



FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

NUEVAS TERAPIAS GÉNICAS EN
ENFERMEDADES
CARDIOVASCULARES

*NEW GENE THERAPIES IN
CARDIOVASCULAR DISEASE*

Autor: Nerea Alonso Cubillas

Director/es: Ana Victoria Villar Ramos

Santander, Junio 2016

ÍNDICE

- I. Resumen
- II. Introducción
 - a. Remodelado patológico y tejido implicado
 - b. El remodelado cardiaco a nivel celular y molecular
 - c. Descripción de la proteína Hsp90
 - d. Relación de Hsp90 y TGF- β
 - e. Modelo animal objeto de estudio
- III. Objetivo
- IV. Métodos
 - a. Método de genotipado de los ratones en estudio
 - (a) Extracción de ADN
 - (b) PCR
 - (c) Termociclador
 - (d) Gel de agarosa
 - (e) Electroforesis
 - b. Técnica ecocardiográfica en animal pequeño
- V. Resultados
 - a. Resultados obtenidos del genotipado
 - b. Resultados obtenidos de la ecocardiografía
- VI. Conclusiones
- VII. Agradecimientos
- VIII. Bibliografía

I. Resumen

El corazón es capaz de responder a situaciones de estrés por medio de mecanismos de remodelado y compensación, generando entre otros, hipertrofia y fibrosis miocárdica. La chaperona Hsp90alpha está involucrada en la activación de proteínas clave en el proceso de fibrosis. El objetivo de este estudio es seleccionar ratones deficientes en Hsp90alpha y analizar algunos parámetros ecocardiográficos en dichos animales comparándolos con los de ratones salvajes/wildtype de la cepa C57BL6. Para ello, primero seleccionaremos los ratones homocigotos carentes de Hsp90alpha, realizando un genotipado, y a continuación estudiaremos algunos cambios miocárdicos utilizando un ecocardiógrafo.

The heart is able to respond to stress by remodeling and compensation mechanisms like hypertrophy and fibrosis. The chaperone Hsp90 is involved in the activation of fibrotic related proteins. The aim of this study is to select and study echocardiographic parameters of Hsp90alpha Knock out mice, and compared them to wildtype C57BL6 mice. To this aim, we genotype homozygote knock out mice for Hsp90alpha, and then, we analyze some echocardiographic changes.

II. Introducción

a. Remodelado patológico y tejido implicado

El remodelado patológico del corazón se define como el conjunto de cambios moleculares y celulares que resultan en alteraciones morfológicas, alteraciones dimensionales y funcionales del miocardio. Dentro de estas alteraciones se encuentran el incremento del espesor de las paredes, el incremento de la masa del ventrículo izquierdo, dilatación de la cavidad ventricular que junto a otros eventos del remodelado, a largo plazo puede llevar asociado el fracaso funcional del ventrículo izquierdo (Figura 1).

Numerosas células musculares cardíacas, tanto en el tabique interventricular como en la pared libre del ventrículo presentan un aumento en el diámetro transversal, mantienen conexiones intercelulares con diversas células adyacentes y se encuentran alineadas con un patrón desorganizado formando ángulos oblicuos y perpendiculares entre sí. Esta desorganización celular puede verse especialmente en patologías como la miocardiopatía hipertrófica, en la hipertrofia concéntrica secundaria a sobrecarga de presión, en la estenosis aórtica, en la enfermedad coronaria, en el cor pulmonale e incluso en corazones normales. La distribución de la desorganización celular es distinta en función de que los pacientes presenten gradientes de presión o no; en ambas situaciones existe afectación del septo interventricular por la desorganización celular, los pacientes sin gradiente de presión tienden a presentar también mayor afectación a nivel de la pared libre del VI (ventrículo izquierdo), sugiriendo un proceso miopático difuso.

Es posible, que esta desorganización celular dificulte la transmisión de los impulsos electrofisiológicos normales, originando patrones desordenados de despolarización y repolarización eléctrica con lo que actuaría como sustrato miocárdico arritmogénico. Además, la desorganización celular puede contribuir a alterar la función tanto sistólica como diastólica del miocardio.

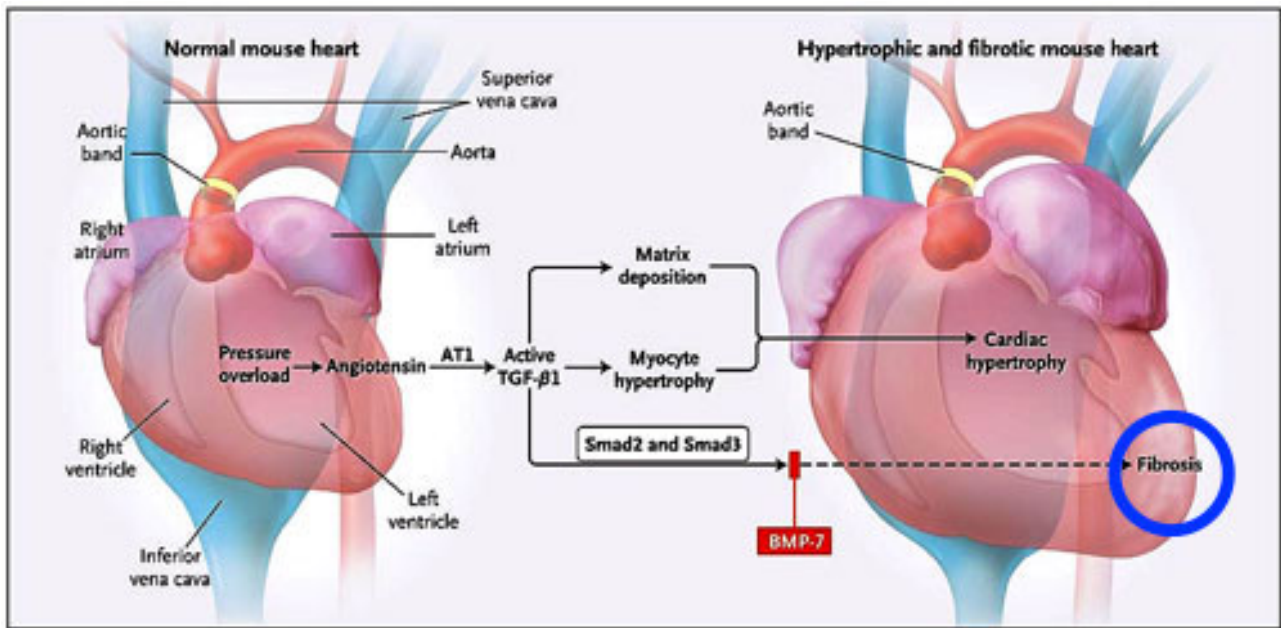


Figura 1ⁱ Modelo animal de constricción del arco aórtico que simula en pacientes la patología de la estenosis aórtica. El factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- β) promueve el remodelado miocárdico, con las consiguientes hipertrofia y fibrosis cardíaca. TGF- β actúa mediante la activación de sus principales mediadores Smad2 y Smad3.

Los pacientes con miocardiopatía hipertrófica suelen mostrar una formación considerable de tejido conectivo en el VI. Además de este aumento de tejido conectivo intersticial, existe una extensa distribución de fibrosis de reemplazamiento que puede ser el resultado de episodios previos de isquemia miocárdica tal y como se identifica por la presencia de anomalías de perfusión miocárdica en los estudios con Talio-201ⁱⁱ. Este hecho puede ser en gran parte responsable del aumento de la rigidez de la cámara ventricular y de la disminución de la relajación identificable en la mayoría de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica.

En la enfermedad coronaria también puede ocurrir un engrosamiento del septo en relación a la pared libre del VI, cuando por un infarto aparece una fibrosis y adelgazamiento de la pared libre del VI, mientras que el septo, no infartado, desarrolla una hipertrofia compensadora.

b. El remodelado cardíaco a nivel celular y molecular

El tejido celular del corazón está formado por distintos grupos celulares, entre los que se encuentran los cardiomiocitos, que representan una tercera parte del tejido, y las células no miocíticas que son los fibroblastos, las células de músculo liso vascular, y las células endoteliales, que constituyen los dos tercios restantes.ⁱⁱⁱ Los fibroblastos intersticiales se ocupan de la síntesis y degradación de la matriz extracelular; son células no diferenciadas y pluripotentes con capacidad de distintas funciones y expresiones fenotípicas^{iv}.

Hay alteraciones de la matriz extracelular consistentes en cambios de su volumen, composición y organización. Existen dos patrones morfológicos distintos de fibrosis basados en el alineamiento entre sí de fibras de colágeno finas y gruesas con el músculo cardíaco. La alteración más conocida es la fibrosis perivascular alrededor de los vasos

intramiocárdicos. Una segunda forma es la fibrosis de reemplazo, consistente en el depósito excesivo de colágeno fibrilar entre los haces musculares.^v

La principal citoquina activadora de la cascada celular que promueve la fibrosis miocárdica es el factor de crecimiento TGF- β (Transforming Growth Factor- β), que además influyen en la participación de otras proteínas importantes del remodelado como las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP). Los fibroblastos producen la mayoría de las moléculas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno, donde distinguimos el colágeno tipo I (fuerza tensional y resistencia) y el tipo III (elasticidad). Hay otros factores que intervienen en la síntesis de colágeno, tales como el mencionado TGF- β , o los factores IGF-1 y CTGF (connective tissue growth factor), citoquinas (TNF- α , IL-1) y varias hormonas y enzimas. La degradación de la matriz extracelular, necesaria para el remodelado y la reparación, está mediada por las metaloproteinasas, cuya transcripción es estimulada por factores como IL-1, PDGF y TNF- α , e inhibida por TGF- β , retinoides, heparina y corticoesteroides^{vi}.

El estroma no es meramente un tejido de sostén, sino una entidad dinámica que interviene activamente en el remodelado y repercute fuertemente sobre las funciones sistólica y diastólica. La fibrosis que forma parte del remodelado patológico del corazón tras un daño no necesariamente es reparativa, y más aun, puede repercutir en la pérdida de miocitos.^{vii}

Existen factores de desencadenan la activación TGF- β , ejemplos de este efecto pueden la sobrecarga de presión, o la activación de la Ang-II (Angiotensina II). Esto conlleva la estimulación de la síntesis y activación de TGF β en los fibroblastos cardiacos. El TGF- β modula el fenotipo fibroblástico y así promueve la síntesis de colágeno, incrementando a su vez la síntesis de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) que pueden inhibir la acción de las metaloproteinasas en su papel ligado a la degradación del exceso de colágeno. El mecanismo de acción de TGF- β , en su ruta canónica, discurre a través de sus receptores de membrana que permiten la transducción de la señal generada por TGF- β y mediada por sus principales mensajeros secundarios, las proteínas Smad. Smad2/3 se unirán a Smad4 translocándose al núcleo donde se une al promotor de colágeno y otras moléculas profibróticas para finalmente promover la síntesis y deposición de fibras en el corazón.

Cuando se produce una estenosis aórtica, el corazón se hipertrofia y en el intersticio aparece hiperplasia de fibroblastos y de células endoteliales, y con el tiempo, puede llegar a desarrollarse un cierto grado de disfunción ventricular^{viii}. El aumento de cargas (sistólica y/o diastólica) genera cambios hemodinámicos y geométricos destinados en un principio a compensar el desajuste funcional, pero que a largo plazo contribuirán con aumento de disfunción ventricular.^{ix}

Debe tenerse muy en cuenta la participación del colágeno en el proceso. Este tipo de remodelado incluye el crecimiento hipertrófico con agrandamiento miocítico, pero también existe plasticidad tisular del sector no miocítico, como los fibroblastos. Los fibroblastos son por tanto, responsables de la acumulación de colágeno. Este tipo de hipertrofia contribuye a una rigidez anormal del miocardio que interviene en la disfunción sistólica y diastólica existentes.^x

Se han evaluado los cambios en el metabolismo del colágeno en pacientes con IAM (Infarto agudo de miocardio) y hay una mayor formación de cicatriz en grandes infartos que causan IC (Insuficiencia cardíaca) y cuando la arteria responsable permanece ocluida o estenosada a algún nivel.

El TGF- β generado localmente en casos de sobrecarga de presión estimula las respuestas inflamatorias y profibróticas, la hipertrofia miocítica y la alteración de las MMPs, participando activamente en el remodelado cardíaco.^{xi}

c. Descripción de la proteína Hsp90

Hsp90 (Figura 2) es una chaperona molecular altamente conservada que facilita la maduración de una amplia gama de proteínas. Este estabilizador de proteínas dependiente de ATP se caracteriza por proteger la señalización celular.^{xii} Existen un gran número de proteínas cliente de Hsp90 relacionadas con la señalización celular como pueden ser el factor de crecimiento epidérmico^{xiii}, el factor de transición epiteliomesenquimal;^{xiv} el receptor-I del factor de crecimiento de insulina (IGFIR)^{xv}-o el factor de crecimiento transformante TGF- β ^{xvi}.

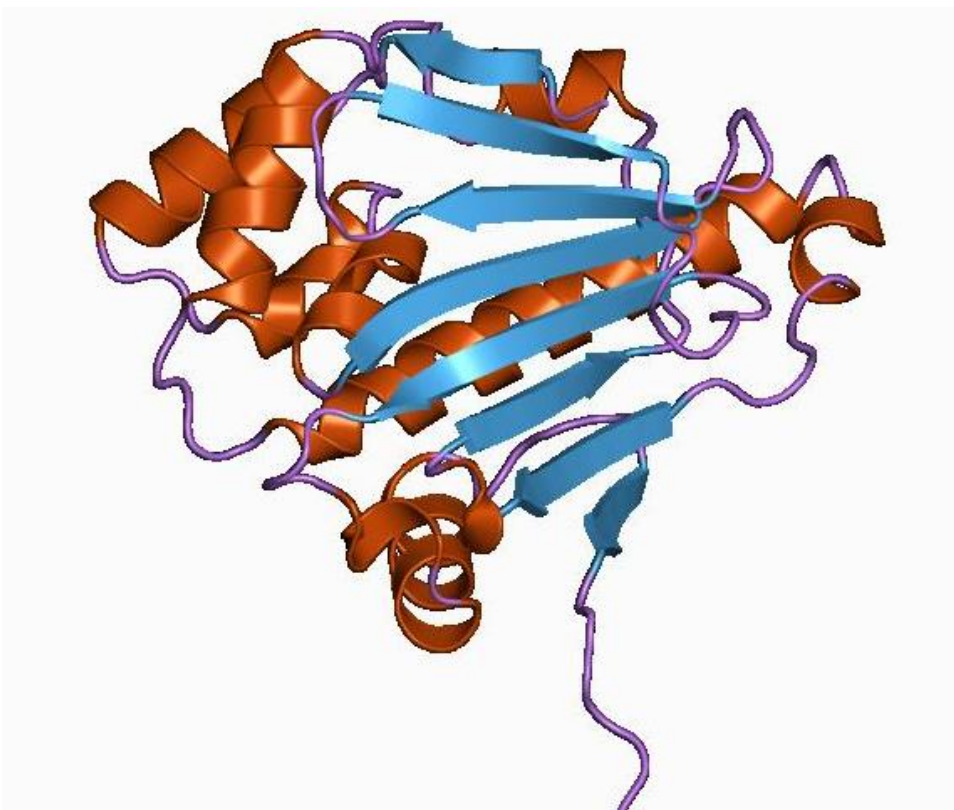


Figura 2.^{xvii} Modelado de la estructura molecular la chaperona Hsp90.

d. Relación de Hsp90 y TGF- β

Se ha observado que en situaciones de estrés celular factores de transcripción como TGF- β son acompañados por chaperonas como Hsp90 para su óptima actividad. La proteína Hsp90 puede unirse a proteínas implicadas en la cascada de señalización de TGF- β en momentos de estrés.

El factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) es la principal citoquina secretada en los procesos proinflamatorios y pro-fibróticos. TGF- β promueve la síntesis de fibras de la matriz extracelular y la proliferación de fibroblastos para la formación y el mantenimiento de un ambiente pro-fibrótico^{xviii}.

Hay un número limitado de estudios recientes relacionados con la fibrosis que vinculan Hsp90 con la cascada de señalización de TGF- β ^{xix}. Se ha descrito que la inhibición de Hsp90 atenúa la fibrosis renal a través de la degradación del receptor de tipo II de TGF- β .^{xx}

e. Modelo animal objeto de estudio

La posibilidad de disponer de modelos animales con ausencia de proteínas clave en algunos procesos celulares ayuda a la comprensión de los mecanismos moleculares de ciertas patologías. El ratón deficiente en Hsp90 α 1 (isoforma α que se expresa en situaciones de estrés) puede ser de gran utilidad para comprender el papel de esta chaperona en la cascada de señalización de la síntesis del colágeno mediada por TGF- β .

III. Objetivos

El objetivo de este estudio es seleccionar ratones deficientes en Hsp90 α 1 (isoforma α que se expresa en situaciones de estrés, a diferencia de la isoforma β constitutiva), y analizar los parámetros ecocardiográficos de los ratones deficientes en Hsp90 α comparándolos con los de un ratón salvaje de la cepa C57BL6 (wildtype o WT). El estudio de las condiciones ecocardiográficas del modelo animal en condiciones basales se engloba dentro de un estudio de mayor amplitud que intentará definir la importancia de la ausencia de Hsp90 α en el remodelado miocárdico secundario al estrechamiento de la válvula aórtica. Para ello, primero haremos un genotipado para seleccionar los ratones homocigotos carentes de Hsp90 α , y a continuación estudiaremos cambios en algunos de los parámetros ecocardiográficos.

IV. Métodos

A. Método de genotipado de los ratones en estudio.

B. Técnica ecocardiográfica en animal pequeño

El estudio se llevará a cabo en ratones manipulados genéticamente carentes del gen de Hsp90 α 1, para el proceso de selección de dichos animales se procede de la siguiente manera:

A.- Método de genotipado de los ratones en estudio

a) **Fase 1: Extracción**

Extracción de DNA con NaOH a partir de cola de ratón

1. Cortar entre 0,2 - 0,5 mm de cola, colocando en un tubo 1,5 ml tipo Eppendorf.

2. Añadir 300 µl de 50 mM NaOH

1 mol/l = 40 moles NaOH

$C_i \times V_i = C_f \times V_f$; $40.000 \times V = 50 \times 50$; $V=62,5 \mu\text{l}$

3. Incubar 30 min en un bloque seco a 98 °C

4. Vortex

5. Volver a incubar 30 min en bloque seco a 98 °C

6. Vortex (si la cola no queda totalmente digerida añadir más incubaciones de 30 min a 98 °C hasta conseguir la digestión completa)

7. Añadir para neutralizar 30µl de 1 M de Tris (pH:8). Al realizar la mezcla de Tris+agua el pH es de 11,12, por lo que usamos ácido clorhídrico para acidificar la solución.

8. Vortex

9. Centrifugar 10 minutos (centrifuga Eppendorf a máxima velocidad)

10. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml tipo Eppendorf

11. Cuantificar DNA/RNA en el espectrofotómetro (A260) dilución 1:50

b) Fase 2: PCR

Primers:

- JW18 Sense () GCTHTTATGGAAGCCTCAGC

JW18: primer que reconoce la región previa en dirección sentido (5' 3'') al gen Hsp90aa1 (sense)

- JW20 AntiSense (KO) CACTCCAACCTCCGCAAATC

JW20: primer que reconoce en dirección antisentido (3'5') la región final del caset sustitutorio del gen Hsp90aa1 en los animales KO.

- JW 21 AntiSense (wt) AGGGTTGTTCTCGGGACTTT

JW21: primer que reconoce en dirección antisentido la región final del gen Hsp90aa1 en los animales WT.

Reaction Mix I para 25 µl

10x Buffer 2,5 x 15 = 37,5

MgCl₂ (50mM) 1 x 15 = 15

dNTPs (10 mM)	$1 \times 15 = 15$
JW18 10 μ M	$2 \times 15 = 30$
JW20 10 μ M	$1 \times 15 = 15$
JW21 10 μ M	$1 \times 15 = 15$
Taq (5U/ μ l)	$0,2 \times 15 = 3$
DNA	1
H2O	$15,3 \times 15 = 229,5$
Volumen final	25 μ l

Tenemos un total de 14 colas, por lo que usaremos el número 15 para evitar el sesgo de pipeteo y quedarnos con menos volumen del necesario.

Cogemos un tubo Eppendorf de 1,5 ml de volumen y realizamos un Premix (buffer, MgCl₂, dNTPs, JW18, JW20, JW21, Taq).

- Buffer: solución tampón que protege al ADN frente a cambios de pH.
- Taq: DNA polimerasa que fragmenta el DNA y permite el reconocimiento de los extremos con dNTPs. Es fundamental para la correcta amplificación de los DNAs.
- dNTPs: nucleótidos que se unen a la secuencia complementaria de ADN.

A continuación cogemos tubos Eppendorf de 1,5 ml (Figura 3), los rotulamos, y añadimos 25 μ l de volumen del Premix en cada Eppendorf, al cual le añadimos a continuación su DNA correspondiente. Una vez lo tengamos, procederemos a la fase 3, y usaremos el termociclador en su programa correspondiente "Hsp90" cuya duración es de 02:15 horas.



Figura 3. ^{xxi} Tubos Eppendorf de diferentes tamaños, en medio, el de 1,5 ml.

c) **Fase 3: Termociclador** (Figura 4)

rotocolo library, y accederemos a nuestro programa que previamente habíamos bautizado como "Hsp90a".

PCR conditions:

- Fase 1: Cinco minutos a 94°C.
- Fase 2: 30 segundos a 94°C + 30 segundos a 65°C + Un minuto a 72°C. Se repite el ciclo 10 veces.
- Fase 3: 30 segundos a 94°C + 30 segundos a 55°C + Un minuto a 72 grados. Se repite el ciclo 25 veces.
- Fase 4: 7 minutos a 72°C

Una vez terminadas todas las fases, las muestras se mantienen a una temperatura de 4°C durante un tiempo indefinido hasta que las recojamos y finalicemos el programa.

Figura 4. Termociclador MyCycler



d) **Fase 4: Gel de agarosa**

Necesitamos 150 ml de TB + 2% de agarosa, por lo que necesitamos 3 gr de agarosa.

e) **FASE 5: Electroforesis**



Figura 5 y 6^{xxii}. La electroforesis es una técnica mediante la que se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico.^{xxiii}

La electroforesis (Figura 5 y 6), va a ayudarnos a identificar de manera visual aquellos animales homocigotos o heterocigotos.

- Los animales KO son los homocigotos para Hsp90alpha y se identifican en la banda 200 bps, gracias a los los primers JW18+JW20. (Figura 7).
- Los animales HE son heterocigotos para Hsp90alpha y se identifican en las bases 200 y 750
- Los animales WT salvajes C57BL6 se identifican en la banda 750 bps, gracias al uso de los primers JW18 + JW21

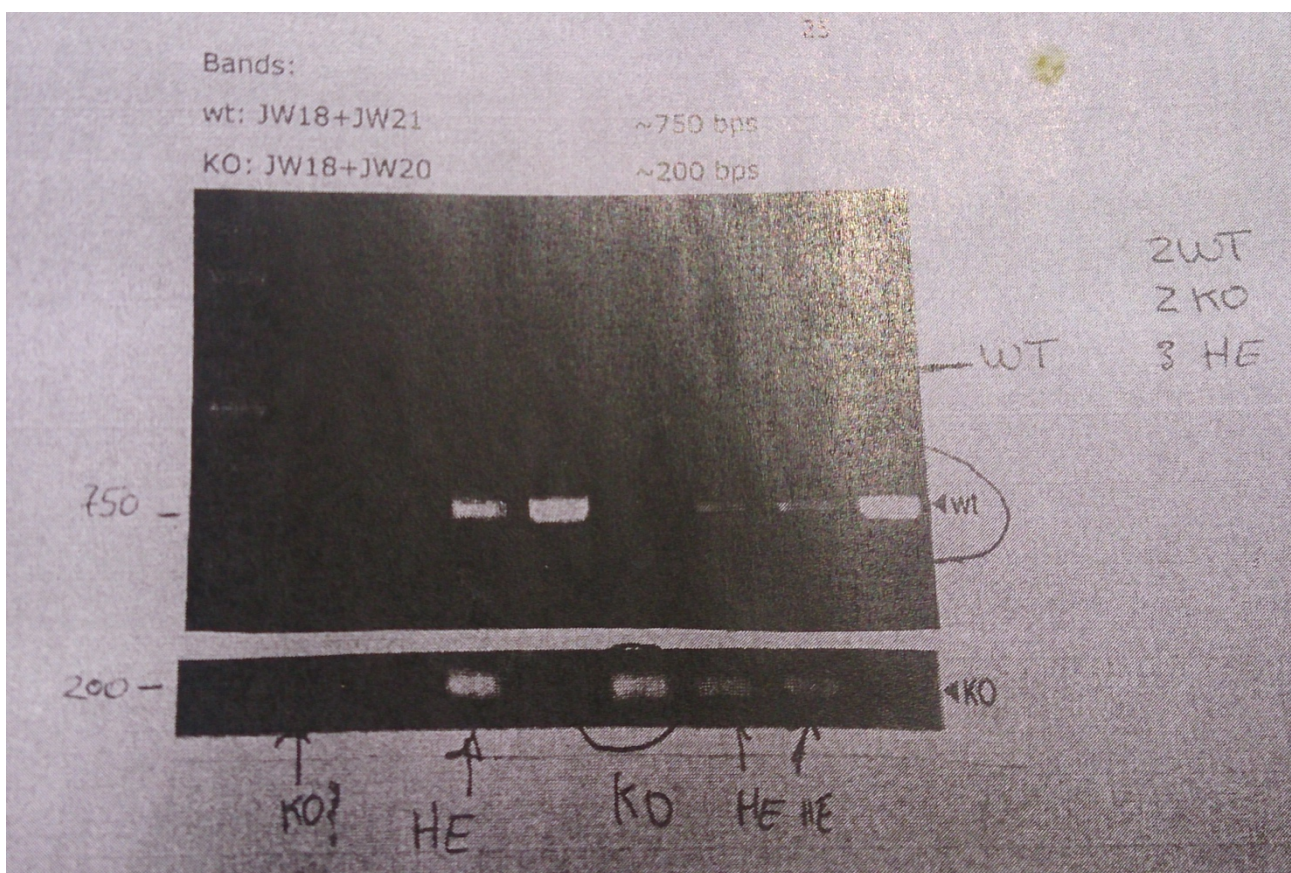
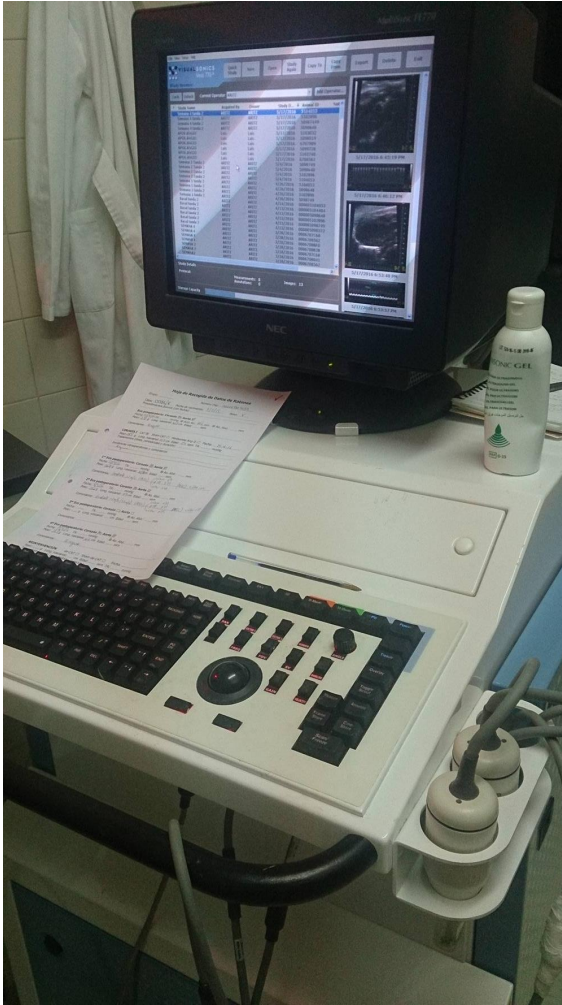


Figura 7. Fotografía de un gel de agarosa que muestra animales heterocigotos en los que vemos banda de 750 bps y 200 bps. Animales Hsp90aa1 KO con banda a 200 bps, que son los animales que estamos buscando para nuestro estudio. Ratones WT (wild type) o salvajes de la cepa C57BL6 que solamente mostrarán la banda a 750 bps.

B.- Técnica ecocardiográfica en animal pequeño



Para el estudio ecocardiográfico se utiliza el ecógrafo "Vevo 770® High-Resolution Imaging System, Visual Sonics" (Figura 8). Se trata de un aparato específicamente diseñado para trabajo experimental con modelos animales de pequeño tamaño (ratones, ratas, peces, etc).

Los parámetros ecocardiográficos a analizar son el grosor de la pared posterior (PP) y grosor del septo interventricular (SIV). Por cada mm. de aumento en el grosor del septo interventricular o de la pared posterior del ventrículo izquierdo, aumenta de dos a tres veces la presentación de arritmias y su complejidad. A la vez, las arritmias ventriculares complejas predisponen a la muerte súbita, de ahí la importancia en definir la hipertrofia ventricular izquierda y sus manifestaciones clínicas^{xxiv}.

Para comenzar nuestra ecocardiografía, lo primero que tenemos que hacer es dormir al ratón, para lo que emplearemos anestesia inhalatoria (Isoflurano) a 2-4 litros/minuto al comenzar, y luego lo mantendremos a unos 2 litros/minuto durante la prueba.

Figura 8: Fotografía de la consola del ecógrafo "Vevo 770® High-Resolution Imaging System, Visual Sonics"

A continuación rasuraremos al ratón en las zonas en las que aplicaremos el gel de ultrasonidos, y le colocaremos boca arriba en la mesa del ecógrafo, sujetándole las cuatro extremidades con celo mientras realizamos la ecografía (Figura 9)

Para un correcto manejo del aparato ecocardiográfico tenemos que conocer:

- "M mode": mide el movimiento longitudinal del septo interventricular (la función sistólica del VI).
- "Doppler tisular": el doppler tisular mide el movimiento (flujo) del endocardio y el movimiento del epicardio, calculando la distancia entre uno y otro.
- "Cine-Store": guarda el vídeo.
- "Frame Store": captura la foto.

No hay que olvidar que tenemos que tener motorizado al ratón en todo momento, y fijarnos en su Frecuencia cardíaca (aprox. 550 lpm); la respiración; la presión arterial y la temperatura corporal.

En nuestro estudio, Los parámetros ecocardiográficos a analizar son el grosor de la pared posterior (PP), el grosor del septo interventricular (SIV), el diámetro telesistólico (DTS), el diámetro telediastólico (DTD) (Figura 10), y la masa cardíaca.

- El grosor del SIV se mide con el “M mode” , preferentemente en el plano paraesternal transverso del corazón.
- El diámetro telesistólico y telediastólico lo mediremos en el eje paraesternal largo con el “doppler tisular”.
- El grosor de la pared posterior lo calculará el ecógrafo a partir de los diámetros telesistólicos y telediastólicos.



Figura 9. Fotografía del brazo articulado donde se coloca la sonda y de la placa térmica donde se sitúa al ratón para realizar la ecocardiografía.

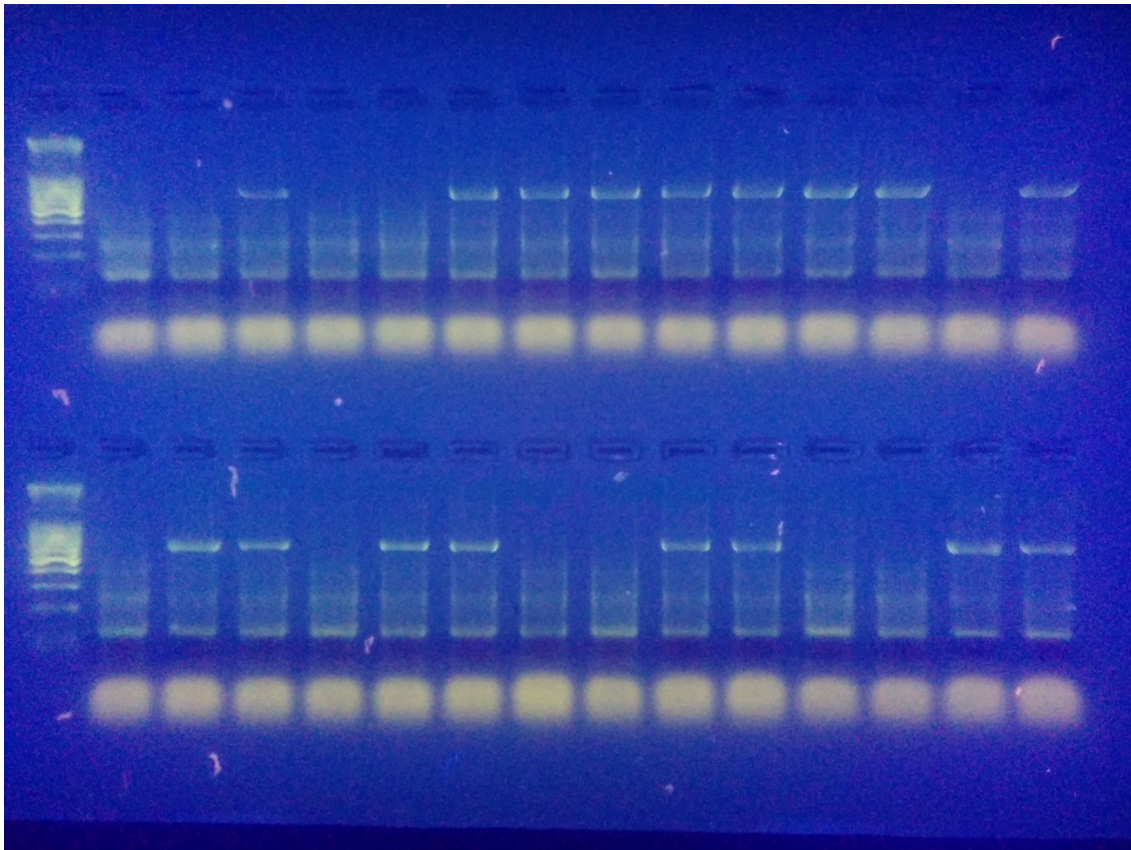


Figura 11: fotografía de un gel de agarosa donde se han cargado 30 muestras, el marcador en la primera calle de cada fila nos indica los pares de bases de cada banda. Los animales heterocigotos (HE) son el 4º, 7º, 8º, 9º, 10º, 11º, 12º, 13º, 15º (de la primera fila); y el 3º, 4º, 6º, 7º, 10º, 11º, 14º, 15º; siendo el resto animales homocigotos (KO).

- A la hora de preparar nuestras soluciones tenemos que ser muy cuidadosos, ya que errores en éstas pueden desnaturalizar el ADN y no ser útil.
- Los machos KO son estériles, por lo que no podemos usarlos para nuestro estudio porque serán homocigotos para Hsp90.
- Necesitaremos para nuestro estudio:
 - machos heterocigotos para el gen Hsp90aa1 para cruzar con las hembras KO
 - hembras KO homocigotas para el gen Hsp90aa1
 - hijos de machos heterocigotos para el gen de HSP90aa1 y hembras KO para dicho gen

2.- Resultados obtenidos de la ecocardiografía

Estudio realizado con dos ratones salvajes de la cepa C57BL6 y con dos ratones KO deficientes en Hsp90aa1. Hemos analizado los datos obtenidos de los parámetros ecocardiográficos en un estudio estadístico de la t' de Student, y hay hallazgos significativos en aquellos en los que la $p < 0,05^*$, y $p < 0,005^{**}$ que hemos representado en las gráficas como asteriscos.

No se aprecian diferencias significativas en los siguientes parámetros:

- Septo interventricular (Figura 12)
- Pared posterior (Figura 13)
- Diámetro telediastólico (Figura 14)

Respecto a la pared posterior, habría que volver a valorarlo con una muestra más grande de ratones, ya que parece que existe una diferencia, aunque no es estadísticamente significativa.

Se aprecian diferencias significativas en:

- Diámetro telesistólico (Figura 15)

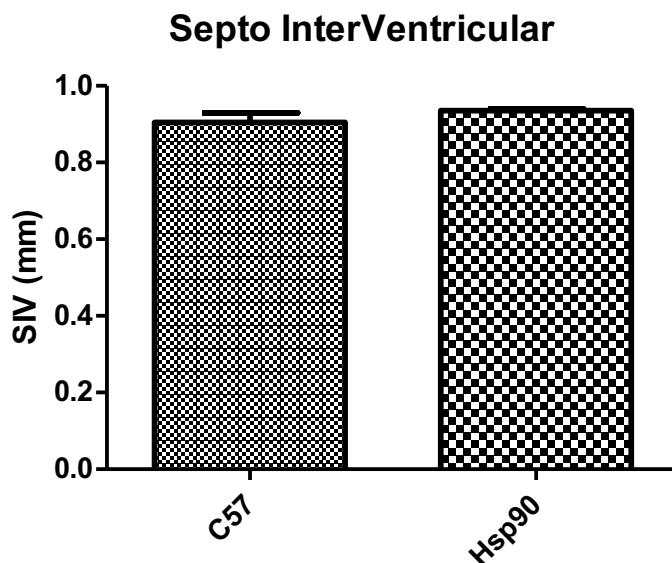


Figura 12: Medida del SIV del corazón de 2 ratones salvajes (C57BL6) y 2 ratones Hsp90alpha KO.

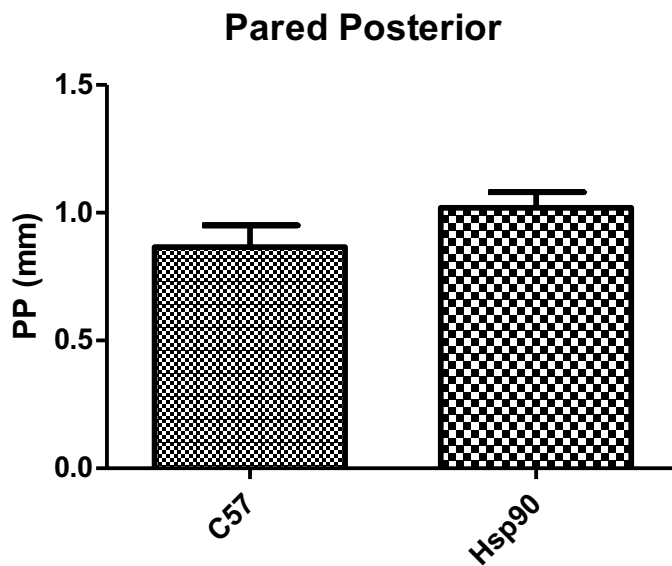


Figura 13: Medida de la PP del corazón de 2 ratones salvajes (C57BL6) y 2 ratones Hsp90alpha KO.

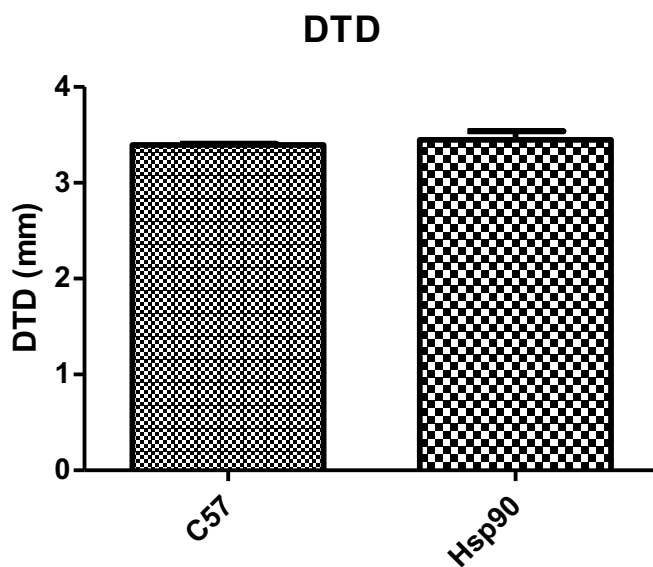


Figura 14: Medida del diámetro telediastólico (DTD) del corazón de 2 ratones salvajes (C57BL6) y 2 ratones Hsp90alpha KO.

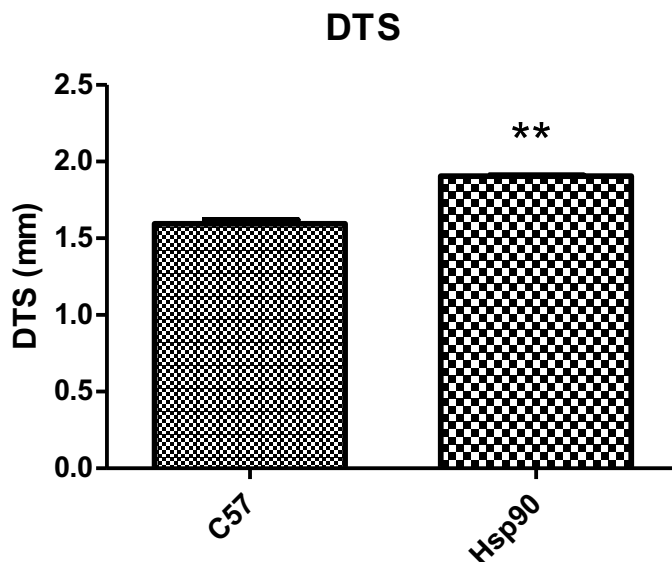


Figura 15: Medida de la variación del diámetro telesistólico (DTS) del corazón de 2 ratones salvajes (C57BL6) y 2 ratones Hsp90alpha KO.

En la figura 15 vemos una clara diferencia en el diámetro telesistólico entre ambos grupos de ratones. La $p < 0,005$ indica que en ratones deficientes de Hsp90aa1 se produce una alteración significativa en el diámetro telesistólico de su corazón con respecto al ratón salvaje de la cepa C57BL6.

Peso del ventrículo izquierdo y del corazón

Tras extraer el corazón del ratón bajo anestesia y se separa el ventrículo derecho del izquierdo, se pesa el ventrículo izquierdo en una balanza de precisión y posteriormente se une el ventrículo derecho para obtener la medida del corazón completo.

Como se observa en la Figura 16 y 17, se aprecian diferencias significativas en:

- Masa cardíaca
- Masa de ventrículo izquierdo.

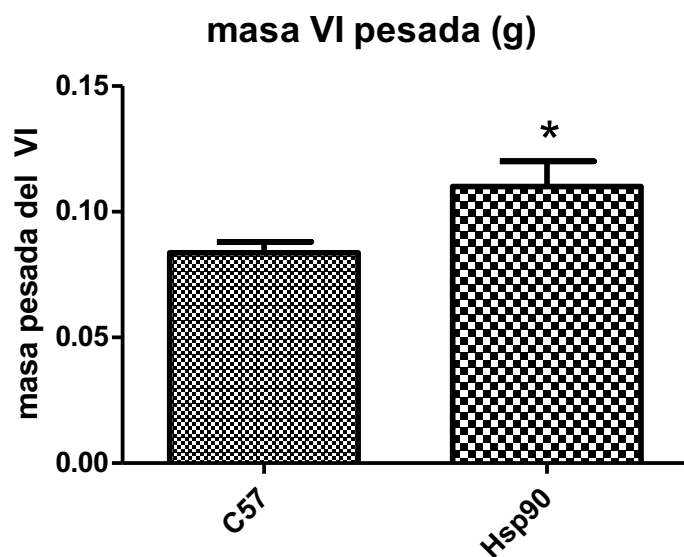
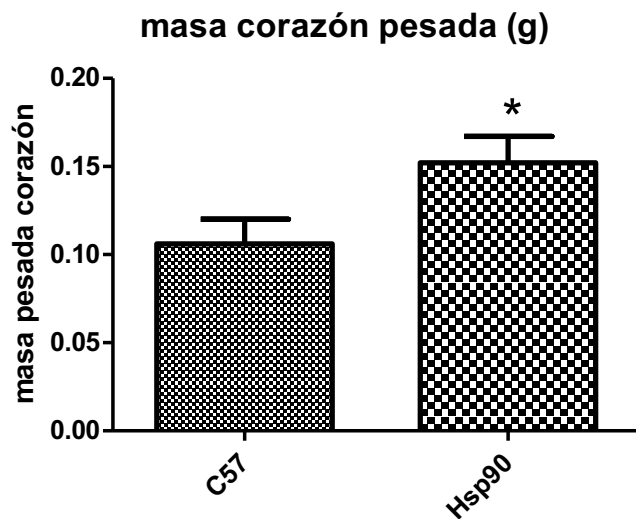


Figura 16 y 17:

La diferencia es significativa ($p < 0,05$) tanto en la masa cardíaca total como en la masa del VI. Si ampliamos nuestro estudio con un mayor tamaño muestral, esperamos obtener un resultado igual, o aún mejor que los mostrados.

VI. Conclusiones

- Mediante la detección del DNA de Hsp90aa1 procedente de los ratones en estudio podemos distinguir la ausencia o presencia de dicho gen en su organismo y escoger los ratones que formarán parte de este estudio por carecer de dicha proteína.
- Los resultados del estudio ecocardiográfico se han elaborado con un número muy reducido de ratones (n=2 por grupo), por lo que los resultados obtenidos han de ser tomados como preliminares a la espera de ampliar la n.
- La ausencia de Hsp90alpha en ratones tiene como consecuencia variaciones en la masa cardíaca y en la masa ventricular izquierda. Esto podría ser debido a los mecanismos de compensación de hipertrofia miocárdica, es decir, el corazón busca una manera de compensar los efectos generados por la ausencia de Hsp90alpha (posiblemente fibrosis) hipertrofiándose para poder compensar la cantidad de flujo o volumen telesistólico.
- La ausencia de Hsp90 en ratones provoca cambios en el diámetro telesistólico, que podrían ser consecuencia del mayor tamaño del corazón o de alguna alteración que requerirá un estudio más profundo.
- La ausencia de Hsp90 en ratones no varía parámetros como el septo interventricular, la pared posterior o el diámetro telediastólico.
 - Dado que los resultados son prometedores, proseguiremos con el estudio usando un mayor tamaño muestral de ratones.

VII. Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han apoyado y han hecho todo lo posible por ayudarme y hacer que comprendiera lo que estaba haciendo en cada momento. Todo el equipo de farmacología de la facultad de medicina me ha aportado su granito de arena, especialmente María Navarro con quien pasé horas en el laboratorio realizando el genotipado de ratones. Nieves García y Ana María Cayón han estado muy presentes cuando estaba un poco despistada y me han ayudado mucho. También quiero agradecer al equipo de cardiología que realiza las ecocardiografías lo bien que me han explicado su trabajo con ratones. Por último dar las gracias a mi mentora, Ana Victoria Villar Ramos, quién me ha apoyado y ha confiado en mí desde el primer día que comenzamos a trabajar, y agradecerle que sin ella este trabajo no sería el mismo.

VIII. Bibliografía

-
- ⁱ Reina Toral A., Navarrete Sánchez I., Colmenero Ruiz M., Vázquez Mara G. Principios de Urgencias, Emergencias y cuidados críticos. SAMIUC. Uninet.
- ⁱⁱ Fernando Mut Bastos. Mario Beretta Barreda. Medicina nuclear en el diagnóstico de enfermedad coronaria. Servicio de Medicina Nuclear, Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, Montevideo, Uruguay. Actualización: 30-nov-05. Disponible online en Fac.org.ar
- ⁱⁱⁱ Weber KT: A whisper in the wind spawns a storm. Cardiovasc Res 2000;46:211-13
- ^{iv} Gabbiani G: Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. Cardiovasc Res 1998;38:545-48
- ^v Jugdutt BI.: Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix. When is enough enough? Circulation 2003;108:1395-403
- ^{vi} Pathak M, Sarkar S, Vellaichamy E, Subha S : Role of myocytes in myocardial collagen production. Hypertension 2001;37:833-40
- ^{vii} Mann DL, Taegtmeyer H : Dynamic regulation of the extracellular matrix after mechanical unloading of the failing human heart. Reversing the missing link in left ventricular remodeling. Circulation 2001;104:1089-91
- ^{viii} Anversa P, Olivetti G, Meggs LG, Sonnenblick EH, Capasso JM.: Cardiac anatomy and ventricular loading after myocardial infarction. Circulation 1993;87(suppl VII):VII.22-27
- ^{ix} Weber KT.: Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. Circulation 1997;96:2488-92
- ^x Pathak M, Sarkar S, Vellaichamy E, Subha S : Role of myocytes in myocardial collagen production. Hypertension 2001;37:833-40
- ^{xi} Sun M, Chen M, Dawood F, et al.: Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. Circulation 2007;115:1398-407
- ^{xii} Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. Nat Rev Mol Cell Biol 11(7):515-528 doi
- ^{xiii} Ahsan A, Ramanand SG, Bergin IL, Zhao L, Whitehead CE, Rehemtulla A, Ray D, Pratt WD, Lawrence TS, Nyati MK (2014) Efficacy of an EGFR-specific peptide against EGFR-dependent cancer cell lines and tumor xenografts. Neoplasia 16(2):105-114

^{xiv} Chen WS, Chen CC, Chen LL, Lee CC, Huang TS (2013) Secreted heat shock protein 90alpha (HSP90alpha) induces nuclear factor-kappaB-mediated TCF12 protein expression to downregulate E-cadherin and to enhance colorectal cancer cell migration and invasion. *J Biol Chem* 288(13):9001-9010

^{xv} Lang SA, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp FC, Dahlke MH, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2007) Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1alpha autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth. *Clin Cancer Res* 13(21):6459-6468

^{xvi} Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, Becvar R, Senolt L, Schett G, Distler JH (2014) Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF-beta signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis* 73(6):1215-1222

^{xvii} Dr. Alvaro Adrian Sandoval Montiel. Papel de la aspirina en la potenciación de la activación del factor de transcripción HSF en células mononucleares de sangre periférica de rata. Universidad nacional autónoma de México. June 2013 | Volume 8 | Issue 6 | e65449

^{xviii} Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG (2011) Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51(4):600-606

^{xix} Myung SJ, Yoon JH, Kim BH, Lee JH, Jung EU, Lee HS (2009). Heat shock protein 90 inhibitor induces apoptosis and attenuates activation of hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 330(1):276-282

Reka AK, Kuick R, Kurapati H, Standiford TJ, Omenn GS, Keshamouni VG (2011) Identifying inhibitors of epithelial-mesenchymal transition by connectivity map-based systems approach. *J Thorac Oncol* 6(11):1784-1792

^{xx} (Noh, Kim et al. 2012). Noh H, Kim HJ, Yu MR, Kim WY, Kim J, Ryu JH, Kwon S. H, Jeon JS, Han DC, Ziyadeh F (2012) Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor-beta type II receptor. *Lab Invest*. 92(11):1583-1596

^{xxi} Shop Online de Eppendorf. 2016 Eppendorf AG

^{xxii} Jose A. Peña, Luis Gómez-Pérez 2007-2016. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco.

^{xxiii} Dr. Ángel Herráez. LEUCAGENT. EPINUT. Universidad de Alcalá. Biomodel UAH. 2011.

^{xxiv} Serra Grima R (1991). Diagnóstico y valoración clínica de la hipertrofia ventricular izquierda en atletas. *Archivos de Medicina del Deporte* (VIII). 32: 331-333