. Aunque originariamente el sistema renina-angiotensina se consideró un sistema circulante y de acción endocrina, actualmente se conoce la existencia de sistemas renina-angiotensina tisulares que ejercen su acción y sintetizan AT II de manera local, como por ejemplo, la cardíaca (Paul y cols., 2006). Los resultados del presente trabajo muestran un gradiente en los niveles de AT II entre la sangre del seno coronario y la sangre periférica. Si bien el origen principal de la AT II son las células endoteliales del

pulmón (Paul y cols., 2006), no se puede descartar que este péptido sea sintetizado y liberado por el corazón en pacientes con EAo, tal y como lo demostraron Wasywich y cols. (2006). La AT II es un factor eminentemente hipertrófico del corazón (Rohini y cols., 2010; Balakumar y Jagadeesh, 2010) al que se le ha adjudicado un papel importante en la progresión de la disfunción ventricular. Diversos estudios han demostrado que el aumento plasmático de AT II se asocia a mayor mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca, y que esa mortalidad disminuye al administrar a los pacientes un IECA (enalapril) (Swedberg y cols., 1990; Estudio SOLVD, 1991). Los valores de AT II obtenidos en sangre de seno coronario de pacientes con EAo severa del presente trabajo se asocian de forma negativa con el diámetro cardiomiocitario, y de forma positiva con la media del desplazamiento sistólico anterior del anillo mitral (ver resultados en **Anexo 5**). No se ha hallado ninguna asociación entre los niveles de AT II y las isoenzimas PLC β (1-4). Estos resultados revelan que a medida que el diámetro cardiomiocitario aumenta y la función sistólica empeora, los niveles de AT II medidos en seno coronario disminuyen. Resultados contradictorios a lo descrito en la literatura. Una posible explicación a los resultados del presente trabajo podría ser el hecho de que, inicialmente, el estrés por sobrecarga de presión provoque la síntesis de factores neurohumorales como la AT II, induciendo una respuesta hipertrófica compensatoria. Sin embargo, una vez desarrollada la hipertrofia y compensado el estrés al que debe hacer frente la pared ventricular, los niveles de AT II se podrían ver atenuados. De este modo, aquellos pacientes con mayores niveles de AT II se encontrarían en una fase más inicial del proceso hipertrófico, mientras que los pacientes con menores niveles de AT II, estarían en una fase más avanzada, con un diámetro cardiomiocitario mayor y peor función sistólica. Los estudios revisados muestran diversidad en los niveles circulantes de AT II determinados en pacientes con EAo e insuficiencia cardíaca, tanto en el método y las unidades de cuantificación, así como en los resultados presentados (Ramirez-Gil y cols., 1992; Roig y cols., 2000; Wasywich y cols., 2006; Côté y cols., 2009); heterogeneidad que dificulta la comparación entre diferentes trabajos. Resumiendo, los resultados varían desde 16 pg/mL hasta 0,40 ng/mL (Roig y cols., 2000; Côté y cols., 2009). De manera que los niveles de AT II observados en nuestros pacientes no son muy elevados. En este sentido, Heller y cols. (1998) estudiaron la dinámica de los niveles de renina y angiotensinógeno en un modelo hipertrofia cardíaca generado por sobrecarga de presión en rata. Si bien 3 días después de la constricción aórtica las concentraciones de renina, aunque no significativamente elevadas, se correlacionaron positivamente con la masa cardíaca relativa, tras 42 días, los niveles de renina no fueron diferentes a los de las ratas con operación simulada (*shams*), y no hubo correlación entre la renina y la masa cardíaca relativa. Postulando que una vez realizada la respuesta hipertrófica compensatoria, el nivel de las señales vuelve a valores normales, logrando un estado estacionario donde la masa cardíaca está aumentada y los niveles de renina y angiotensinógeno son normales. Por otro lado, Ramirez-Gil y cols. (1992) determinaron los niveles plasmáticos de AT II y de la actividad de la renina en pacientes con EAo (NYHA II-III),

y observaron que eran normales, indicativo de ausencia de la activación del sistema renina-angiotensina en estos pacientes. Resultados acordes con los de este trabajo. No obstante, diversos estudios retrospectivos y no randomizados han demostrado que el tratamiento con IECAs y ARAs está asociado a un mayor índice de supervivencia y un menor riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con EAo (Nadir y cols., 2011). Asimismo, estudios realizados en pacientes con insuficiencia cardíaca debido a cardiomiopatía dilatada y cardiomiopatía isquémica han demostrado que los niveles de AT II aumentan con la progresión de la insuficiencia cardíaca (Serner y cols., 2001). Por tanto, aunque los resultados obtenidos en pacientes con insuficiencia cardíaca de otra etiología hagan considerar la sobreactivación del sistema renina-angiotensina una pieza fundamental en la progresión de la hipertrofia cardíaca hacia la insuficiencia cardíaca, mayor número de estudios son necesarios para determinar la evolución que sufren los niveles de AT II y su función en el desarrollo de la EAo severa.

Además del aumento del tamaño miocitario, la HVI suele estar acompañada de pérdida de cardiomiocitos, activación de miofibroblastos y acumulación de colágeno (Villari y cols., 1993). Con el objetivo de estudiar si las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ pudieran estar involucradas en el proceso de fibrosis en la EAo severa, se analizaron las posibles asociaciones entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ y la FVC y los niveles circulantes en suero de las moléculas derivadas del metabolismo del colágeno. Los resultados muestran de nuevo diferencias en ambas regiones del miocardio estudiadas.

Por un lado, en PL de nuestros pacientes con EAo severa, los niveles del transcrito de la isoenzima $PLC\beta_3$ se asocian de manera positiva con el depósito de colágeno no mial (reparativo o cicatricial). Resultados acordes con los de Ju y cols. (1998), en los cuales demostraron que la expresión proteica de la proteína heterotrimérica $G\alpha_q$ y el de las isoenzimas $PLC\beta_1$ y $PLC\beta_3$ está aumentada en tejido cicatricial de miocardio infartado de rata. Sin embargo, el análisis del efecto de los factores de confusión mostró que la asociación entre la isoenzima $PLC\beta_3$ y la FVC no mial en PL de los pacientes con EAo severa no es independiente del IMVI. Asimismo, la ausencia de asociación con los biomarcadores de degradación del colágeno hace que futuros estudios sean necesarios para ahondar con mayor profundidad en el mecanismo por el cuál esta isoenzima pudiera estar implicada en el proceso fibrótico en pacientes con EAo. No obstante, si bien son necesarios estudios de mayor profundidad para confirmar la asociación entre la expresión de la isoenzima $PLC\beta_3$ y la fibrosis miocárdica, los presentes resultados van en la línea de los obtenidos por Ju y cols. (1998), y permiten postular que la isoenzima $PLC\beta_3$ podría tener un papel en el desarrollo de la fibrosis miocárdica.

Por otro lado, en SI de los pacientes con EAo severa, es la expresión génica de la isoenzima $PLC\beta_4$ la que se asocia de forma negativa con el índice de degradación del

colágeno tipo I del seno coronario (ratio MMP-1/TIMP1) y de manera positiva con el depósito de colágeno no misial (reparativo o cicatricial). De manera que los resultados sugieren que cuanto mayor es la expresión de la isoenzima PLC β_4 , menor es la actividad proteásica contra las fibras de colágeno tipo I, y mayor el depósito de colágeno reparativo. En este sentido, si bien no se han encontrado trabajos donde se implique directamente a la isoenzima PLC β_4 en el proceso fibrótico, varios trabajos han demostrado la implicación de las isoenzimas PLC en la síntesis de la matriz extracelular. Zhang y cols. (2014) demostraron en fibroblastos cardíacos de rata neonata que la activación de receptores sensibles al calcio (CaR) promueve la proliferación de fibroblastos y la formación de la MEC a través de la activación de la vía PLC-IP $_3$. Teniendo en cuenta que la isoenzima PLC β_4 es inhibida por ribonucleótidos como el adenosín trifosfato (ATP) o GTP, pero no por ribonucleótidos cíclicos (Lee y cols., 1994), la posible participación de esta isoenzima en la síntesis o degradación de colágeno en condiciones no-patológicas debe ser limitada. Sin embargo, bajo la hiperactivación del sistema noradrenérgico que padecen los pacientes con EAo, y posterior aumento de ribonucleótidos cíclicos como el AMPc (Dzimiri y cols. 1996), la inhibición tónica de la isoenzima PLC β_4 podría ser parcialmente aliviada, promoviendo, así, su actividad. En este sentido, la NA (Briest y cols., 2003), así como los receptores α -adrenérgicos (Lai y cols., 2009) han sido implicados en el proceso fibrótico. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no han determinado ninguna asociación entre los niveles séricos de NA y la expresión génica de la isoenzima PLC β_4 en nuestros pacientes con EAo severa. El hecho de que la concentración plasmática de NA determinada en pacientes con EAo en otros estudios sea diez veces superior (Ramirez-Gil y cols., 1992; Dzimiri y cols., 1996) podría ser explicado por variaciones en los métodos de detección empleados y su sensibilidad. No obstante, los niveles de NA se asocian de forma positiva con el depósito de colágeno total y no misial (reparativo o cicatricial) de la PL (ver resultados en **Anexo 5**), no, en cambio, en SI. Por otro lado, ni la expresión génica de la isoenzima PLC β_4 en SI, ni los niveles de NA se asocian con ninguno de los parámetros clínicos determinados a los pacientes. Probablemente debido al número relativamente pequeño de pacientes estudiados. Por tanto, los resultados de este trabajo destacan, por primera vez, la importancia de la isoenzima PLC β_4 en el remodelado de la matriz extracelular. Futuros estudios serán necesarios para determinar, por una parte, si los receptores α -adrenérgicos juegan un papel en la activación de la isoenzima PLC β_4 , y por otra, si esta isoenzima desempeña un papel significativo en la fisiopatología cardíaca.

En conclusión, en el presente trabajo se ha estudiado la asociación entre la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ y el diámetro cardiomiocitario, la fibrosis y los parámetros clínicos y ecocardiográficos en pacientes con EAo severa. Los hallazgos de este trabajo demuestran, por un lado, la participación de la isoenzima PLC β_2 en la hipertrofia cardiomiocitaria así como en la función sistólica y diastólica en pacientes con EAo severa. Y por otro lado, la implicación de las isoenzimas PLC β_3 y PLC β_4 en un

proceso crucial que acompaña al proceso hipertrófico miocárdico, como el fibrótico. Además, los resultados muestran que la implicación de las isoenzimas varía según la región anatómica del VI estudiada. Es la primera vez que las isoenzimas PLC β_2 , PLC β_3 y PLC β_4 parecen estar involucrados en una enfermedad clínica relevante como la EAO severa.

4. Limitaciones del estudio

Es preciso reconocer algunas limitaciones del presente trabajo.

En primer lugar, este estudio ha incluido a un número relativamente pequeño de pacientes que puede haber influido en el resultado final. Sin embargo, debido a los objetivos bajo investigación y a la naturaleza invasiva del estudio, el diseño del estudio se considera adecuado.

En segundo lugar, disponer de un único paciente control con EM impidió poder realizar una comparación estadística y determinar si la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ se ve alterada en la EAo severa.

Asimismo, debido al tamaño limitado de la muestra de la biopsia y a la invasibilidad de la técnica se han determinado los niveles de transcripción de ARNm por qRT-PCR y no la expresión proteica o la actividad de la isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$.

La medicación intercurrente en la que se encontraban los pacientes en el momento de la cirugía podría haber interferido con los resultados. El empleo de IECAs o bloqueantes β -adrenérgicos han demostrado interferir en el desarrollo de la HVI. Sin embargo, el análisis de correlaciones parciales evidenció o descartó cualquier modificación significativa potencial de los resultados observados.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- La isoenzima $PLC\beta_4$ se expresa tanto a nivel génico como a nivel proteico en VI humano, VI de rata, VI de ratón y en cardiomiocitos murinos HL-1.
- 2.- El transcrito de $PLC\beta_4$ es el más expresado en VI humano control, VI de rata y VI de ratón, y uno de los más expresados en cardiomiocitos HL-1.
- 3.- El tratamiento hipertrófico con angiotensina II $1\ \mu\text{M}$ y con fenilefrina $10\ \mu\text{M}$ regula de manera diferencial la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1.
- 4.- Tanto la angiotensina II $1\ \mu\text{M}$ como la fenilefrina $10\ \mu\text{M}$ alteran la expresión génica de la $PLC\beta_4$ en cardiomiocitos HL-1.
- 5.- Las cuatro isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ se expresan a nivel génico en VI de pacientes con EAo severa, siendo el transcrito de la isoenzima $PLC\beta_1$ el más expresado tanto en PL como en el SI.
- 6.- No existen diferencias en el patrón de expresión de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en PL y en SI de pacientes con EAo severa.
- 7.- Los niveles circulantes de angiotensina II y noradrenalina, tanto de sangre periférica como en seno coronario, no se asocian a la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en VI de pacientes con EAo severa.
- 8.- Dado el reducido número de pacientes disponibles y la gran cantidad de variables analizadas, el estudio de asociación entre la expresión génica de las isoenzimas $PLC\beta_{(1-4)}$ en VI y las variables morfológicas, histológicas y de función ventricular presentadas por los pacientes con EAo severa sólo permite sugerir tendencias:
 - a) Contraintuitivamente, los mayores diámetros cardiomiocitarios del SI y los menores grados de desplazamiento sistólico del anillo mitral se asocian de forma inversa con los niveles circulantes de AT II.
 - b) La expresión génica de la isoenzima $PLC\beta_1$ del VI no se asocia con el diámetro cardiomiocitario, ni con la función sistólica ni la función diastólica.
 - c) La mayor expresión génica de la isoenzima $PLC\beta_2$ se asocia de forma directa con el diámetro cardiomiocitario a nivel septal.

- d) La mayor expresión génica de la isoenzima PLC β_2 a nivel septal se asocia con un deterioro de parámetros de función sistólica y diastólica (menor desplazamiento sistólico del anillo mitral y mayor E/e').
- e) La expresión génica de la isoenzima PLC β_3 se asocia de forma positiva con el depósito de colágeno no misial (reparativo o cicatricial) en PL.
- f) Los niveles de transcripción de la isoenzima PLC β_4 se asocian de forma negativa con el diámetro cardiomiocitario en PL y de forma directa con el deterioro de la función diastólica (disminución de e').
- g) La expresión génica de la isoenzima PLC β_4 se asocia de forma negativa con la actividad metaloproteinásica (ratio MMP-1/TIMP1) y de manera positiva con el depósito de colágeno no misial (reparativo o cicatricial) en SI.

Anexos

Anexo 1: Reactivos y tampones

A) Biología molecular

Extracción de proteínas:

- Deoxicolato de sodio, DOC (*Sodium deoxycholate monohydrate*, ref. D5670, Sigma-Aldrich)
- EGTA (*Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*, EGTA, ref. 34596, Fluka)
- NaCl (*Sodium Chloride for analysis*, ref. 131659, Panreac)
- Nonidet P 40 (*Nonidet™ P 40 Substitute*, ref. 74385, Sigma-Aldrich)
- SDS (*Dodecyl sulfate sodium salt*, ref. 1137600100, Merck Millipore)
- Tris (*Tris base*, ref. 2264, Panreac)

Tampón Tris-EGTA:

Tris-HCl 20 mM (pH 7,4)

EGTA 1 mM (pH 7)

Tampón RIPA:

Tris 9,2 mM

EGTA 0,92 mM

NaCl 150 mM

SDS 0,1%

Nonidet P 40 1%

DOC 0,05%

Ajustar pH 7,4 y añadir inhibidores de proteasas

Cuantificación de proteínas por método Bradford:

- Albúmina de suero de bovino, BSA (*Bovine Serum Albumin*, ref. A7030, Sigma-Aldrich)
- Reactivo Bradford (*Bradford Reagent*, ref. B6916, Sigma-Aldrich)
- Tris (*Tris base*, ref. 2264, Panreac)

Stock BSA 2 mg/mL

Tris-HCl 250 mM 1 mL

BSA 2 mg

Tampón Tris-HCl 250 mM

Western blot:

- Azul de bromofenol (*Bromophenol blue*, ref. 114391, Sigma-Aldrich)
- Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco, PBS 10X (PBS 10 x, ref. 44592, BioSystems)
- Glicerol (*Glycerol*, ref. 211339, Panreac)

- Glicina (*Glycine*, ref. G7126, Sigma-Aldrich)
- Metanol (*Methanol*, ref. 221091.1612, Panreac)
- NaCl (*Sodium Chloride for analysis*, ref. 131659, Panreac)
- SDS (*Dodecyl sulfate sodium salt*, ref. 1137600100, Merck Millipore)
- Tris (*Tris base*, ref. 2264, Panreac)
- Tween 20 (*Tween® 20*, ref. 212312, Panreac)
- β -mercaptoetanol (*2-mercaptoethanol*, ref. M6250, Sigma-Aldrich)

Solución de bloqueo

TBS-Tween 20

Leche desnatada sin calcio en polvo 5%

Tampón de electroforesis 1X

Tris 25 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,1%

Tampón de muestra 2X

Tris-HCl 125 mM (pH 6,8)

SDS 2%

Glicerol 20%

β -mercaptoetanol 10%

Azul de bromofenol 0,01%

Tampón de transferencia 1X

Tris-HCl 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 0,037%

Metanol 20%

TBS-Tween 20 pH 7,5

Tris 20 mM

NaCl 500 mM

Tween 20 0,05%

Inmunofluorescencia:

- DAPI (*DAPI, (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)*, ref. D1306, Life Technologies)
- Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco, PBS 10X (PBS 10 x, ref. 44592, BioSystems)
- Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco sin calcio y magnesio, DPBS 1X (DPBS, *no calcium, no magnesium*, ref. 14190-144, Life Technologies)
- Paraformaldehido (*Paraformaldehyde*, ref. P6148, Sigma-Aldrich)
- Saponina (*Saponin*, ref. 47036, Sigma-Aldrich)
- Suero de cabra (*Goat serum*, ref. G9023, Sigma-Aldrich)

Paraformaldehído 3% pH 7

Paraformaldehído 3%

Agua destilada 87%

Disolver el paraformaldehído en agua destilada templada en agitación, añadir 2 gotas de NAOH 1N para ayudar a disolver.

PBS 10X 10%

*Ajustar pH a 7,4***Solución DAPI 0,5 µg/mL**

Suero de cabra al 2%

Stock DAPI 50 µg/mL 1:1000

Solución de bloqueo

Suero de cabra 2%

Saponina 0,2%

DPBS

Stock DAPI 50 µg/mL

Stock DAPI 5 mg/mL

Agua destilada 1:100

Suero de cabra al 2%

Suero de cabra 2%

DPBS

B) Cultivos celulares**Cardiomiocitos HL-1:**

- Ácido ascórbico (*L(+)-Ascorbic acid sodium salt*, ref. A7631, Sigma-Aldrich)
- Angiotensina II (*Angiotensin II*, ref. 1158, Tocris)
- Azul de tripán 0,4% (*Trypan Blue solution*, ref. T8154, Sigma-Aldrich)
- Dimetil sulfóxido, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide for cell culture*, ref. A3672, Panreac-Applichem)
- Fenilefrina (*(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride*, ref. P6126, Sigma-Aldrich)
- Fibronectina (*Fibronectin from bovine plasma*, ref. F-1141, Sigma-Aldrich)
- Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco, PBS 10X (PBS 10 x, ref. 44592, BioSystems)
- Fosfato salino tamponado modificado por Dulbecco sin calcio y magnesio, DPBS 1X (DPBS, *no calcium, no magnesium*, ref. 14190-144, Life Technologies)
- Gelatina (*Difco™ Gelatin*, ref. 214340, BD)
- L-glutamina (*L-Glutamine 200 nM*, ref. 25030-081, Life Technologies)
- Medio Claycomb (*Claycomb Medium*, ref. 51800C, Sigma-Aldrich)

- Noradrenalina ((±)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt, ref. A0937, Sigma-Aldrich)
- Penicilina/Estreptomicina (*Penicilin/Streptomycin 10 000 U/mL*, ref, 12103-122, Life Technologies)
- Soybean trypsin inhibitor (*Soybean trypsin inhibitor*, ref. 17075-029, Life Technologies)
- Suero fetal bovino, *FBS (Fetal Bovine Serum*, ref. 12103C-500mL, Sigma-Aldrich)
- Tripsina/EDTA (*Trypsin-EDTA 0.05%*, ref. 25300-054, Life Technologies)

Gelatina/fibronectina

Gelatina autoclavada al 0,02%

Fibronectina 1:200

Medio Claycomb suplementado con noradrenalina

FBS 10%

Penicilina/Estreptomicina 100 U/mL: 100 µg/mL

L-glutamina 2 mM

Noradrenalina 0,1 mM

Medio Claycomb

Medio Claycomb suplementado sin noradrenalina ni FBS

Penicilina/Estreptomicina 100 U/mL: 100 µg/mL

L-glutamina 2 mM

Medio Claycomb

Medio de congelación

FBS 95%

DMSO 5%

Medio de lavado

FBS 5%

Penicilina/Estreptomicina 100 U/mL: 100 µg/mL

Medio Claycomb

Medio de tratamiento angiotensina II 1 µM sin noradrenalina ni FBS

Penicilina/Estreptomicina 100 U/mL: 100 µg/mL

L-glutamina 2 mM

Angiotensina II 1 µM

Medio Claycomb

Medio de tratamiento fenilefrina 10 µM sin noradrenalina ni FBS

Penicilina/Estreptomicina 100 U/mL: 100 µg/mL

L-glutamina 2 mM

Fenilefrina 10 µM

Medio Claycomb

Solución inhibidora de tripsina 0,25 mg/mL

PBS 1X

Soybean trypsin inhibitor 0,25 mg/mL

Disolver y filtrar en campana con filtro 0,22 μ m

Stock angiotensina II 100 μ M

PBS 1X

Angiotensina II 100 μ M

Disolver y filtrar en campana con filtro 0,22 μ m

Stock fenilefrina 1 mM

PBS 1X

Fenilefrina 1 mM

Disolver y filtrar en campana con filtro 0,22 μ m

Stock noradrenalina 10 mM

Ácido ascórbico 30 mM

Noradrenalina 10 mM

Filtrar en campana con filtro 0,22 μ m

Anexo 2: Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario, GPR, IMVI y FVC en pacientes con EAo

Se procedió a comprobar el grado de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de PL y SI, las variables morfológicas, el IAVAo, y la FVC de PL y SI en pacientes con EAo (**Tabla 15**).

Tabla 15. Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de PL de VI y SI, índices de morfología y la fracción de volumen de colágeno en pacientes con EAo

Parámetros	Diámetro PL		Diámetro SI		GPR		IMVI	
	r	p	r	p	r	p	r	p
GPR	-0,056	0,849					0,179	0,508
IMVI	0,661*	<u>0,010</u>	0,315	0,295	0,179	0,508		
IAVAo	-0,042	0,876	-0,471	0,076	-0,191	0,478	-0,175	0,541
Log FVC PL total	-0,120	0,658			-0,217	0,437	-0,103	0,716
Log FVC PL misial	0,130	0,632			-0,233	0,402	-0,146	0,603
Log FVC PL no misial	-0,140	0,605			-0,155	0,582	-0,071	0,801
Log FVC SI total			-0,077	0,785			-0,016	0,954
Log FVC SI misial			0,260	0,349			0,097	0,719
Log FVC SI no misial			-0,262	0,346			-0,016	0,954

PL: pared libre de ventrículo izquierdo; VI: ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; EAo: estenosis aórtica severa; GPR: grosor parietal relativo; IMVI: índice masa ventricular izquierda; IAVAo: índice área valvular aórtica; Log: logaritmo; FVC: fracción de volumen de colágeno; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18) (*P<0,05. Correlación de Pearson).

Anexo 3: Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario, GPR, IMVI y los parámetros ecocardiográficos en pacientes con EAo

Se estudió la asociación existente entre parámetros asociados a la hipertrofia cardíaca como el diámetro cardiomiocitario y las variables de morfología ventricular, y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de asociación entre el diámetro cardiomiocitario de PL y SI, índices de morfología y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo.

Parámetros	Diámetro PL		Diámetro SI		GPR		IMVI	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FE-Simpson	-0,295	0,306	-0,459	0,115	0,386	0,173	-0,371	0,191
Media de desplazamiento anillo mitral	-0,494	0,073	-0,737**	<u>0,004</u>	0,016	0,953	-0,371	0,157
Fracción de acortamiento mesoparietal	0,009	0,976	0,062	0,841	0,400	0,156	0,134	0,647
Onda E	0,234	0,401	0,398	0,159	-0,109	0,687	0,111	0,681
Onda A	-0,004	0,989	-0,103	0,738	0,411	0,144	-0,027	0,926
Relación E/A	-0,127	0,680	0,428	0,166	-0,409	0,165	0,043	0,889
e' promedio	-0,686**	<u>0,003</u>	-0,596*	<u>0,019</u>	0,072	0,790	-0,666**	<u>0,005</u>
E/e' promedio	0,585*	<u>0,022</u>	0,718**	<u>0,004</u>	-0,097	0,721	0,459	0,074

PL: pared libre; VI: ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; GRP: grosor parietal relativo; IMVI: índice masa ventricular izquierda; EAo: estenosis aórtica severa; Log: logaritmo; FE: fracción de eyección; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18). (*P<0,05, **P<0,01. Correlación de Pearson).

Anexo 4: Análisis de asociación entre la FVC y los parámetros ecocardiográficos en pacientes con EAo

Se estudiaron las posibles asociaciones entre la FVC de PL y de SI y los índices de función sistólica y función diastólica en pacientes con EAo (**Tabla 17**).

Tabla 17. Análisis de asociación entre la fracción de volumen de colágeno de PL y SI, y los índices de función sistólica y función diastólica ventricular en pacientes con EAo.

Parámetros	Log FVC PL total		Log FVC PL misial		Log FVC PL no misial	
	r	p	r	p	r	p
FE-Simpson	-0,368	0,177	-0,239	0,391	-0,293	0,289
Media de desplazamiento anillo mitral	-0,457	0,087	-0,422	0,117	-0,413	0,126
Fracción de acortamiento mesoparietal	0,057	0,839	-0,564*	<u>0,029</u>	0,286	0,301
Onda E	0,367	0,162	0,297	0,264	0,318	0,230
Onda A	0,108	0,715	-0,208	0,475	0,197	0,499
Relación E/A	0,244	0,421	0,442	0,131	0,079	0,799
e' promedio	0,053	0,840	0,305	0,234	-0,111	0,671
E/e' promedio	0,218	0,418	0,121	0,656	0,233	0,386
Parámetros	Log FVC SI total		Log FVC SI misial		Log FVC SI no misial	
	r	p	r	r	p	r
FE-Simpson	0,260	0,330	-0,007	0,981	0,282	0,289
Media de desplazamiento anillo mitral	0,007	0,979	-0,085	0,755	-0,051	0,850
Fracción de acortamiento mesoparietal	-0,381	0,145	-0,413	0,112	-0,259	0,334
Onda E	0,031	0,907	0,138	0,598	-0,033	0,899
Onda A	0,156	0,578	0,441	0,100	-0,045	0,873
Relación E/A	0,059	0,841	0,200	0,492	0,024	0,934
e' promedio	-0,124	0,623	-0,255	0,306	-0,015	0,952
E/e' promedio	-0,032	0,904	0,151	0,563	-0,093	0,723

PL: pared libre; VI: ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; EAo: estenosis aórtica severa; Log: logaritmo; FVC: fracción de volumen de colágeno; FE: fracción de eyección; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18.) (*P<0,05. Correlación de Pearson).

Anexo 5: Análisis de asociación entre niveles séricos de angiotensina II y noradrenalina, fibrosis miocárdica, y los parámetros ecocardiográficos en pacientes con EAo

Por un lado, se estudiaron las posibles asociaciones entre las concentraciones séricas de AT II y NA, y la FVC de VI en pacientes con EAo (**Tabla 18**).

Tabla 18. Análisis de asociación entre las concentraciones de angiotensina II y noradrenalina y la fracción de volumen de colágeno en pacientes con EAo

Parámetros	Log FVC PL total		Log FVC PL misial		Log FVC PL no misial	
	r	p	r	p	r	p
Log SP AT II	-0,210	0,419	-0,305	0,233	-0,215	0,408
Log SC AT II	-0,165	0,528	-0,352	0,166	-0,103	0,693
Log SP NA	0,529*	<u>0,029</u>	0,157	0,548	0,524*	<u>0,031</u>
Log SC NA	0,546*	<u>0,023</u>	0,046	,0860	0,607*	<u>0,01</u>
Parámetros	Log FVC SI total		Log FVC SI misial		Log FVC SI no misial	
	r	p	r	p	r	p
Log SP AT II	0,188	0,455	0,037	0,884	0,180	0,476
Log SC AT II	0,023	0,928	-0,115	0,651	0,053	0,835
Log SP NA	-0,211	0,401	-0,298	0,230	-0,052	0,838
Log SC NA	-0,065	0,797	-0,218	0,384	0,085	0,737

EAo: estenosis aórtica severa; Log: logaritmo; FVC: fracción de volumen de colágeno; PL: pared libre de ventrículo izquierdo; SI: septo interventricular; SP: sangre periférica; SC: sangre de seno coronario; AT II: angiotensina II; NA: noradrenalina; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18). (*P<0,05. Correlación de Pearson).

Y por otro, se estudiaron las posibles asociaciones entre las concentraciones séricas de AT II y NA, y los índices de función sistólica y función diastólica en pacientes con EAo (**Tabla 19**).

Tabla 19. Análisis de asociación entre las concentraciones séricas de angiotensina II y noradrenalina, y los índices de función sistólica y diastólica en pacientes con EAo.

Parámetros	Log SP AT II		Log SC AT II		Log SP NA		Log SC NA	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FE-Simpson	0,391	0,134	0,387	0,139	-0,045	0,868	0,027	0,922
Media desplazamiento anillo mitral	0,451	0,080	0,808***	<u>P<0,000</u>	-0,135	0,619	-0,264	0,323
Fracción de acortamiento mesopari	0,212	0,431	0,263	0,325	0,495	0,051	0,412	0,113
Onda E	-0,067	0,797	-0,220	0,396	-0,011	0,966	0,125	0,633
Onda A	0,405	0,134	0,432	0,108	0,316	0,251	0,276	0,320
Relación E/A	-0,441	0,115	-0,504	0,066	-0,118	0,687	-0,049	0,867
e' promedio	0,300	0,227	0,287	0,248	0,083	0,744	-0,181	0,474
E/e' promedio	-0,206	0,428	-0,421	0,092	0,102	0,697	0,218	0,401

EAo: estenosis aórtica severa; Log: logaritmo; SP: sangre periférica; SC: sangre de seno coronario; AT II: angiotensina II; NA: noradrenalina; FE: fracción de eyección; r: coeficiente de correlación de Pearson; P: P valor de probabilidad (n=18). (***)P<0,001. Correlación de Pearson)

Anexo 6: Artículos científicos publicados a partir del presente trabajo**Phospholipase C β_4 isozyme is expressed in human, rat, and murine heart left ventricles and in HL-1 cardiomyocytes**

Otaegui D, Querejeta R, Arrieta A, Lazkano A, Bidaurrezaga A, Arriandiaga JR, Aldazabal P, Garro MA.

Mol Cell Biochem. 2010 Apr;337(1-2):167-73.

Phospholipase C- β (PLC β) isozymes (PLC β_1 and PLC β_3) have been extensively characterized in cardiac tissue, but no data are available for the PLC β_4 isozyme. In this study, PLC $\beta_{(1-4)}$ isozymes mRNA relative expression was studied by real-time PCR in human, rat and murine left ventricle and the presence of PLC β_4 isozyme at the protein level was confirmed by Western blotting in all species studied. Confocal microscopy experiments carried out in HL-1 cardiomyocytes revealed a sarcoplasmic subcellular distribution of PLC β_4 . Although there were unexpected significant interspecies differences in the PLC $\beta_{(1-4)}$ mRNA expression, PLC β_4 mRNA was the main transcript expressed in all left ventricles studied. Thus, whereas in human and rat left ventricles PLC β_4 >PLC β_3 >PLC β_2 >PLC β_1 mRNA pattern of expression was found, in murine left ventricle the pattern of expression was different, i.e. PLC β_4 >PLC β_1 >PLC β_3 >PLC β_2 . However, results obtained in mouse HL-1 cardiomyocytes showed PLC β_3 ≈PLC β_4 >PLC β_1 >PLC β_2 pattern of mRNA expression indicating a probable cell type specific expression of the different PLC β isozymes in cardiomyocytes. Finally, real-time PCR experiments showed a trend, even though not significant (P = 0.067), to increase PLC β_4 mRNA levels in HL-1 cardiomyocytes after angiotensin II treatment. These results demonstrate the presence of PLC β_4 in the heart and in HL-1 cardiomyocytes showing a different species-dependent pattern of expression of the PLC $\beta_{(1-4)}$ transcripts. We discuss the relevance of these findings in relation to the development of cardiac hypertrophy.

Role of Myocardial Collagen in Severe Aortic Stenosis With Preserved Ejection Fraction and Symptoms of Heart Failure

Echegaray K, Andreu I, Lazkano A, Villanueva I, Sáenz A, Elizalde MR, Echeverría T, López B, Garro A, González A, Zubillaga E, Solla I, Sanz I, González J, Elósegui-Artola A, Roca-Cusachs P, Díez J, Ravassa S, Querejeta R.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2017 Feb 16. [Epub ahead of print]

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: We investigated the anatomical localization, biomechanical properties, and molecular phenotype of myocardial collagen tissue in 40 patients with severe aortic stenosis with preserved ejection fraction and symptoms of heart failure.

METHODS: Two transmural biopsies were taken from the left ventricular free wall. Mysial and nonmysial regions of the collagen network were analyzed. Myocardial collagen volume fraction (CVF) was measured by picosirius red staining. Young's elastic modulus (YEM) was measured by atomic force microscopy in decellularized slices to assess stiffness. Collagen types I and III were measured as CIVF and CIIIVF, respectively, by confocal microscopy in areas with YEM evaluation.

RESULTS: Compared with controls, patients exhibited increased mysial and nonmysial CVF and nonmysial:mysial CVF ratio ($P < .05$). In patients, nonmysial CVF ($r = 0.330$; $P = .046$) and the nonmysial:mysial CVF ratio ($r = 0.419$; $P = .012$) were directly correlated with the ratio of maximal early transmitral flow velocity in diastole to early mitral annulus velocity in diastole. Both the CIVF:CIIIVF ratio and YEM were increased ($P \leq .001$) in nonmysial regions compared with mysial regions in patients, with a direct correlation ($r = 0.895$; $P < .001$) between them.

CONCLUSIONS: These findings suggest that, in patients with severe aortic stenosis with preserved ejection fraction and symptoms of heart failure, diastolic dysfunction is associated with increased nonmysial deposition of collagen, predominantly type I, resulting in increased extracellular matrix stiffness. Therefore, the characteristics of collagen tissue may contribute to diastolic dysfunction in these patients

Bibliografía

"Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators", 1991, *The New England journal of medicine*, vol. 325, no. 5, pp. 293-302.

Abdellatif, M.M., Neubauer, C.F., Lederer, W.J. & Rogers, T.B. 1991, "Angiotensin-induced desensitization of the phosphoinositide pathway in cardiac cells occurs at the level of the receptor", *Circulation research*, vol. 69, no. 3, pp. 800-809.

Adams, J.W., Sakata, Y., Davis, M.G., Sah, V.P., Wang, Y., Liggett, S.B., Chien, K.R., Brown, J.H. & Dorn, G.W., 2nd 1998, "Enhanced G α q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 17, pp. 10140-10145.

Adamski, F.M., Timms, K.M. & Shieh, B.H. 1999, "A unique isoform of phospholipase C β 4 highly expressed in the cerebellum and eye", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1444, no. 1, pp. 55-60.

Adjobo-Hermans, M.J., Crosby, K.C., Putyrski, M., Bhageloe, A., van Weeren, L., Schultz, C., Goedhart, J. & Gadella, T.W., Jr 2013, "PLC β isoforms differ in their subcellular location and their CT-domain dependent interaction with G α q", *Cellular signalling*, vol. 25, no. 1, pp. 255-263.

Adjobo-Hermans, M.J., Goedhart, J. & Gadella, T.W. Jr 2008, "Regulation of PLC β 1a membrane anchoring by its substrate phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate", *Journal of cell science*, vol. 121, no. Pt 22, pp. 3770-3777.

Akhter, S.A., Luttrell, L.M., Rockman, H.A., Iaccarino, G., Lefkowitz, R.J. & Koch, W.J. 1998, "Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 280, no. 5363, pp. 574-577.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2014, *Molecular Biology of the Cell*, 6th edn, Garland Science, New York.

Alfarano, C., Sartiani, L., Nediani, C., Mannucci, E., Mugelli, A., Cerbai, E. & Raimondi, L. 2008, "Functional coupling of angiotensin II type 1 receptor with insulin resistance of energy substrate uptakes in immortalized cardiomyocytes (HL-1 cells)", *British journal of pharmacology*, vol. 153, no. 5, pp. 907-914.

Al-Shura, A.N. 2014, *Integrative anatomy and pathophysiology in traditional Chinese medicine cardiology*, Academic Press, Amsterdam; Boston.

Alvarez, R.A., Ghalayini, A.J., Xu, P., Hardcastle, A., Bhattacharya, S., Rao, P.N., Pettenati, M.J., Anderson, R.E. & Baehr, W. 1995, "cDNA sequence and gene locus of the human retinal phosphoinositide-specific phospholipase-C beta 4 (PLCB4)", *Genomics*, vol. 29, no. 1, pp. 53-61.

Anguita Sanchez, M., Crespo Leiro, M.G., de Teresa Galvan, E., Jimenez Navarro, M., Alonso-Pulpon, L., Muniz Garcia, J. & PRICE Study Investigators 2008, "Prevalence of heart failure in the Spanish general population aged over 45 years. The PRICE Study", *Revista española de cardiología*, vol. 61, no. 10, pp. 1041-1049.

Arthur, J.F., Matkovich, S.J., Mitchell, C.J., Biden, T.J. & Woodcock, E.A. 2001, "Evidence for selective coupling of alpha 1-adrenergic receptors to phospholipase C-beta 1 in rat neonatal cardiomyocytes", *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 40, pp. 37341-37346.

Avkiran, M., Rowland, A.J., Cuello, F. & Haworth, R.S. 2008, "Protein kinase d in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease", *Circulation research*, vol. 102, no. 2, pp. 157-163.

Bahk, Y.Y., Lee, Y.H., Lee, T.G., Seo, J., Ryu, S.H. & Suh, P.G. 1994, "Two forms of phospholipase C-beta 1 generated by alternative splicing", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 11, pp. 8240-8245.

Bai, H., Wu, L.L., Xing, D.Q., Liu, J. & Zhao, Y.L. 2004, "Angiotensin II induced upregulation of G alpha q/11, phospholipase C beta 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 via angiotensin II type 1 receptor", *Chinese medical journal*, vol. 117, no. 1, pp. 88-93.

Balakumar, P. & Jagadeesh, G. 2010, "Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared?", *Pharmacological research*, vol. 62, no. 5, pp. 365-383.

Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K. & Baudino, T.A. 2007, "Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 293, no. 3, pp. H1883-91.

Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L. & McMullen, J.R. 2010, "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies", *Pharmacology & therapeutics*, vol. 128, no. 1, pp. 191-227.

Berstein, G., Blank, J.L., Jhon, D.Y., Exton, J.H., Rhee, S.G. & Ross, E.M. 1992, "Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator", *Cell*, vol. 70, no. 3, pp. 411-418.

Bertagnolo, V., Benedusi, M., Querzoli, P., Pedriali, M., Magri, E., Brugnoli, F. & Capitani, S. 2006, "PLC-beta2 is highly expressed in breast cancer and is associated with a poor outcome: a study on tissue microarrays", *International journal of oncology*, vol. 28, no. 4, pp. 863-872.

Blayney, L., Gapper, P. & Rix, C. 1998, "Identification of phospholipase C beta isoforms and their location in cultured vascular smooth muscle cells of pig, human and rat", *Cardiovascular research*, vol. 40, no. 3, pp. 564-572.

Bohm, D., Schwegler, H., Kotthaus, L., Nayernia, K., Rickmann, M., Kohler, M., Rosenbusch, J., Engel, W., Flugge, G. & Burfeind, P. 2002, "Disruption of PLC-beta 1-mediated signal transduction in mutant mice causes age-dependent hippocampal mossy fiber sprouting and neurodegeneration", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 21, no. 4, pp. 584-601.

Braz, J.C., Gregory, K., Pathak, A., Zhao, W., Sahin, B., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Lorenz, J.N., Nairn, A.C., Liggett, S.B., Bodi, I., Wang, S., Schwartz, A., Lakatta, E.G., DePaoli-Roach, A.A., Robbins, J., Hewett, T.E., Bibb, J.A., Westfall, M.V., Kranias, E.G. & Molkentin, J.D. 2004, "PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure", *Nature medicine*, vol. 10, no. 3, pp. 248-254.

Briest, W., Holzl, A., Ressler, B., Deten, A., Baba, H.A. & Zimmer, H.G. 2003, "Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts", *Cardiovascular research*, vol. 57, no. 2, pp. 379-387.

Bristow, M.R. 2000, "Beta-Adrenergic Receptor Blockade in Chronic Heart Failure", *Circulation*, vol. 101, no. 5, pp. 558-569.

Burnstock, G. & Pelleg, A. 2015, "Cardiac purinergic signalling in health and disease", *Purinergic signalling*, vol. 11, no. 1, pp. 1-46.

Carreno, J.E., Apablaza, F., Ocaranza, M.P. & Jalil, J.E. 2006, "Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events", *Revista espanola de cardiologia*, vol. 59, no. 5, pp. 473-486.

Choi, J.W., Lim, S., Oh, Y.S., Kim, E.K., Kim, S.H., Kim, Y.H., Heo, K., Kim, J., Kim, J.K., Yang, Y.R., Ryu, S.H. & Suh, P.G. 2010, "Subtype-specific role of phospholipase

C-beta in bradykinin and LPA signaling through differential binding of different PDZ scaffold proteins", *Cellular signalling*, vol. 22, no. 7, pp. 1153-1161.

Clapham, D.E. & Neer, E.J. 1997, "G protein beta gamma subunits", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 37, pp. 167-203.

Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr, Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A. & Izzo, N.J., Jr 1998, "HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 6, pp. 2979-2984.

Coburn, R.F., Labelle, E.F., Griffiths, T., 2nd & Baron, C.B. 1997, "Smooth muscle sarcolemma-associated phospholipase C-beta 2; agonist-evoked translocation", *Journal of cellular physiology*, vol. 171, no. 3, pp. 271-283.

Cohn, J.N., Ferrari, R. & Sharpe, N. 2000, "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 35, no. 3, pp. 569-582.

Cohn, J.N., Levine, T.B., Olivari, M.T., Garberg, V., Lura, D., Francis, G.S., Simon, A.B. & Rector, T. 1984, "Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure", *The New England journal of medicine*, vol. 311, no. 13, pp. 819-823.

Colella, M., Grisan, F., Robert, V., Turner, J.D., Thomas, A.P. & Pozzan, T. 2008, "Ca²⁺ oscillation frequency decoding in cardiac cell hypertrophy: role of calcineurin/NFAT as Ca²⁺ signal integrators", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 8, pp. 2859-2864.

Cote, N., Pibarot, P., Pepin, A., Fournier, D., Audet, A., Arsenault, B., Couture, C., Poirier, P., Despres, J.P. & Mathieu, P. 2010, "Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis", *International journal of cardiology*, vol. 145, no. 3, pp. 444-449.

D'Angelo, D.D., Sakata, Y., Lorenz, J.N., Boivin, G.P., Walsh, R.A., Liggett, S.B. & Dorn, G.W., 2nd 1997, "Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 15, pp. 8121-8126.

de Simone, G., Devereux, R.B., Roman, M.J., Ganau, A., Saba, P.S., Alderman, M.H. & Laragh, J.H. 1994, "Assessment of left ventricular function by the midwall fractional shortening/end-systolic stress relation in human hypertension", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 23, no. 6, pp. 1444-1451.

Dent, M.R., Dhalla, N.S. & Tappia, P.S. 2004, "Phospholipase C gene expression, protein content, and activities in cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 287, no. 2, pp. H719-27.

Di Pietro, R., Miscia, S., Cataldi, A. & Rana, R. 2000, "Age-dependent variations in the expression of PLC isoforms upon mitogenic stimulation of peripheral blood T cells from healthy donors", *British journal of haematology*, vol. 111, no. 4, pp. 1209-1214.

Dolber, P.C. & Spach, M.S. 1987, "Picrosirius red staining of cardiac muscle following phosphomolybdic acid treatment", *Stain technology*, vol. 62, no. 1, pp. 23-26.

Dorn, G.W., 2nd & Brown, J.H. 1999, "Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation", *Trends in cardiovascular medicine*, vol. 9, no. 1-2, pp. 26-34.

Dorn, G.W., 2nd & Force, T. 2005, "Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy", *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 3, pp. 527-537.

Drawnel, F.M., Archer, C.R. & Roderick, H.L. 2013, "The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth", *British journal of pharmacology*, vol. 168, no. 2, pp. 296-317.

Drin, G. & Scarlata, S. 2007, "Stimulation of phospholipase Cbeta by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding--how many ways can you activate an enzyme?", *Cellular signalling*, vol. 19, no. 7, pp. 1383-1392.

Du Bois, D. & Du Bois, E.F. 1989, "A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916", *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 5, no. 5, pp. 303-11; discussion 312-3.

Duerr, G.D., Heinemann, J.C., Dunkel, S., Zimmer, A., Lutz, B., Lerner, R., Roell, W., Mellert, F., Probst, C., Esmailzadeh, B., Welz, A. & Dewald, O. 2013, "Myocardial hypertrophy is associated with inflammation and activation of endocannabinoid system in patients with aortic valve stenosis", *Life Sciences*, vol. 92, no. 20-21, pp. 976-983.

Dusaban, S.S. & Brown, J.H. 2015, "PLCepsilon mediated sustained signaling pathways", *Advances in biological regulation*, vol. 57, pp. 17-23.

Dweck, M.R., Boon, N.A. & Newby, D.E. 2012a, "Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 60, no. 19, pp. 1854-1863.

Dweck, M.R., Joshi, S., Murigu, T., Gulati, A., Alpendurada, F., Jabbour, A., Maceira, A., Roussin, I., Northridge, D.B., Kilner, P.J., Cook, S.A., Boon, N.A., Pepper, J., Mohiaddin, R.H., Newby, D.E., Pennell, D.J. & Prasad, S.K. 2012b, "Left ventricular remodeling and hypertrophy in patients with aortic stenosis: insights from cardiovascular magnetic resonance", *Journal of cardiovascular magnetic resonance: official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 14, pp. 50.

Dzimiri, N., Moorji, A., Kumar, M., Bakr, S., Kumar, N., Almotrefi, A.A. & Halees, Z. 1996, "Effect of left ventricular pressure and volume overload on alpha-adrenoceptor activity in patients with rheumatic heart valvular disease", *General pharmacology*, vol. 27, no. 3, pp. 539-543.

Echegaray, K., Andreu, I., Lazkano, A., Villanueva, I., Saenz, A., Elizalde, M.R., Echeverria, T., Lopez, B., Garro, A., Gonzalez, A., Zubillaga, E., Solla, I., Sanz, I., Gonzalez, J., Elosegui-Artola, A., Roca-Cusachs, P., Diez, J., Ravassa, S. & Querejeta, R. 2017, "Role of Myocardial Collagen in Severe Aortic Stenosis With Preserved Ejection Fraction and Symptoms of Heart Failure", *Revista espanola de cardiologia (English ed.)*.

Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., Schilling, J.D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E.C., Yokoyama, W.M., Unanue, E.R., Colonna, M., Randolph, G.J. & Mann, D.L. 2014, "Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation", *Immunity*, vol. 40, no. 1, pp. 91-104.

Eskildsen-Helmond, Y.E., Bezstarosti, K., Dekkers, D.H., van Heugten, H.A. & Lamers, J.M. 1997, "Cross-talk between receptor-mediated phospholipase C-beta and D via protein kinase C as intracellular signal possibly leading to hypertrophy in serum-free cultured cardiomyocytes", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 29, no. 9, pp. 2545-2559.

Esposito, G., Prasad, S.V., Rapacciuolo, A., Mao, L., Koch, W.J. & Rockman, H.A. 2001, "Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload", *Circulation*, vol. 103, no. 10, pp. 1453-1458.

Essen, L.O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. & Williams, R.L. 1996, "Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta", *Nature*, vol. 380, no. 6575, pp. 595-602.

Fan, G., Jiang, Y.P., Lu, Z., Martin, D.W., Kelly, D.J., Zuckerman, J.M., Ballou, L.M., Cohen, I.S. & Lin, R.Z. 2005, "A transgenic mouse model of heart failure using inducible Galpha q", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 40337-40346.

Farre, N., Vela, E., Cleries, M., Bustins, M., Cainzos-Achirica, M., Enjuanes, C., Moliner, P., Ruiz, S., Verdu-Rotellar, J.M. & Comin-Colet, J. 2017, "Real world heart failure epidemiology and outcome: A population-based analysis of 88,195 patients", *PloS one*, vol. 12, no. 2, pp. e0172745.

Ferguson, B.S., Harrison, B.C., Jeong, M.Y., Reid, B.G., Wempe, M.F., Wagner, F.F., Holson, E.B. & McKinsey, T.A. 2013, "Signal-dependent repression of DUSP5 by class I HDACs controls nuclear ERK activity and cardiomyocyte hypertrophy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 24, pp. 9806-9811.

Filtz, T.M., Grubb, D.R., McLeod-Dryden, T.J., Luo, J. & Woodcock, E.A. 2009, "Gq-initiated cardiomyocyte hypertrophy is mediated by phospholipase Cbeta1b", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 23, no. 10, pp. 3564-3570.

Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N. & Hill, J.A. 2004, "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?", *Circulation*, vol. 109, no. 13, pp. 1580-1589.

Frieler, R.A. & Mortensen, R.M. 2015, "Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling", *Circulation*, vol. 131, no. 11, pp. 1019-1030.

Fujimoto, S., Yoshida, N., Fukui, T., Amanai, M., Isobe, T., Itagaki, C., Izumi, T. & Perry, A.C. 2004, "Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix", *Developmental biology*, vol. 274, no. 2, pp. 370-383.

Fukami, K. 2002, "Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes", *Journal of Biochemistry*, vol. 131, no. 3, pp. 293-299.

Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K. & Nakamura, Y. 2010, "Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance", *Progress in lipid research*, vol. 49, no. 4, pp. 429-437.

Gavira, J.J., Alegría, E., Cordero, A. & Artaiz, M. 2005, "Valvulopatía aórtica", vol. 9, no. 41, pp. 2707-2714.

Golebiewska, U. & Scarlata, S. 2010, "The effect of membrane domains on the G protein-phospholipase C β signaling pathway", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 45, no. 2, pp. 97-105.

Gonzalez, A., Ravassa, S., Beaumont, J., Lopez, B. & Diez, J. 2011, "New targets to treat the structural remodeling of the myocardium", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 58, no. 18, pp. 1833-1843.

Gonzalez-Yanes, C., Santos-Alvarez, J. & Sanchez-Margalet, V. 2001, "Pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, activates Galpha(16) and phospholipase C-beta(2) by interacting with specific receptors in rat heart membranes", *Cellular signalling*, vol. 13, no. 1, pp. 43-49.

Gordon, H. & Sweets, H.H. 1936, "A Simple Method for the Silver Impregnation of Reticulum", *The American journal of pathology*, vol. 12, no. 4, pp. 545-552.1.

Gresset, A., Sondek, J. & Harden, T.K. 2012, "The phospholipase C isozymes and their regulation", *Sub-cellular biochemistry*, vol. 58, pp. 61-94.

Grinberg, S., Hasko, G., Wu, D. & Leibovich, S.J. 2009, "Suppression of PLC β 2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype", *The American journal of pathology*, vol. 175, no. 6, pp. 2439-2453.

Grubb, D.R., Crook, B., Ma, Y., Luo, J., Qian, H.W., Gao, X.M., Kiriazis, H., Du, X.J., Gregorevic, P. & Woodcock, E.A. 2015, "The atypical 'b' splice variant of phospholipase C β 1 promotes cardiac contractile dysfunction", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 84, pp. 95-103.

Grubb, D.R., Gao, X.M., Kiriazis, H., Matsumoto, A., McMullen, J.R., Du, X.J. & Woodcock, E.A. 2016, "Expressing an inhibitor of PLC β 1b sustains contractile function following pressure overload", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 93, pp. 12-17.

Grubb, D.R., Vasilevski, O., Huynh, H. & Woodcock, E.A. 2008, "The extreme C-terminal region of phospholipase C β 1 determines subcellular localization and function; the "b" splice variant mediates alpha1-adrenergic receptor responses in cardiomyocytes", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 22, no. 8, pp. 2768-2774.

Gutman, O., Walliser, C., Piechulek, T., Gierschik, P. & Henis, Y.I. 2010, "Differential regulation of phospholipase C-beta2 activity and membrane interaction by Galphaq, Gbeta1gamma2, and Rac2", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 6, pp. 3905-3915.

Hansen, C.A., Schroering, A.G. & Robishaw, J.D. 1995, "Subunit expression of signal transducing G proteins in cardiac tissue: implications for phospholipase C-beta regulation", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 27, no. 1, pp. 471-484.

Harrison, T.R. & Braunwald, E. 2005, Harrison. *Principios de medicina interna*, 16th edn, Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.

Hasking, G.J., Esler, M.D., Jennings, G.L., Burton, D., Johns, J.A. & Korner, P.I. 1986, "Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity", *Circulation*, vol. 73, no. 4, pp. 615-621.

Haslam, R.J., Koide, H.B. & Hemmings, B.A. 1993, "Pleckstrin domain homology", *Nature*, vol. 363, no. 6427, pp. 309-310.

Hein, S., Arnon, E., Kostin, S., Schonburg, M., Elsasser, A., Polyakova, V., Bauer, E.P., Klovekorn, W.P. & Schaper, J. 2003, "Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms", *Circulation*, vol. 107, no. 7, pp. 984-991.

Heineke, J. & Molkentin, J.D. 2006, "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 7, no. 8, pp. 589-600.

Heller, L.J., Opsahl, J.A., Wernsing, S.E., Saxena, R. & Katz, S.A. 1998, "Myocardial and plasma renin-angiotensinogen dynamics during pressure-induced cardiac hypertrophy", *The American Journal of Physiology*, vol. 274, no. 3 Pt 2, pp. R849-56.

Hepler, J.R. & Gilman, A.G. 1992, "G proteins", *Trends in biochemical sciences*, vol. 17, no. 10, pp. 383-387.

Herrmann, S., Stork, S., Niemann, M., Lange, V., Strotmann, J.M., Frantz, S., Beer, M., Gattenlohner, S., Voelker, W., Ertl, G. & Weidemann, F. 2011, "Low-gradient aortic valve stenosis myocardial fibrosis and its influence on function and outcome", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 58, no. 4, pp. 402-412.

Hess, O.M., Schneider, J., Koch, R., Bamert, C., Grimm, J. & Krayenbuehl, H.P. 1981, "Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy.

Special reference to normalized viscoelastic data", *Circulation*, vol. 63, no. 2, pp. 360-371.

Hicks, S.N., Jezyk, M.R., Gershburg, S., Seifert, J.P., Harden, T.K. & Sondek, J. 2008, "General and versatile autoinhibition of PLC isozymes", *Molecular cell*, vol. 31, no. 3, pp. 383-394.

Hilal-Dandan, R., Kanter, J.R. & Brunton, L.L. 2000, "Characterization of G-protein signaling in ventricular myocytes from the adult mouse heart: differences from the rat", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 32, no. 7, pp. 1211-1221.

Hokin, M.R. & Hokin, L.E. 1953, "Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices", *The Journal of biological chemistry*, vol. 203, no. 2, pp. 967-977.

Hoshino, T., Fujiwara, H., Kawai, C. & Hamashima, Y. 1983, "Myocardial fiber diameter and regional distribution in the ventricular wall of normal adult hearts, hypertensive hearts and hearts with hypertrophic cardiomyopathy", *Circulation*, vol. 67, no. 5, pp. 1109-1116.

Hubbard, K.B. & Hepler, J.R. 2006, "Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins", *Cellular signalling*, vol. 18, no. 2, pp. 135-150.

Hwang, J.I., Oh, Y.S., Shin, K.J., Kim, H., Ryu, S.H. & Suh, P.G. 2005, "Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta", *The Biochemical journal*, vol. 389, no. Pt 1, pp. 181-186.

Iaizzo, P.A. 2009, *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*.

Illenberger, D., Walliser, C., Nurnberg, B., Diaz Lorente, M. & Gierschik, P. 2003, "Specificity and structural requirements of phospholipase C-beta stimulation by Rho GTPases versus G protein beta gamma dimers", *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 5, pp. 3006-3014.

Irino, Y., Cho, H., Nakamura, Y., Nakahara, M., Furutani, M., Suh, P.G., Takenawa, T. & Fukami, K. 2004, "Phospholipase C delta-type consists of three isozymes: bovine PLCdelta2 is a homologue of human/mouse PLCdelta4", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 320, no. 2, pp. 537-543.

Ishida, S., Matsu-Ura, T., Fukami, K., Michikawa, T. & Mikoshiba, K. 2014, "Phospholipase C-beta1 and beta4 contribute to non-genetic cell-to-cell variability in histamine-induced calcium signals in HeLa cells", *PloS one*, vol. 9, no. 1, pp. e86410.

Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. 1988, "Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 2, pp. 339-343.

Jander, N., Gohlke-Barwolf, C., Bahlmann, E., Gerds, E., Boman, K., Chambers, J.B., Egstrup, K., Nienaber, C.A., Pedersen, T.R., Ray, S., Rossebo, A.B., Willenheimer, R., Kienzle, R.P., Wachtell, K., Neumann, F.J. & Minners, J. 2014, "Indexing aortic valve area by body surface area increases the prevalence of severe aortic stenosis", *Heart (British Cardiac Society)*, vol. 100, no. 1, pp. 28-33.

Jensen, B.C., O'Connell, T.D. & Simpson, P.C. 2011, "Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 51, no. 4, pp. 518-528.

Jhon, D.Y., Lee, H.H., Park, D., Lee, C.W., Lee, K.H., Yoo, O.J. & Rhee, S.G. 1993, "Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 9, pp. 6654-6661.

Ji, Q.S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A. & Carpenter, G. 1997, "Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 7, pp. 2999-3003.

Jiang, H., Wu, D. & Simon, M.I. 1994, "Activation of phospholipase C beta 4 by heterotrimeric GTP-binding proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 10, pp. 7593-7596.

Ju, H., Zhao, S., Tappia, P.S., Panagia, V. & Dixon, I.M. 1998, "Expression of Gq alpha and PLC-beta in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction", *Circulation*, vol. 97, no. 9, pp. 892-899.

Kadamur, G. & Ross, E.M. 2013, "Mammalian phospholipase C", *Annual Review of Physiology*, vol. 75, pp. 127-154.

Kawakami, T. & Xiao, W. 2013, "Phospholipase C-beta in immune cells", *Advances in biological regulation*, vol. 53, no. 3, pp. 249-257.

Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N.G., Min, D.S., Kim, Y.H., Ryu, S.H., Suh, P.G. & Shin, H.S. 1997, "Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors", *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 290-293.

Kim, J.K., Lim, S., Kim, J., Kim, S., Kim, J.H., Ryu, S.H. & Suh, P.G. 2011, "Subtype-specific roles of phospholipase C-beta via differential interactions with PDZ domain proteins", *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 51, no. 1, pp. 138-151.

Kim, M.J., Min, D.S., Ryu, S.H. & Suh, P.G. 1998, "A cytosolic, galphaq- and betagamma-insensitive splice variant of phospholipase C-beta4", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 6, pp. 3618-3624.

Koitabashi, N. & Kass, D.A. 2011, "Reverse remodeling in heart failure--mechanisms and therapeutic opportunities", *Nature reviews.Cardiology*, vol. 9, no. 3, pp. 147-157.

Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N.G. 2014, "The pathogenesis of cardiac fibrosis", *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 71, no. 4, pp. 549-574.

Krayenbuehl, H.P., Hess, O.M., Monrad, E.S., Schneider, J., Mall, G. & Turina, M. 1989, "Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement", *Circulation*, vol. 79, no. 4, pp. 744-755.

Lai, K.B., Sanderson, J.E. & Yu, C.M. 2009, "Suppression of collagen production in norepinephrine stimulated cardiac fibroblasts culture: differential effect of alpha and beta-adrenoreceptor antagonism", *Cardiovascular drugs and therapy*, vol. 23, no. 4, pp. 271-280.

Lang, R.M., Badano, L.P., Mor-Avi, V., Afilalo, J., Armstrong, A., Ernande, L., Flachskampf, F.A., Foster, E., Goldstein, S.A., Kuznetsova, T., Lancellotti, P., Muraru, D., Picard, M.H., Rietzschel, E.R., Rudski, L., Spencer, K.T., Tsang, W. & Voigt, J.U. 2015, "Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging", *European heart journal cardiovascular Imaging*, vol. 16, no. 3, pp. 233-270.

Lee, C.W., Lee, K.H., Lee, S.B., Park, D. & Rhee, S.G. 1994, "Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 41, pp. 25335-25338.

Lee, C.W., Park, D.J., Lee, K.H., Kim, C.G. & Rhee, S.G. 1993, "Purification, molecular cloning, and sequencing of phospholipase C-beta 4", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 28, pp. 21318-21327.

Lee, S.B., Rao, A.K., Lee, K.H., Yang, X., Bae, Y.S. & Rhee, S.G. 1996, "Decreased expression of phospholipase C-beta 2 isozyme in human platelets with impaired function", *Blood*, vol. 88, no. 5, pp. 1684-1691.

Lewit-Bentley, A. & Rety, S. 2000, "EF-hand calcium-binding proteins", *Current opinion in structural biology*, vol. 10, no. 6, pp. 637-643.

Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V. & Wu, D. 2000, "Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 287, no. 5455, pp. 1046-1049.

Ling, K., Schill, N.J., Wagoner, M.P., Sun, Y. & Anderson, R.A. 2006, "Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration", *Trends in cell biology*, vol. 16, no. 6, pp. 276-284.

Litosch, I. 2002, "Novel mechanisms for feedback regulation of phospholipase C-beta activity", *IUBMB life*, vol. 54, no. 5, pp. 253-260.

Lopez, B., Querejeta, R., Gonzalez, A., Sanchez, E., Larman, M. & Diez, J. 2004, "Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 43, no. 11, pp. 2028-2035.

Lyon, A.M. & Tesmer, J.J. 2013, "Structural insights into phospholipase C-beta function", *Molecular pharmacology*, vol. 84, no. 4, pp. 488-500.

Maillet, M., van Berlo, J.H. & Molkenin, J.D. 2013, "Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 14, no. 1, pp. 38-48.

Mao, G.F., Kunapuli, S.P. & Koneti Rao, A. 2000, "Evidence for two alternatively spliced forms of phospholipase C-beta2 in haematopoietic cells", *British journal of haematology*, vol. 110, no. 2, pp. 402-408.

Martín Jadraque, L. 1988, *Cardiopatía isquémica: angina de pecho - infarto de miocardio*, 2[^] edn, Norma, Madrid.

Matsuda, M., Paterson, H.F., Rodriguez, R., Fensome, A.C., Ellis, M.V., Swann, K. & Katan, M. 2001, "Real time fluorescence imaging of PLC gamma translocation and its interaction with the epidermal growth factor receptor", *The Journal of cell biology*, vol. 153, no. 3, pp. 599-612.

McKinley, M.P., O'Loughlin, V.D. & Bidle, T.S. 2014, *Anatomie et physiologie*, Maloine, Paris.

McKinsey, T.A. & Olson, E.N. 2005, "Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes", *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 3, pp. 538-546.

McMullen, J.R. & Jennings, G.L. 2007, "Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure", *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, vol. 34, no. 4, pp. 255-262.

McMurray, J.J., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Bohm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., Jaarsma, T., Kober, L., Lip, G.Y., Maggioni, A.P., Parkhomenko, A., Pieske, B.M., Popescu, B.A., Ronnevik, P.K., Rutten, F.H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P.T., Voors, A.A., Zannad, F., Zeiher, A., Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology, Bax, J.J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B.A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P.A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., McDonagh, T., Sechtem, U., Bonet, L.A., Avraamides, P., Ben Lamin, H.A., Brignole, M., Coca, A., Cowburn, P., Dargie, H., Elliott, P., Flachskampf, F.A., Guida, G.F., Hardman, S., Iung, B., Merkely, B., Mueller, C., Nanas, J.N., Nielsen, O.W., Orn, S., Parissis, J.T., Ponikowski, P. & ESC Committee for Practice Guidelines 2012, "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC", *European journal of heart failure*, vol. 14, no. 8, pp. 803-869.

McWhinney, C.D., Hansen, C. & Robishaw, J.D. 2000, "Alpha-1 adrenergic signaling in a cardiac murine atrial myocyte (HL-1) cell line", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 214, no. 1-2, pp. 111-119.

Meszaros, J.G., Gonzalez, A.M., Endo-Mochizuki, Y., Villegas, S., Villarreal, F. & Brunton, L.L. 2000, "Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G(q) and G(s)", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 278, no. 1, pp. C154-62.

Michell, R.H. & Allan, D. 1975, "Inositol cyclis phosphate as a product of phosphatidylinositol breakdown by phospholipase C (*Bacillus cereus*)", *FEBS letters*, vol. 53, no. 3, pp. 302-304.

Milano, C.A., Dolber, P.C., Rockman, H.A., Bond, R.A., Venable, M.E., Allen, L.F. & Lefkowitz, R.J. 1994, "Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-

adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 21, pp. 10109-10113.

Min, D.S., Kim, Y., Lee, Y.H., Suh, P.G. & Ryu, S.H. 1993, "A G-protein-coupled 130 kDa phospholipase C isozyme, PLC-beta 4, from the particulate fraction of bovine cerebellum", *FEBS letters*, vol. 331, no. 1-2, pp. 38-42.

Miro, O., Llorens, P., Martin-Sanchez, F.J., Herrero, P., Pavon, J., Perez-Dura, M.J., Bella Alvarez, A., Jacob, J., Gonzalez, C., Gonzalez-Armengol, J.J., Gil, V. & Alonso, H. 2009, "Short-term prognostic factors in elderly patients seen in emergency departments for acute heart failure", *Revista española de cardiología*, vol. 62, no. 7, pp. 757-764.

Mishra, S., Ling, H., Grimm, M., Zhang, T., Bers, D.M. & Brown, J.H. 2010, "Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling", *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 56, no. 6, pp. 598-603.

Mizutani, T., Nakashima, S. & Nozawa, Y. 1998, "Changes in the expression of protein kinase C (PKC), phospholipases C (PLC) and D (PLD) isoforms in spleen, brain and kidney of the aged rat: RT-PCR and Western blot analysis", *Mechanisms of ageing and development*, vol. 105, no. 1-2, pp. 151-172.

Molkentin, J.D. & Dorn, G.W., 2nd 2001, "Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy", *Annual Review of Physiology*, vol. 63, pp. 391-426.

Moreno, M.U., Gallego, I., Lopez, B., Gonzalez, A., Fortuno, A., San Jose, G., Valencia, F., Gomez-Doblas, J.J., de Teresa, E., Shah, A.M., Diez, J. & Zalba, G. 2013, "Decreased Nox4 levels in the myocardium of patients with aortic valve stenosis", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 125, no. 6, pp. 291-300.

Mudd, J.O. & Kass, D.A. 2008, "Tackling heart failure in the twenty-first century", *Nature*, vol. 451, no. 7181, pp. 919-928.

Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. & Anversa, P. 2003, "Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure", *Circulation research*, vol. 92, no. 2, pp. 139-150.

Nadir, M.A., Wei, L., Elder, D.H., Libianto, R., Lim, T.K., Pauriah, M., Pringle, S.D., Doney, A.D., Choy, A.M., Struthers, A.D. & Lang, C.C. 2011, "Impact of renin-angiotensin system blockade therapy on outcome in aortic stenosis", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 58, no. 6, pp. 570-576.

Nakahara, M., Shimosawa, M., Nakamura, Y., Irino, Y., Morita, M., Kudo, Y. & Fukami, K. 2005, "A novel phospholipase C, PLC(eta)2, is a neuron-specific isozyme", *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 32, pp. 29128-29134.

Ng, S.Y., Wong, C.K. & Tsang, S.Y. 2010, "Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future therapies", *American journal of physiology. Cell physiology*, vol. 299, no. 6, pp. C1234-49.

Nomikos, M., Sanders, J.R., Parthimos, D., Buntwal, L., Calver, B.L., Stamatiadis, P., Smith, A., Clue, M., Sideratou, Z., Swann, K. & Lai, F.A. 2015, "Essential Role of the EF-hand Domain in Targeting Sperm Phospholipase Czeta to Membrane Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP2)", *The Journal of biological chemistry*, vol. 290, no. 49, pp. 29519-29530.

Oka, T. & Komuro, I. 2008, "Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure", *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*, vol. 72 Suppl A, pp. A13-6.

Olivetti, G., Cigola, E., Maestri, R., Corradi, D., Lagrasta, C., Gambert, S.R. & Anversa, P. 1996, "Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 28, no. 7, pp. 1463-1477.

Organización Mundial de la Salud. 2015, "Enfermedades cardiovasculares". Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> [2017, 03/25].

Otaegui, D., Querejeta, R., Arrieta, A., Lazkano, A., Bidaurrazaga, A., Arriandiaga, J.R., Aldazabal, P. & Garro, M.A. 2010, "Phospholipase Cbeta4 isozyme is expressed in human, rat, and murine heart left ventricles and in HL-1 cardiomyocytes", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 337, no. 1-2, pp. 167-173.

Oto, I., Arqué, M. & Barrachina, L. 2001, *Enfermería médico-quirúrgica. Necesidad de oxigenación*, 2a edn, Masson, Barcelona.

Park, D., Jhon, D.Y., Lee, C.W., Lee, K.H. & Rhee, S.G. 1993, "Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 7, pp. 4573-4576.

Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R. 2006, "Physiology of local renin-angiotensin systems", *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 3, pp. 747-803.

Piek, A., de Boer, R.A. & Sillje, H.H. 2016, "The fibrosis-cell death axis in heart failure", *Heart failure reviews*, vol. 21, no. 2, pp. 199-211.

Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A. & Tallquist, M.D. 2016, "Revisiting Cardiac Cellular Composition", *Circulation research*, vol. 118, no. 3, pp. 400-409.

Poon, L.S., Chan, A.S. & Wong, Y.H. 2009, "Gbeta3 forms distinct dimers with specific Ggamma subunits and preferentially activates the beta3 isoform of phospholipase C", *Cellular signalling*, vol. 21, no. 5, pp. 737-744.

Popovics, P., Lu, J., Nadia Kamil, L., Morgan, K., Millar, R.P., Schmid, R., Blindauer, C.A. & Stewart, A.J. 2014, "A canonical EF-loop directs Ca(2+) -sensitivity in phospholipase C-eta2", *Journal of cellular biochemistry*, vol. 115, no. 3, pp. 557-565.

Ramirez, M.T., Post, G.R., Sulakhe, P.V. & Brown, J.H. 1995, "M1 muscarinic receptors heterologously expressed in cardiac myocytes mediate Ras-dependent changes in gene expression", *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 15, pp. 8446-8451.

Ramirez-Gil, J.F., Drobinski, G., Carayon, A., Isnard, R., Hoffman, O., Sotirov, I., Chanton, E., Montalescot, G. & Thomas, D. 1993, "Neurohormonal profile in aortic valve stenosis", *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, vol. 86, no. 7, pp. 1001-1007.

Ratti, S., Mongiorgi, S., Ramazzotti, G., Follo, M.Y., Mariani, G.A., Suh, P.G., McCubrey, J.A., Cocco, L. & Manzoli, L. 2017, "Nuclear Inositide Signaling via Phospholipase C", *Journal of cellular biochemistry*.

Rebecchi, M.J. & Pentylala, S.N. 2000, "Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C", *Physiological Reviews*, vol. 80, no. 4, pp. 1291-1335.

Rhee, S.G. 2001, "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, pp. 281-312.

Roach, T.I., Rebres, R.A., Fraser, I.D., Decamp, D.L., Lin, K.M., Sternweis, P.C., Simon, M.I. & Seaman, W.E. 2008, "Signaling and cross-talk by C5a and UDP in macrophages selectively use PLCbeta3 to regulate intracellular free calcium", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 25, pp. 17351-17361.

Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C.N. & Singh, R. 2010, "Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy", *Pharmacological research*, vol. 61, no. 4, pp. 269-280.

Roig Minguell, E. 2004, "Clinical use of markers of neurohormonal activation in heart failure", *Revista española de cardiología*, vol. 57, no. 4, pp. 347-356.

Roig, E., Perez-Villa, F., Morales, M., Jimenez, W., Orus, J., Heras, M. & Sanz, G. 2000, "Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure", *European heart journal*, vol. 21, no. 1, pp. 53-57.

Rubio-Gayosso, I., Sierra-Ramirez, A., Garcia-Vazquez, A., Martinez-Martinez, A., Munoz-Garcia, O., Morato, T. & Ceballos-Reyes, G. 2000, "17Beta-estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and nongenomic mechanism in rat vascular endothelium in culture", *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 36, no. 2, pp. 196-202.

Ruf, S., Piper, M. & Schluter, K.D. 2002, "Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro", *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, vol. 443, no. 3, pp. 483-490.

Ruiz de Azua, I., del Olmo, E., Pazos, A. & Salles, J. 2006, "Transmembrane signaling through phospholipase C-beta in the developing human prefrontal cortex", *Journal of neuroscience research*, vol. 84, no. 1, pp. 13-26.

Runnels, L.W. & Scarlata, S.F. 1999, "Determination of the affinities between heterotrimeric G protein subunits and their phospholipase C-beta effectors", *Biochemistry*, vol. 38, no. 5, pp. 1488-1496.

Sabri, A., Pak, E., Alcott, S.A., Wilson, B.A. & Steinberg, S.F. 2000, "Coupling function of endogenous alpha(1)- and beta-adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes", *Circulation research*, vol. 86, no. 10, pp. 1047-1053.

Sadoshima, J. & Izumo, S. 1993a, "Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype", *Circulation research*, vol. 73, no. 3, pp. 413-423.

Sadoshima, J. & Izumo, S. 1993b, "Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers", *Circulation research*, vol. 73, no. 3, pp. 424-438.

Sanchez-Fernandez, G., Cabezudo, S., Garcia-Hoz, C., Beninca, C., Aragay, A.M., Mayor, F., Jr & Ribas, C. 2014, "Gα_q signalling: the new and the old", *Cellular signalling*, vol. 26, no. 5, pp. 833-848.

Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. & Lai, F.A. 2002, "PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development", *Development (Cambridge, England)*, vol. 129, no. 15, pp. 3533-3544.

Schelbert, E.B., Fonarow, G.C., Bonow, R.O., Butler, J. & Gheorghiade, M. 2014, "Therapeutic targets in heart failure: refocusing on the myocardial interstitium", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 21, pp. 2188-2198.

Schluter, K.D. & Wenzel, S. 2008, "Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks", *Pharmacology & therapeutics*, vol. 119, no. 3, pp. 311-325.

Schnabel, P., Gas, H., Nohr, T., Camps, M. & Bohm, M. 1996, "Identification and characterization of G protein-regulated phospholipase C in human myocardium", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 28, no. 12, pp. 2419-2427.

Schnabel, P., Mies, F., Nohr, T., Geisler, M. & Bohm, M. 2000, "Differential regulation of phospholipase C-beta isozymes in cardiomyocyte hypertrophy", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 275, no. 1, pp. 1-6.

Schoen, F.J., Lawrie, G.M. & Titus, J.L. 1984, "Left ventricular cellular hypertrophy in pressure- and volume-overload valvular heart disease", *Human pathology*, vol. 15, no. 9, pp. 860-865.

Segura, A.M., Frazier, O.H. & Buja, L.M. 2014, "Fibrosis and heart failure", *Heart failure reviews*, vol. 19, no. 2, pp. 173-185.

Serner, G.G., Boddi, M., Cecioni, I., Vanni, S., Coppo, M., Papa, M.L., Bandinelli, B., Bertolozzi, I., Polidori, G., Toscano, T., Maccherini, M. & Modesti, P.A. 2001, "Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function", *Circulation research*, vol. 88, no. 9, pp. 961-968.

Sheridan, D.J. 1984, "Growth of the heart in health and disease" in , ed. R. Zak, Raven Press, New York, pp. 205-206.

Shimizu, G., Zile, M.R., Blaustein, A.S. & Gaasch, W.H. 1985, "Left ventricular chamber filling and midwall fiber lengthening in patients with left ventricular

hypertrophy: overestimation of fiber velocities by conventional midwall measurements", *Circulation*, vol. 71, no. 2, pp. 266-272.

Shimizu, I. & Minamino, T. 2016, "Physiological and pathological cardiac hypertrophy", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 97, pp. 245-262.

Shubeita, H.E., McDonough, P.M., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Glembotski, C.C., Brown, J.H. & Chien, K.R. 1990, "Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy", *The Journal of biological chemistry*, vol. 265, no. 33, pp. 20555-20562.

Simon, M.I., Strathmann, M.P. & Gautam, N. 1991, "Diversity of G proteins in signal transduction", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 252, no. 5007, pp. 802-808.

Simpson, P. 1985, "Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating", *Circulation research*, vol. 56, no. 6, pp. 884-894.

Singal, T., Dhalla, N.S. & Tappia, P.S. 2009, "Regulation of c-Fos and c-Jun gene expression by phospholipase C activity in adult cardiomyocytes", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 327, no. 1-2, pp. 229-239.

Singal, T., Dhalla, N.S. & Tappia, P.S. 2006, "Norepinephrine-induced changes in gene expression of phospholipase C in cardiomyocytes", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 41, no. 1, pp. 126-137.

Smith, S.H., Kramer, M.F., Reis, I., Bishop, S.P. & Ingwall, J.S. 1990, "Regional changes in creatine kinase and myocyte size in hypertensive and nonhypertensive cardiac hypertrophy", *Circulation research*, vol. 67, no. 6, pp. 1334-1344.

Smrcka, A.V. 2008, "G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling", *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, vol. 65, no. 14, pp. 2191-2214.

Smrcka, A.V. & Sternweis, P.C. 1993, "Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 13, pp. 9667-9674.

Strassheim, D. & Williams, C.L. 2000, "P2Y2 purinergic and M3 muscarinic acetylcholine receptors activate different phospholipase C-beta isoforms that are

uniquely susceptible to protein kinase C-dependent phosphorylation and inactivation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 50, pp. 39767-39772.

Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. & Schulz, I. 1983, "Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate", *Nature*, vol. 306, no. 5938, pp. 67-69.

Suh, B.C. & Hille, B. 2008, "PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why?", *Annual review of biophysics*, vol. 37, pp. 175-195.

Suh, P.G., Park, J.I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J.C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S. & Ryu, S.H. 2008, "Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes", *BMB reports*, vol. 41, no. 6, pp. 415-434.

Sun, L., Mao, G., Kunapuli, S.P., Dhanasekaran, D.N. & Rao, A.K. 2007, "Alternative splice variants of phospholipase C-beta2 are expressed in platelets: effect on Galphaq-dependent activation and localization", *Platelets*, vol. 18, no. 3, pp. 217-223.

Swedberg, K., Eneroth, P., Kjekshus, J. & Wilhelmsen, L. 1990, "Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group", *Circulation*, vol. 82, no. 5, pp. 1730-1736.

Takenawa, T. & Nagai, Y. 1981, "Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver", *The Journal of biological chemistry*, vol. 256, no. 13, pp. 6769-6775.

Talman, V. & Ruskoaho, H. 2016, "Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration", *Cell and tissue research*, vol. 365, no. 3, pp. 563-581.

Tappia, P.S. & Dhalla, N.S. 2014, *Phospholipases in Health and Disease*, Springer, New York, NY.

Tham, Y.K., Bernardo, B.C., Ooi, J.Y., Weeks, K.L. & McMullen, J.R. 2015, "Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets", *Archives of Toxicology*, vol. 89, no. 9, pp. 1401-1438.

Thomas, J.A. & Marks, B.H. 1978, "Plasma norepinephrine in congestive heart failure", *The American Journal of Cardiology*, vol. 41, no. 2, pp. 233-243.

Tilley, D.G. 2011, "G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function", *Circulation research*, vol. 109, no. 2, pp. 217-230.

Tschope, C. & Paulus, W.J. 2009, "Is echocardiographic evaluation of diastolic function useful in determining clinical care? Doppler echocardiography yields dubious estimates of left ventricular diastolic pressures", *Circulation*, vol. 120, no. 9, pp. 810-20; discussion 820.

Turu, G., Szidonya, L., Gaborik, Z., Buday, L., Spat, A., Clark, A.J. & Hunyady, L. 2006, "Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors", *FEBS letters*, vol. 580, no. 1, pp. 41-45.

Urso, S., Sadaba, R. & de la Cruz, E. 2014, "Asymptomatic severe aortic stenosis: a reopened debate", *Medicina clinica*, vol. 142, no. 9, pp. 406-411.

Vélez, H., Rojas, W. & Montoya, M. 2002, *Fundamentos de Medicina – Cardiología*, 6th edn, Corporación para Investigaciones Biológicas.

Vicente-Steijn, R., Scherptong, R.W., Kruithof, B.P., Duim, S.N., Goumans, M.J., Wisse, L.J., Zhou, B., Pu, W.T., Poelmann, R.E., Schalij, M.J., Tallquist, M.D., Gittenberger-de Groot, A.C. & Jongbloed, M.R. 2015, "Regional differences in WT-1 and Tcf21 expression during ventricular development: implications for myocardial compaction", *PLoS one*, vol. 10, no. 9, pp. e0136025.

Villari, B., Campbell, S.E., Hess, O.M., Mall, G., Vassalli, G., Weber, K.T. & Krayenbuehl, H.P. 1993, "Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 22, no. 5, pp. 1477-1484.

Vinciguerra, M., Santini, M.P., Claycomb, W.C., Ladurner, A.G. & Rosenthal, N. 2009, "Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity", *Aging*, vol. 2, no. 1, pp. 43-62.

Vines, C.M. 2012, "Phospholipase C", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 740, pp. 235-254.

Visel, A., Thaller, C. & Eichele, G. 2004, "GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo", *Nucleic acids research*, vol. 32, no. Database issue, pp. D552-6.

von Domarus, A., Rozman, C. & Farreras, P. 1988, *Medicina interna*, 11^a edn, Doyma, Barcelona.

Waldo, G.L., Ricks, T.K., Hicks, S.N., Cheever, M.L., Kawano, T., Tsuboi, K., Wang, X., Montell, C., Kozasa, T., Sondek, J. & Harden, T.K. 2010, "Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 330, no. 6006, pp. 974-980.

Wang, L.P., Lim, C., Kuan, Y., Chen, C.L., Chen, H.F. & King, K. 1996, "Positive charge at position 549 is essential for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-hydrolyzing but not phosphatidylinositol-hydrolyzing activities of human phospholipase C delta1", *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 40, pp. 24505-24516.

Wang, T., Dowal, L., El-Maghrabi, M.R., Rebecchi, M. & Scarlata, S. 2000, "The pleckstrin homology domain of phospholipase C-beta(2) links the binding of gbetagamma to activation of the catalytic core", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 11, pp. 7466-7469.

Wang, T., Pentylala, S., Elliott, J.T., Dowal, L., Gupta, E., Rebecchi, M.J. & Scarlata, S. 1999, "Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signaling modules", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 14, pp. 7843-7846.

Wasywich, C.A., Webster, M.W., Richards, A.M. & Stewart, R.A. 2006, "Coronary sinus and ascending aortic levels of aldosterone, angiotensin II, and B-type natriuretic peptide in patients with aortic stenosis and in patients with coronary heart disease", *The American Journal of Cardiology*, vol. 97, no. 7, pp. 1068-1072.

Weber, K.T. 1989, "Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 13, no. 7, pp. 1637-1652.

Weber, K.T., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Ahokas, R.A. & Gerling, I.C. 2013, "Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart", *Nature reviews.Cardiology*, vol. 10, no. 1, pp. 15-26.

Wettschureck, N. & Offermanns, S. 2005, "Mammalian G proteins and their cell type specific functions", *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 4, pp. 1159-1204.

Wettschureck, N., Rutten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T.M., Chen, J., Chien, K.R. & Offermanns, S. 2001, "Absence of pressure overload induced myocardial

hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes", *Nature medicine*, vol. 7, no. 11, pp. 1236-1240.

White, S.M., Constantin, P.E. & Claycomb, W.C. 2004, "Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function", *American journal of physiology.Heart and circulatory physiology*, vol. 286, no. 3, pp. H823-9.

Woodcock, E.A., Du, X.J., Reichelt, M.E. & Graham, R.M. 2008, "Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling", *Cardiovascular research*, vol. 77, no. 3, pp. 452-462.

Woodcock, E.A., Grubb, D.R., Filtz, T.M., Marasco, S., Luo, J., McLeod-Dryden, T.J., Kaye, D.M., Sadoshima, J., Du, X.J., Wong, C., McMullen, J.R. & Dart, A.M. 2009, "Selective activation of the "b" splice variant of phospholipase Cbeta1 in chronically dilated human and mouse atria", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 47, no. 5, pp. 676-683.

Wu, D., Jiang, H., Katz, A. & Simon, M.I. 1993, "Identification of critical regions on phospholipase C-beta 1 required for activation by G-proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 5, pp. 3704-3709.

Yang, Y.R., Choi, J.H., Chang, J.S., Kwon, H.M., Jang, H.J., Ryu, S.H. & Suh, P.G. 2012, "Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C-gamma1", *Advances in biological regulation*, vol. 52, no. 1, pp. 138-151.

Yarbrough, W.M., Mukherjee, R., Ikonomidis, J.S., Zile, M.R. & Spinale, F.G. 2012, "Myocardial remodeling with aortic stenosis and after aortic valve replacement: mechanisms and future prognostic implications", *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, vol. 143, no. 3, pp. 656-664.

Yasunari, K., Maeda, K., Watanabe, T., Nakamura, M., Yoshikawa, J. & Asada, A. 2004, "Comparative effects of valsartan versus amlodipine on left ventricular mass and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 43, no. 11, pp. 2116-2123.

Yin, H.L. & Janmey, P.A. 2003, "Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton", *Annual Review of Physiology*, vol. 65, pp. 761-789.

Zawalich, W.S., Bonnet-Eymard, M. & Zawalich, K.C. 2000, "Insulin secretion, inositol phosphate levels, and phospholipase C isozymes in rodent pancreatic islets", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 49, no. 9, pp. 1156-1163.

Zhang, X., Zhang, T., Wu, J., Yu, X., Zheng, D., Yang, F., Li, T., Wang, L., Zhao, Y., Dong, S., Zhong, X., Fu, S., Xu, C.Q., Lu, F. & Zhang, W.H. 2014, "Calcium sensing receptor promotes cardiac fibroblast proliferation and extracellular matrix secretion", *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 33, no. 3, pp. 557-568.

Zhang, Y., Wu, J. & Morgan, T. 2016, "OS 15-01 ASSOCIATION OF CARDIAC (P) RR AND PLC-b3 EXPRESSION IN RATS WITH AORTIC CONSTRICTION", *Journal of hypertension*, vol. 34 Suppl 1 - ISH 2016 Abstract Book, pp. e215.

Zhong, H. & Neubig, R.R. 2001, "Regulator of G protein signaling proteins: novel multifunctional drug targets", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 297, no. 3, pp. 837-845.

Zhou, Y., Wing, M.R., Sondek, J. & Harden, T.K. 2005, "Molecular cloning and characterization of PLC-eta2", *The Biochemical journal*, vol. 391, no. Pt 3, pp. 667-676.

La hipertrofia cardíaca patológica es la respuesta del miocardio a estímulos neurohumorales, a la sobrecarga hemodinámica o a lesiones del tejido cardíaco, y se caracteriza por el incremento de la masa del corazón y del diámetro cardiomiocitario, así como por el desarrollo de fibrosis miocárdica y de disfunción cardíaca. La adrenalina, noradrenalina, angiotensina II y endotelina-1 han sido identificados como los factores neurohumorales más importantes en estimular la hipertrofia cardíaca patológica y en contribuir a su progresión hacia la insuficiencia cardíaca. Todos estos factores hipertróficos comparten el hecho de que dentro del complejo entramado de señalización activan la fosfolipasa C β (PLC β) a través de receptores acoplados a proteínas heterotriméricas G $_{q/11}$. De las tres isoenzimas PLC $\beta_{(1-3)}$ descritas en el miocardio, sólo las isoenzimas PLC β_1 y PLC β_3 han sido relacionadas con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Sin embargo, se desconoce si la isoenzima PLC β_4 también se expresa en tejido cardíaco y qué función podría desempeñar. Asimismo, no se conoce la regulación diferencial que podrían sufrir las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras los diferentes estímulos hipertróficos recibidos en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica, ni la implicación de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en la hipertrofia ventricular izquierda humana.

En este trabajo de investigación se ha realizado el estudio de la expresión de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en la hipertrofia cardíaca centrado en tres aspectos principales: en primer lugar, se ha determinado la expresión proteica de la isoenzima PLC β_4 y el patrón de expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en ventrículo izquierdo (VI) de diferentes especies y en cardiomiocitos murinos HL-1. Gracias a este análisis, se ha establecido que la isoenzima PLC β_4 se expresa en tejido cardíaco y que es la isoenzima más expresada en VI. En segundo lugar, se ha estudiado la regulación diferencial de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ tras el tratamiento con diferentes agentes hipertróficos. Los resultados sugieren que la angiotensina II y la fenilefrina regulan de manera diferencial la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en cardiomiocitos HL-1, aunque con aumentos en la isoenzima PLC β_4 en ambos casos. Por último, mediante la obtención de muestras de VI de pacientes con estenosis aórtica severa, se ha determinado la expresión génica de las isoenzimas PLC $\beta_{(1-4)}$ en un modelo humano de hipertrofia ventricular izquierda, y se ha podido estudiar su asociación con la activación humoral, la hipertrofia cardiomiocitaria, la fibrosis miocárdica e índices de morfología ventricular, función sistólica y función diastólica presentadas por los pacientes.