

**REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO TRAS
REPERFUSIÓN AGUDA.
EFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA UROCORTINA-2**



**TESIS DOCTORAL
ISABEL MAYORAL GONZÁLEZ
2021**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO
TRAS REPERFUSIÓN AGUDA.
EFFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA
UROCORTINA-2

Trabajo de investigación presentado por
ISABEL MAYORAL GONZÁLEZ
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla
Sevilla, 2021



El Dr. Antonio Ordoñez Fernández, Catedrático de la Universidad de Sevilla Investigador Responsable del grupo de Fisiopatología Cardiovascular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), junto con el Dr. Tarik Smani Hajami, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica y Co-Investigador Responsable del grupo de Fisiopatología Cardiovascular del IBiS.

CERTIFICAN QUE:

Dña. Isabel Mayoral González, con DNI 30245883D, Graduada en Biomedicina Básica y Experimental por la Universidad de Sevilla con Máster en Investigación Biomédica, ha realizado bajo su supervisión y dirección, el trabajo titulado: “Remodelado ventricular adverso tras reperfusión aguda. Efecto cardioprotector de la Urocortina-2” que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla con mención internacional.

Y para que así conste, firman el presente documento en Sevilla a 23 de Abril del 2021.

Fdo. Dr. Antonio Ordoñez Fernández

Fdo. Dr. Tarik Smani Hajami

A mamá siempre.

Y a la vida.

Sonrisas infinitas.

“Nothing happens unless first we dream”

Carl Sandburg

*“La competición es una lucha de leones, levanta la cabeza, echa los
hombros hacia atrás, camina con orgullo, no te lamas las heridas,
celebralas.*

*Las cicatrices de tu cuerpo son la marca del campeón. Has estado en una
pelea de leones, que no la hayas ganado no significa que no sepas rugir.”*

Krista Vernoff

AGRADECIMIENTOS

Algunas de las mejores cosas siempre se dejan para el final. En esta ocasión voy a comenzar con las miles de palabras bonitas que os merecéis todos aquellos que me habéis acompañado en este viaje. Tranquilos, el chocolate seguirá siendo el final en otras muchas ocasiones.

En primer lugar, me gustaría agradecer la oportunidad que me dieron Antonio y Tarik para poder formar parte de *esto*. *Esto* porque los dos sabéis que para mí el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, ese maravilloso número 113, ha sido mucho más que un sitio de trabajo. Habéis hecho que me sienta como en casa desde el primer momento. Gracias Antonio por decir *sí*, en aquella primera entrevista que me daba la oportunidad de empezar el trabajo fin de master con vosotros. Gracias por todos esos momentos tan enriquecedores que hemos pasado, tú explicando qué era la insuficiencia cardiaca y yo intentando convencerte de que Orai servía para algo. Ha sido un placer tanto que seas mi director de tesis, como disfrutar y aprender de un profesional tan grande como el que eres tú. Queda pendiente una excursión a Cádiz, una exposición de acuarela y escuchar a Isa chica tocar la flauta. Estoy segura de que con tu capacidad de motivación para mantener el grupo unido y activo lograremos hacer todas esas cosas. Y a ti Tarik, qué te voy a decir. Muchas gracias por tu apoyo constante, por ser confidente y amigo. Desde el primer momento has creído en mí. Has sabido pulir muchos de mis defectos, me has dado alas y gracias a ti estoy donde estoy hoy, defendiendo mi tesis doctoral. Creo que las palabras se quedan cortas si tengo que explicar todo en lo que me has ayudado. Parece que haces magia cuando me robas la varita, porque todos sabemos que es mía, y todo nuestro trabajo lo transformas en artículos y charlas apasionantes. Perdóname por todos esos emails. Muy en el fondo sé que los echarás de menos.

Y ahora toca remontarme al laboratorio que llegué en 2016, cuando una mezcla de suerte y destino hicieron que tú, Ale, fueras mi mentor. Son tantas las horas que pasamos juntos que no miento si digo que las he echado de menos más de una vez y de dos. Muchas gracias por ver el potencial de la niña que entraba nueva. Por regalarme todo tu tiempo sin importar la hora ni la fecha y enseñarme todo aquello que no sabía. Que era mucho, y que gracias a ti, ahora es un poquito menos. Nosotros nunca fuimos alumno y tutor, siempre fuimos amigos. Y contigo igual querido Javi. Ya me estoy repitiendo sin acabar la primera carilla, pero cómo te he echado de menos. Gracias por

enseñarme a tener un pensamiento crítico, a que nunca se es suficientemente perfeccionista y a que, de nuevo, puedes encontrar a un amigo entre batas y probetas. Prometo llevarme conmigo todos los consejos que me has dado a lo largo de estos años. No pretenderé que nadie cambie por mí, e intentaré leerme los protocolos directamente del *data sheet*. Lo prometo. Y es que en aquella época también estaba una loca de pelo rizado que me alegraba los días como nadie. Era una sonrisa andante y ella hacía que los días grises fuesen del color de los unicornios y con mucha purpurina. Querida Evis, maldita la hora en la que te marchaste. Se quedó vacío mi lado derecho del ordenador y una parte de mi corazón. Pero no me preocupo, sé que siempre nos quedará *Cárcel o ciudad*. Por último, en esta primera etapa, me gustaría darle las gracias a Nacho, con el que coincidí casi más fuera que dentro del laboratorio. Para cuando yo llegaba, él estaba yéndose. Gracias por dedicarme tiempo, cuando casi ya no lo tenías. Si no me hubieses enseñado a extraer proteínas, Dios sabe que todos los *Western Blot* de esta tesis no hubiesen sido posibles.

Y ¡pum!, de la noche a la mañana, abrí los ojos y estaba rodeada de chicas. El laboratorio al que yo había llegado con el tiempo había cambiado casi por completo. El mismo año que yo llegué también llegó Raquel. Esa persona que sabe escucharte siempre y a la que no le falta ni la música ni la sonrisa. En ese orden. Gracias por la calma que transmites, porque a pesar de tus despistes siempre estás pendiente. Y por toda tu dulzura. A pesar de las idas y venidas de todos los que formábamos el grupo, la que siempre ha estado ahí ha sido Eva. Gracias por ese apoyo constante. Por las charlas matutinas donde sólo estábamos tú y yo. Por ser como una madre que nos cuida y que nada malo quiere que nos pase. Siempre nos llenas de detalles. Muchas gracias a las dos por cuidarme tanto. Y con la llegada de las nuevas generaciones, llegó la horma de mi zapato. Mi querida versión 2.0. Y mi amiga. Querida Isa, contigo todo ha sido muy especial. Has sido mi apoyo incondicional en los días buenos y en los malos. Mi voz de la conciencia y la que me recuerda que *Fold change* y RQ es lo mismo a cada instante. Ya lo dije una vez, no he convivido con hermanos pequeños, pero tú has sido lo más parecido que he tenido a una hermana. Gracias por todo lo que has sabido darme y por ser la perfecta compañera de tesis que se recuerda con el paso de los años, sincera, real y buena. Y por este orden, llegó Marta. Mi compañera de máster a la que nunca hubiese llegado a conocer tanto si no hubiese sido por el laboratorio. Siempre recordaré el congreso de Cáceres. Espero que la vida nos regale muchos más “Y si...”. Gracias por todas las veces que me has echado un cable. Y en la misma línea gracias a ti Débora. Por enseñarme nada más llegar aquellos cultivos de neonatos que me han abierto las puertas a tantos resultados, y por enriquecer

con todo lo que sabes ese futuro bebé que se llama CREB y está en nuestras manos. Este último año me ha acompañado otro gran descubrimiento que es Elisa. Ella llegó sin hacer ruido pero trabajando con ella me he dado cuenta de todo el empeño que pone en cada experimento. Gracias por ser tan *tiquismiquis* como lo soy yo, y así entenderme.

Para terminar, Israel Valverde necesita un punto y aparte. Él es la definición de trabajo, perseverancia y esfuerzo. No sé quién llega a ser más cabezota de los dos, si me preguntan les haré un *graphical abstract* para explicarles que eres tú. Muchas gracias Isra. De nuevo, para ti sólo tengo palabras de agradecimiento. Confiaste en mi para una aventura apasionante y desconocida. Espero haber estado a la altura de las circunstancias. Gracias por contar conmigo y hacerme reír tanto, con ese humor que es sólo tuyo. Muchas gracias también a Encarnita, que ha luchado contra viento y marea para conseguirme muestras de pacientes. Hay poca gente tan comprometida con su trabajo como tú. Gracias a María Caballero o según mi teléfono; “María Caballero Hospital Carvedilo”. Has pasado de ser *aquella médico* que me traía pastillas, de la manera más malsonante, a una persona a la que cada día tengo más ganas de conocer, que sabe mucho, que aprende mucho y que vale mucho la pena. En general, gracias a todos los médicos que hay detrás de este trabajo.

Gracias a Juan Domínguez que a pesar de no estar en el grupo oficialmente, siempre lo ha estado personalmente. Por ser tan atento y tan bueno. Por ser la noche y el día con Ale, ofreciéndome una vida de contrastes en esas horas de comedor. Gracias por trasladarme todo lo que sabes, brindándome siempre tu ayuda.

Gracias a todos esos profesores míos de la carrera con los que me sigo cruzando por los pasillos. Me encantaría que vierais cómo han florecido todas las semillas de conocimiento que me inculcasteis. En especial, gracias a José López Barneo por regalarme aquella tarde de verano en la que me convenciste plenamente de que esto era mi futuro a los 18 años. Gracias tanto a ti, como a Rafa Fernández Chacón por apoyarme siempre en estos casi 10 años que nos conocemos.

Por extensión, quiero dar las gracias a mis niñas del 213, Rocío grande, Rocío chica y un largo etc. Sin vosotras no hubiese sido posible poner a punto las PCRs. Sois un amor. Gracias por ayudarme tanto. Gracias a nuestros otros vecinos, a todo el laboratorio 115 que siempre me han ayudado en lo que han podido, tanto los que están, como Gonzalo o Rosa, y a los que se fueron como

Espe. Y un poquito más lejos gracias a nuestros compañeros de Cáceres, que han sabido llenarme de risas en los congresos y traficar los viernes con más de un anticuerpo. Gracias a todas las personas que forman el instituto porque de una manera u otra generan el ambiente ideal en el que me he sentido tan a gusto trabajando. Gracias a Raquel Gómez, por todas esas charlas tan personales y tan nuestras en los pre-post PCR. Gracias a Fran por alegrarme la vida en cada *microarray*, a Rocío Sánchez por todos los encuentros de pasillo en los que me ha dado ánimo. En general, gracias a todos los técnicos de servicios, especialmente a Alicia que pasó algunos meses en el laboratorio, a los de seguridad, al servicio de informática, a los técnicos de animalario y veterinaria; Jesús, Laura, Alberto, Maite y Marta, que os he tenido tan fritos con el tema ratas. Gracias al servicio de limpieza, que con sus “Buenos días” te hacen empezar con buen pie la jornada.

Gracias a Karim por acogerme en su laboratorio en el Cabimer durante una estancia de un mes para aprender a hacer PCRs con Javier, que era un encanto. Por supuesto gracias a Ana M^a por brindarme la oportunidad de irme a Paris para optar a la mención internacional de esta tesis. Fui con mi mochila llena de miedos y volví, de cuarentena, pero mucho más segura de mí misma. Ojalá no hubiese estado el COVID de por medio. Es irremediable, que hable de Almudena si hablo de Paris. Gracias. Gracias por hacerlo todo tan sencillo. Nos conocimos como cuando se conocen dos niñas pequeñas y se preguntan “¿Quieres ser mi amiga?”. Pues resulta que ella lo fue y lo es a día de hoy. Me regalaste momentos inolvidables. Gracias.

Gracias a mi fisio, Tomás, que me ha arreglado más de una vez la espalda, el cuello y la boca por esas horas de pie y de ordenador que pasan factura. Al igual que a mi querido entrenador Rubén, que en esta última etapa ha sabido enseñarme a desconectar con el deporte cada tarde.

Y aquí mi onza de chocolate. Mi “lo mejor para el final”. Mi familia. Y en mayúsculas, mi madre. Para los que no la conozcáis y estéis leyendo esto, ella es insuperable. Nada le frena. Gracias mamá por tanto. Por aguantarme en todas mis facetas. Por estar siempre tan orgullosa de mi. Por ser mi paño de lágrimas y mi primera llamada de teléfono para las buenas noticias. Por escucharme horas sin mirar el reloj. Por vivir desde el principio hasta el final estos 4 años. Gracias. Ojalá algún día pueda llegar a ser la mitad de mujer de lo que eres tú. Y qué voy a decir de hombre preferido. Mi hermano y yo somos las antípodas. Sin embargo, él me ha enseñado que los sueños no tienen límites. Él es responsable en gran medida de lo que yo soy hoy. Nunca me ha soltado de la mano, aunque se le haya podido olvidar la dirección. Con él he

aprendido el poder que tiene la imaginación dentro de mi mundo cuadrículado. Que un mismo plano puede tener diferentes perspectivas y que, aunque nunca es todo blanco o negro, él siempre es el azul donde refugiarme. Gracias a mi abuela. Para ser correctos a la yaya. Esa mujer que es fuerte como un roble y que impregna carácter. El ejemplo de lucha y sacrificio. Y sobre todo de vida. Gracias yaya por no entender nada, pero entenderlo todo. Por esforzarte siempre en un 120% y ser partícipe de absolutamente todo lo que hay en mi vida. Y gracias también por alimentarnos a todos tan bien. Creo que el laboratorio me va a pedir una bandeja de fardelejos como despedida. Por otra parte, tengo que agradecerle a mi padre la educación que me dio. Por transmitirme la curiosidad investigadora desde pequeña, a nivel prescolar de dinosaurios y conchas. Gracias sobre todo por los momentos de estos últimos años donde nos hemos acercado más, y los cuales no había tenido la ocasión de agradecerte. Gracias a mis tíos. A esa gran pareja de dos que ha estado pendiente de mí a cada instante, celebrando mis éxitos y llamándome en los días de bajón. Gracias tío, porque sólo tú sabes transmitir esa calma y sensibilidad. Gracias tía, por hacerme olvidar todo en cuestión de minutos con tu cariño.

No quisiera olvidarme de las personas que no están. En estos 4 años el yayo hubiese guardado cada recorte de periódico en el que hubiese aparecido y se hubiese sentado en primera fila en cada exposición. Mi abuelo Eduardo, hubiese estado tan orgulloso que hubiese abierto una botella de champagne y mi abuela Dori se hubiese sentido realizada viendo como su nieta, mujer y científica, ha llegado a escribir una tesis, como buena revolucionaria feminista de su época.

Y desgraciadamente, no me queda más remedio que hablar de ti así y aquí. Durante la escritura de esta tesis doctoral y en cada uno de mis logros en estos dos últimos años, no te he podido sacar de mi cabeza. Querido Emilio Galán, sigo muy enfadada con el universo porque hoy no estés aquí. De todas formas, sé que en cada frase y en cada letra hay algo tuyo. Porque eras tú el que estaba cada día al pie del cañón. Siempre has sido tú. Gracias por ser tan buen padre-ino.

Curiosamente la familia no la hace un lazo de sangre, sino las personas que te quieren y para mí, Inma, Pilar y Maite han sido esas *madres* y madrinas a las que he tendido a parecerme en el mundo sanitario. Y con ellas Cristina, Laura y Jaime. Aquellos amigos que siempre están, esos que aparecen en todos tus recuerdos. Esos de los que pasa el tiempo y nada cambia. Gracias por cuidarme. Querida Laura, si éste es mi año, sabes que será el tuyo, no

puede ser de otra manera siendo *mi persona*. Gracias a Manoli, Patricia, Sierra y Domingo que de diferentes maneras siempre se preocupan por mí. A Elvira, que me pregunta siempre cómo van los experimentos. A mis amigos de toda la vida; Juan, Anna, Ana, Carlos y Andrés. A *mi mujer*, mi querida Carmen, aquella que nunca me ha fallado y que siempre ha estado ahí. Mi mitad y mi complemento. A Dani, mi amigo y compañero de batallas en estos duros años que me ha enseñado a respirar hondo y no rendirme. A Lucía por acordarse de mi cuando yo me olvido de ella. A Maribel porque años después de la carrera te hemos adoptado en el laboratorio como una más. A Ana Colmenero, porque en resumidas cuentas, nada hubiese sido igual sin ti. Bendita la hora en que te cruzaste en mi camino, vecina. Eres incondicional. Y a Carmen Mestre, que me ha enseñado a mirar el miedo con el mayor de los corajes y una nueva filosofía de vida. Amiga, ojalá me regales más tiempo y un poquito de tu coraje. Gracias por llenar los días de *sonrisas infinitas*.

Llego al final, y estás tú. Esta historia comenzó y terminó contigo. La frase de "*Nadie dijo que fuera fácil, pero merecerá la pena*" marcó nuestra relación desde que nos conocimos. Creo que sólo nuestras pieles saben lo dura que ha podido ser esta etapa, de trabajo, distancias y reencuentros. Pero igualmente, nadie mejor que tú y que yo sabe, que el éxito de uno no existe sin el esfuerzo del otro. Gracias por hacerme feliz. Por quedarte y acompañarme. Gracias por hacerme adoptar juntos a la gata más bonita del mundo. Gracias por escucharme y por quererme tanto. Querido Pol, lo que nos queda... Por eso NO, no fue fácil, pero una y mil veces SÍ, mereció y merecerá la pena.

A todos vosotros, gracias.

Marta

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible principalmente gracias a la ayuda Predoctoral de Personal Investigador en Formación del V Plan Propio de la Universidad de Sevilla concedida, así como a convocatorias públicas competitivas de los siguientes proyectos de investigación:

- ❖ Remodelado de la entrada de calcio en angiogenesis (2016-2019). Ministerio de Economía y Competitividad (Plan Estatal). BFU2016-74932-C2-2P; 175.000€. Categoría: Investigadora. IP: Tarik Smani Hajami.
- ❖ Detección y análisis genómico de las poblaciones de monocitos inflamatorios en el Infarto con elevación del ST revascularizado: implicación en el pronóstico del remodelado adverso. (2019-2021) Instituto Carlos III . Ref: PI18/01197; 99.220,00 €. IP: Antonio Ordóñez Fernández.
- ❖ Bioimpresión 3D de implantes aórticos personalizados y biocompatibles (3D-BioPrint) (2017-2020). Instituto Carlos III. 00400200101320; 123.420€. Categoría: Investigadora. IP: Israel Valverde.



DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, parte de los resultados obtenidos y otros resultados interesantes, han dado lugar a publicaciones en revistas internacionales y comunicaciones en congresos.

ARTICULOS EN REVISTAS PEER REVIEW (*co-primer autor)

1. Gutierrez-Carretero E.*; **Mayoral-González I.***; Morón F.; Fernández-Quero M.; Domínguez-Rodríguez A.; Smani T.; Ordoñez A. “miR-30b-5p downregulation as a predictive biomarker of coronary in-stent restenosis”. *Biomedicines*. 2021. 4: 354. doi: 10.3390/biomedicines9040354
2. Galeano-Otero I.; Del Toro R.; Guisado A.; Díaz I.; **Mayoral-González I.**; Guerrero-Márquez F.; Gutiérrez-Carretero E.; Casquero-Domínguez S.; Díaz-de la Llera L.; Barón-Esquivias G.; Jiménez-Navarro M.; Smani T.; Ordóñez A. “Circulating miR-320a as a Predictive Biomarker for Left Ventricular Remodelling in STEMI Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention”. *J Clin Med*. 2020. 8;9(4). doi: 10.3390/jcm9041051
3. Avila-Medina J.*; **Mayoral-González I.***; Galeano Otero I*; Rosado JA; Jardin I; Smani T. “Pathophysiological significance of store-operated calcium entry in cardiovascular and skeletal muscle disorders and angiogenesis”. *Advances in Experimental Medicine and Biology; Calcium Signaling*. 2018. 1131:489-504. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1_19
4. Avila Medina J.*; **Mayoral-González I.***; Domínguez-Rodríguez A.*; Ribas J.; Gallardo I.; Ordoñez A.; Rosado JA.; Smani T. “Store Operated Calcium Entry in Cardiac, Skeletal and Smooth Muscle Cells”. *Front. Physiol*. 2018. 9:257. Doi: 10.3389/fphys.2018.00257
5. Domínguez-Rodríguez A.*; **Mayoral-González I.***; Calderón-Sánchez E.; Díaz I.; Sánchez de Rojas de Pedro E.; Ávila-Medina J.; Hmadcha A.; Castellano A.; Rosado JA.; Benitah JP.; Gómez AM.; Smani T.; Ordoñez A. “Urocortin-2 prevents dysregulation of Ca²⁺ homeostasis and improves early cardiac remodeling after ischemia and reperfusion”. *Front Physiol*. 2018; 9: 813. doi: 10.3389/fphys.2018.00813

CAPÍTULO DE LIBRO

- 6.** Smani T.*; **Mayoral-González I.***; Galeano-Otero I.*; Gallardo-Castillo I.; Rosado JA.; Hmadcha A.; Ordoñez A. “Non-coding RNAs and Ischemic Cardiovascular Diseases”. *Non-coding RNAs in Cardiovascular Diseases*. 2020. Chapter 15.
- 7.** Galan E.; González I.; Romero A.; **Mayoral-González I.** “Efecto de los elementos traza y los minerales en la salud”. Libro Homenaje a Teofilo San Feliu. pp. 269 - 283. 2015.

ARTICULOS EN REVISION/REDACCIÓN

- 8.** **Mayoral-Gonzalez I.***; Bevilacqua E.*; Gómez G.; Hmadcha A.; González-Loscertales I.; Reina E.; Sotelo J.; Díaz A.; Pérez-Alcántara P.; Smani Y.; González-Puertas P.; Méndez A.; Uribe S.; Smani T.; Ordoñez A. Valverde I. “Tissue engineered personalized three-dimensional bioprinted vascular graft”. *Biofabrication*. EN REVISIÓN.
- 9.** **Mayoral-González I.**; Calderon-Sanchez E.; Galeano-Otero I.; Gutiérrez-Carretero E.; Fernández-Velasco M.; Domenech N.; Crespo-Leiro MG.; Gómez AM.; Ordóñez A.; Hmadcha A.; Smani T.; “Cardiac protection induced by urocortin-2 facilitates miR-29a regulation of apoptosis and fibrosis after heart revascularization”. *Journal of Molecular Therapy*. EN REVISIÓN.
- 10.** **Mayoral-González I.**; Morón F.; Ordóñez-Fernández A.; Rosado JA.; Smani T. “mir-20a-5p prevents Orai1 activation and post-ischemia and reperfusion cardiac remodeling”. EN REDACCIÓN.
- 11.** **Mayoral-González I.***; Falcon D*.; Calderón-Sánchez E.;.....; Smani T. “The positive feedback loop between Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclase 8 and Orai1 expression by the transcription factor CREB in I/R heart disease”. EN PREPARACIÓN.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- 1.** Encarnación Gutiérrez; **Isabel Mayoral González.** (2020). Biomarcadores en restenosis coronaria: miR-30b. *XXV Congreso de la Sociedad Española*

de Cirugía Cardiovascular y Endovascular. Santander, Cantabria, España. Póster.

- 2.** A Domínguez-Rodríguez; **I Mayoral González**; J Ávila-Medina, E Calderón-Sánchez , I Díaz, JP Benitah, AM Gómez, A Ordoñez, T Smani (2019). “Urocortin-2 Improves early cardiac remodeling after ischemia and reperfusion through the handling of intracellular Calcium concentration”. *Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology*. Lisboa, Portugal.
- 3.** **Isabel Mayoral González**. (2019) “Dysregulation of ion channels expression associated with the adverse cardiac remodeling due to heart revascularization”. *VII Congreso de la Red Española de Canales Iónicos (RECI)*. Cáceres, Extremadura, España. Comunicación Oral.
- 4.** **Isabel Mayoral González**. (2018) “Urocortin-2 prevents dysregulation of Ca²⁺ homeostasis and improves early cardiac remodeling after ischemia and reperfusion”. *XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)*. Cádiz, Andalucía, España. Comunicación Oral.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	XVI
ABSTRACT.....	XXI
INTRODUCCIÓN	1
1. ISQUEMIA / REPERFUSIÓN EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA	3
1.1. Daños agudos derivados de I/R	6
a) Lesiones por estrés oxidativo	7
b) La importancia de la homeostasis del Ca ²⁺	9
1.2. Muerte celular después de I/R: Apoptosis y Necrosis	12
1.3. Remodelado cardiaco adverso.....	14
a) Fibrosis e hipertrofia.....	14
b) Factores de transcripción en células cardiacas	16
2. PAPEL DE LOS MICRORNAS EN EL INFARTO CARDIACO	18
2.1. MiRNAs en el infarto.....	19
2.2. MiRNAs como perspectivas futuras.....	21
3. UROCORTINA COMO TRATAMIENTO CARDIOPROTECTOR.....	22
3.1. Péptidos y receptores	22
3.2. Efectos cardiovasculares.....	23
3.3. El papel de la Ucn en la muerte celular y remodelado cardiaco	24

OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. ESTUDIOS REALIZADOS CON MUESTRAS DE PACIENTES	33
2. MODELO ANIMAL DE I/R	34
1.1. Modelo de I/R en rata adulta.....	34
1.2. Cultivo primario de ratas neonatales	36
3. TÉCNICAS DE IMAGEN POR ULTRASONIDOS Y MEDICINA NUCLEAR	38
4. CORTES HISTOLÓGICOS Y TAMAÑO DE INFARTO	38
5. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN: SILENCIAMIENTO Y SOBREEXPRESIÓN DE GENES EN NRVM.....	39
6. EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-qPCR.....	40
6.1. Extracción de miRNA y ARN total	40
6.2. Retrotranscripción	41
6.3. qPCR para miRNAs diana y genes apoptóticos/fibróticos	43
6.4. Cuantificación relativa y análisis estadístico de la qPCR.....	47
6.5. <i>Microarray</i> de suero de pacientes.....	47
7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y <i>WESTERN BLOT</i>	48
8. ENSAYOS DE MICROSCOPÍA	50
8.1. Sistema de microfluorimetría de Ca ²⁺	50
a) Protocolo del experimento.....	52
8.2. Inmunofluorescencia	53
a) Determinación del área celular: <i>Wheat Germ Agglutining (WGA)</i>	53
b) Determinación de la co-localización intracelular: <i>Proximity Ligation Assay (PLA)</i>	54
9. ELISA	56
9.1. Ensayo de la Ucn-2.....	56
9.2. Ensayo de la Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	57

9.3. Ensayo del AMPc.....	58
10. BIOINFORMÁTICA	59
11. ANÁLISIS DE LOS DATOS	59
<u>RESULTADOS</u>	61
1. CARACTERIZACIÓN DE PÁRAMETROS HEMODINÁMICOS EN EL MODELO ANIMAL DE I/R TRATADO CON UCN-2	63
1.1. La Ucn-2: cardioprotector natural tras I/R.....	63
1.2. La Ucn-2 mejora la función cardíaca, disminuye el tamaño de infarto y mejora la fibrosis.....	64
2. LA UCN-2 DESENCADENA UNA COMPLEJA REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL IMPLICADA EN LA APOPTOSIS Y FIBROSIS CARDIACA DERIVADA DE I/R	69
2.1. La Ucn-2 modula la expresión de miRNAs en corazón I/R.....	71
2.2. Identificación de los genes diana que afectan los miRNAs desregulados por la Ucn-2.....	73
2.3. MiR-29a regula genes apoptóticos y reduce la expresión de genes de fibrosis inducidos por I/R	75
2.4. Expresión de genes apoptóticos en corazón infartado	79
3. LA UCN-2 MEJORA LA HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} EN LA PATOLOGÍA DE I/R	84
3.1. La Ucn-2 regula la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis del Ca^{2+}	84
3.2. La Ucn-2 disminuye la entrada capacitativa de Ca^{2+}	87
3.3. La Ucn-2 afecta la expresión de Orai1 y TRPC5	88
4. ELEMENTOS DE REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	92
<u>DISCUSIÓN</u>	99

1. ESTRATEGIAS DE CARDIOPROTECCIÓN: LA UCN-2 COMO PÉPTIDO PROTECTOR	101
2. LA UCN-2 Y LA REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL EN I/R.....	104
3. LA UCN-2 Y SU REPERCUSIÓN EN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+} ..	107
4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}	108
<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>111</u>
<u>CONCLUSIONS.....</u>	<u>115</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>119</u>

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2017 y la suma de todas las causas de muerte comparado con las enfermedades cardiovasculares.....	3
Figura 2. Infarto agudo de miocardio debido a la oclusión de la arteria coronaria por placa aterosclerótica u otros factores: formación del territorio isquémico..	4
Figura 3. Coronagrafía que muestra la revascularización de la arteria coronaria cuyo flujo estaba interrumpido.....	5
Figura 4. Porcentaje de muertes por IC con el paso de los años.....	6
Figura 5. Muerte celular provocada por isquemia y fenómeno de I/R.....	6
Figura 6. Cambios funcionales y estructurales durante el proceso de I/R en células cardiacas.....	8
Figura 7. Bases estructurales y moleculares del acoplamiento EC.....	10
Figura 8. Esquema del acoplamiento de STIM-ORAI tras el vaciado de reservorios.....	11
Figura 9. Mecanismo de SOCE en cardiomiocitos.....	12
Figura 10. La morfología de las células en apoptosis, necrosis, autofagia.....	13
Figura 11. Remodelado cardiaco adverso tras un IAM y su reperusión.....	15
Figura 12. Activación del factor de transcripción CREB.....	17
Figura 13. Inhibición de la expresión génica.....	18
Figura 14. MiRNAs implicados en procesos apoptóticos.....	20
Figura 15. MiRNAs implicados en fibrosis.....	21
Figura 16. Efecto de la Ucn en cardiomiocitos.....	24
Figura 17. Operación de I/R de rata Wistar.....	35
Figura 18. Esquema de trabajo para ratas operadas de I/R o I/R+Ucn-2.....	35
Figura 19. Esquema de trabajo para experimentos con NRVM.....	37
Figura 20. Esquema de trabajo con el cultivo primario de NRVM.....	37
Figura 21. Esquema retrotranscripción.....	42
Figura 22. Espectro de excitación del FURA-2AM.....	51
Figura 23. Análisis de la tinción WGA.....	54
Figura 24. Protocolo resumido del ensayo <i>in situ</i> PLA.....	55
Figura 25. Principio del ensayo de Ucn-2.....	57
Figura 26. Principio del ensayo de citotoxicidad LDH-Glo™.....	58
Figura 27. Principio del ensayo cAMP-Gl™.....	59

Figura 28. Esquema de trabajo con las muestras de corazón: zona remota y zona isquémica o de riesgo.....	63
Figura 29. Los niveles de Ucn-2 se regularon positivamente durante la lesión por I/R a 1 semana en suero sanguíneo así como en el receptor de Ucn-2 (CRF-R2).....	64
Figura 30. La Ucn-2 mejora la contractilidad cardíaca en modelo I/R de rata.....	65
Figura 31. La Ucn-2 disminuye el tamaño de infarto.	66
Figura 32. Incremento del LDH en suero de ratas operadas de I/R y tratadas con Ucn-2.....	67
Figura 33. La Ucn-2 previene la fibrosis cardíaca.....	67
Figura 34. Ucn-2 regula la expresión de genes relacionados con la fibrosis en modelo animal de I/R a 1 semana.....	68
Figura 35. La Ucn-2 preserva la hipertrofia cardíaca producida durante el I/R.....	69
Figura 36. Expresión diferencial de miRNAs en pacientes STEMI versus control en suero y músculo cardíaco.....	70
Figura 37. Diferencias significativas en la expresión de los miRNAs en el modelo animal de I/R e I/R tratado con Ucn-2 a 24h y 1 semana post-infarto.....	71
Figura 38. Diferencias significativas a 24h tras I/R no resueltas por Ucn-2 y sin cambios a 1 semana post-infarto.....	72
Figura 39. Búsqueda <i>in silico</i> de genes diana regulados por miR-29a, miR-103, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1*.....	74
Figura 40. Sobreexpresión de miR-29a y miR-451_1* en NRVM.....	76
Figura 41. <i>Microarray</i> de genes apoptóticos en las condiciones de I/R e I/R con sobreexpresamiento de los miR-29a y miR-451_1* en NRVM.....	76
Figura 42. Expresión validada por qPCR de los genes apoptóticos en NRVM transfectados con miR-29a y miR-451_1* mimics en modelo de I/R <i>in vitro</i>	78
Figura 43. Expresión validada por qPCR de los genes fibróticos en NRVM transfectados con miR-29a y miR-451_1* mimics en modelo de I/R <i>in vitro</i>	79
Figura 44. Genes apoptóticos en la zona de riesgo del modelo animal de I/R a 24h y 1 semana.....	80
Figura 45. Efecto de la Ucn-2 sobre los genes apoptóticos en la zona de riesgo del modelo animal de I/R a 24h y 1 semana.....	81
Figura 46. Efecto de la Ucn-2 sobre los genes apoptóticos en la zona remota del modelo animal de I/R a 24h y 1 semana.....	82
Figura 47. Expresión de genes apoptóticos en pacientes con IC.....	83
Figura 48. La Ucn-2 regula la expresión de Orai1 y TRPC5 tras I/R a 1 semana.....	86

Figura 49. Urocortina-2 inhibe la SOCE exacerbada inducida por I/R en NRVM....**87**

Figura 50. Ucn-2 disminuye la expresión exacerbada de Orai1 y TRPC5 en I/R en NRVM.....**88**

Figura 51. Orai1 y TRPC5 participan en el incremento de SOCE en I/R.....**89**

Figura 52. Durante I/R aumenta la co-localización de Orai1 y TRPC5 en NRVM....**92**

Figura 53. Elevación de los niveles de AMPc en los primeros min tras la reperfusión.....**93**

Figura 54. AC8 sobrepresada y pCREB activado en I/R en NRVM.....**95**

Figura 55. El silenciamiento de *Ac8* y *Creb* disminuye la SOCE exacerbada de I/R en NRVM.**96**

Figura 56. Orai1 y TRPC5 ven afectada su expresión afectada cuando se silencia *Creb* en I/R en NRVM.....**97**

Figura 57. El silenciamiento de *Orai1* y *TRPC5* afecta a la activación de pCREB 5 min post-I/R en NRVM.....**97**

Figura 58. Sobreexpresión de AC8 y Orai1 en muestras de ventrículo de pacientes con IC.....**98**

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Localización de los CRFs y sus ligandos.....	23
Tabla 2. Composición medios de cultivo.....	36
Tabla 3. Composición medio isquémico.	37
Tabla 4. Secuencias de siRNA en dirección 5' – 3'.....	39
Tabla 5. Secuencias maduras de miRNA.....	40
Tabla 6. Resumen de kits de RT utilizados.....	42
Tabla 7. <i>Primers</i> de miRNAs utilizados.....	44
Tabla 8. <i>Primers</i> de genes utilizados.....	44
Tabla 9. Diseño de placa comercial <i>PrimePCR Apoptosis and Survival Tier 1</i>	46
Tabla 10. Anticuerpos primarios usados para la técnica de WB.....	49
Tabla 11. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de WB.....	50
Tabla 12. Composiciones utilizadas durante los experimentos de WB.....	50
Tabla 13. Composiciones de soluciones utilizadas en el sistema de Ca ²⁺	52
Tabla 14. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de PLA.....	56
Tabla 15. Anticuerpos secundarios de inmunofluorescencia.....	56
Tabla 16. Resumen de los parámetros hemodinámicos evaluados en ratas Sham, I/R e I/R + Ucn-2 a 1 semana.....	66
Tabla 17. <i>Microarray</i> de genes relacionados con la homeostasis del Ca ²⁺	84

ABREVIATURAS

ABL: <i>ABL Proto-Oncogene</i>	CBP: <i>CREB Binding Protein</i>
AC: <i>Adenylyl Cyclase-Adenilato Ciclasa</i>	CDKN: <i>Cyclin Dependent Kinase inhibitor</i>
ACR: <i>Adverse Cardiac Remodeling</i>	Col: <i>Colágeno</i>
AIFM: <i>Apoptosis-Inducing Factor Associated to Mitochondrial</i>	CREB: <i>c-AMP Response Element-Binding</i>
AKT: <i>Serine / Threonine Kinase</i>	CRF: <i>Corticotropin Releasing Factor</i>
AMI: <i>Acute Myocardial Infarction</i>	Ct: <i>cycle threshold - ciclo umbral</i>
AMPC: <i>Adenosín Monofosfato-3',5' cíclico</i>	Cycs: <i>Citocromo C</i>
APC: <i>Regulator of WNT signaling pathway</i>	DNMT3A: <i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
APAF: <i>Apoptosis Protease-Activating Factor</i>	ECG: <i>Electrocardiograma</i>
ARNm: <i>ARN mensajero</i>	EGTA: <i>Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N, N, N, N-tetraacetic acid</i>
ARNr: <i>ARN ribosómico</i>	ELISA: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ARNt: <i>ARN total</i>	EPAC: <i>Exchange Protein Activated by cAMP</i>
ATM: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	ERBB: <i>Estrogen Receptor β</i>
BAD: <i>Bcl-2 Antagonist of cell Death</i>	FA: <i>Fracción de Acortamiento</i>
BAK: <i>Bcl2-Antagonist/ Killer</i>	FADD: <i>Fas Associated Death Domain</i>
BAX: <i>Bcl-2-like protein</i>	FBS: <i>Fetal Bovine Serum-Suero fetal bovino</i>
BCL2: <i>B cell Lymphoma</i>	FC: <i>Frecuencia Cardiaca</i>
BD: <i>β-Defensin</i>	FE: <i>Fracción de eyección</i>
BF: <i>Brief Field- campo claro</i>	FEVI: <i>Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo</i>
BIRC: <i>Baculoviral IAP Repeat Containing</i>	FGF: <i>Fibroblast Grow Factor</i>
[Ca²⁺]_c: <i>concentración citoplásmica de calcio</i>	FOXO: <i>Forkhead box O1</i>
[Ca²⁺]_i: <i>concentración intracelular de calcio</i>	GAPDH: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
CACNA1C: <i>Calcium Voltage-gated Channel subunit alpha1 C.</i>	gDNA: <i>genomic DNA</i>
CAD: <i>dominio de activación de CRAC</i>	
CASP: <i>Caspase</i>	
CAV: <i>Caveolin</i>	

GPCR: *G Protein-Coupled Receptors*-
Receptores acoplados a proteínas G
H⁺: protón

HCN4: *Hyperpolarization activated
Cyclic Nucleotide gated potassium
channel 4*

HF: *Heart Failure*

HGF: *Hepatocyte Growth Factor*

HMOX: *Heme Oxygenase*

HPRT: *Hypoxanthine Phosphoribosyl
Transferase*

HRAS: *HRAS Proto-Oncogene*

HS: *Horse Serum*-suero de caballo

HSP: *Heat Shock Protein*

IAM: *Infarto Agudo de Miocardio*

IC: *Insuficiencia Cardiaca*

IL: *Interleukin*

I/R: *Ischemia/Reperfusion*- Isquemia
Reperfusión

JAK: *Janus Kinase*

LCN: *Lipocalins*

LDH: *Lactato deshidrogenasa*

LTCC: *L-Type Calcium Channel*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein
Kinase*

MCL: *Myeloid Cell Leukemia*

MDM: *Mouse Double Minute*

MHC: *Myosin Heavy Chain*

Min: minuto

MiRNA: microRNA

MP: *Membrana Plasmática*

MPTP: *Mitochondrial Permeability
Transition Pore*

MYC: *MYC Proto-Oncogene*

NCX: *Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*-
Inercambiador Na⁺/Ca²⁺

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T
cells*

NFK: *Nuclear factor k*

Nif: Nifedipina

NGF: *Nerve Grow Factor*

NRVM: *Neonatal Rat Ventricle
Myocytes*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCI: *Percutaneous Coronary
Intervention*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PK: *Protein Kinase*

PLA: *Proximity Ligation Assay*

PRKCD: *Protein Kinase C δ type*

qPCR: *quantitative Polymerase Chain
Reaction*

RAPGEF3: *Rap Guanine Nucleotide
Exchange Factor 3*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RQ: *Relative Quantification*

RS: *Retículo Sarcoplásmico*

RT: *Retrotranscripción*

RyR: *Ryanodine Receptor*-Receptor de
Rianodina

s: segundo

S100-A9: *Calcium-binding protein A9*

Sem: semana

SEM: *Standard Error Mean*- Error
estándar de la media

SERCA: *Sarco/Endoplasmic Reticulum
Calcium*

SFRP: *Soluble frizzled-related proteins*

siRNA: silenced RNA-ARN silenciado

SLC8A1: *Solute Carrier Family 8
Member A1*

SOCC: *Store Operated Calcium Channel*

SOCE: *Store Operated Calcium Entry*-
Entrada capacitativa de Ca²⁺

SOD: *Superoxide dismutase*

SRC: *SRC Proto-Oncogen*

STEMI: *ST-segment Elevation
Myocardial Infarction*

STAT: *Signal Transducer Activator Of
Transcription*

STIM: *Stromal Interaction Molecule*

Tª: temperatura

TBP: *TATA Box Binding Protein*

TBS: *Tris-Buffered Saline*

TG: Tapsigargina

Tgf: *Transforming growth factor*

TIMI: Trombólisis en Infarto de Miocardio

TNF: *Tumor Grow Factor*

TP: *Tumor Protein*

TRP: *Transient Receptor Potential*

TTC: cloruro de tetrazolio

Ucn: Urocortina

VEGF: *Vascular Endothelial Grow Factor*

VD: Volumen Diastólico

VS: Volumen Sistólico

WB: *Western Blot*

WGA: *Wheat germ agglutinin*

XIAP: *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

RESUMEN

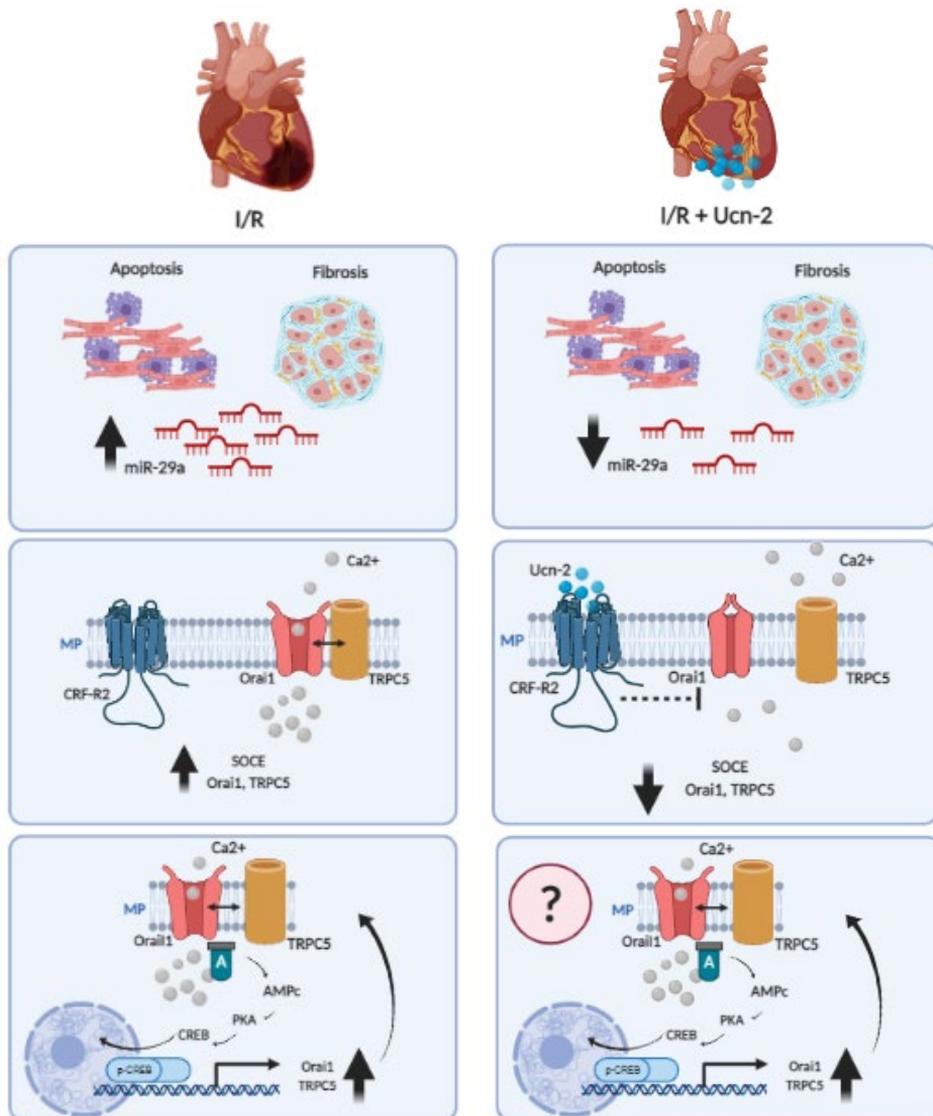
Las **enfermedades cardiovasculares** son la principal causa de muerte en el mundo desarrollado, siendo tres de ellas las más prevalentes para ambos sexos; cardiopatía isquémica (13 % de la mortalidad mundial), ictus (12 %) e hipertensión arterial (2 %) (Virani *et al.*, 2020). La primera de ellas, la **cardiopatía isquémica** es una enfermedad provocada por una disminución del flujo sanguíneo al territorio miocárdico. Esta disminución del suministro a través de la arteria coronaria suele ser debida principalmente a la presencia de placas ateroscleróticas y a su trombosis (Varela *et al.*, 2020). La expresión clínica de esta patología es el **Infarto Agudo de Miocardio (IAM)** cuya acción terapéutica más efectiva para reducir el daño y el tamaño de la zona infartada es la reperfusión temprana usando un procedimiento de **Intervención Coronaria Percutánea (ICP)** o mediante terapia trombolítica. Sin embargo, a pesar de las significativas mejorías que ha aportado la ICP, el 20-30 % de los pacientes sufren un **Remodelado Cardíaco Adverso (RCA)** produciendo cambios en la geometría, el volumen y la función del ventrículo izquierdo, lo que condiciona con el tiempo la aparición de **Insuficiencia Cardíaca (IC)**, siendo ésta un trastorno progresivo y letal responsable de la muerte del 50 % de los pacientes a los 5 años tras el diagnóstico del mismo (Segovia Cubero *et al.*, 2004).

La afección del miocardio por la revascularización es conocida como síndrome de **Isquemia/Reperusión (I/R)**, desencadenando un complejo proceso de RCA donde se ven involucrados diferentes mecanismos; como alteraciones en la vía β -adrenérgica, la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} , la muerte celular, la regulación post-transcripcional o la inflamación (Yellon and Hausenloy, 2007). Y aunque con el paso del tiempo se actualizan los conocimientos, la revascularización temprana sigue siendo insuficiente como tratamiento y es necesaria la búsqueda de otras estrategias de **cardioprotección**. Por eso, este trabajo ha estudiado la eficacia de la **Urocortina-2 (Ucn-2)** como potencial tratamiento cardioprotector.

Primero, nos centramos en la **regulación post-transcripcional** de la Ucn-2. Se analizó un amplio abanico de microRNAs (miRNAs) siendo seis los que se veían incrementados por el proceso de I/R y disminuidos con la Ucn-2. Sin embargo, sólo el miR-29a acabó siendo clave en la **apoptosis y fibrosis cardíaca**.

En segundo lugar, se estudió la **entrada capacitativa de Ca^{2+} o SOCE** (*Store Operated Calcium Entry*). La cual regula la entrada de calcio extracelular por el vaciamiento de los depósitos intracelulares del Retículo Sarcoplásmico (RS). En este proceso participan los canales denominados **SOCC** (*Store Operated Calcium Channels*) y este estudio se centró en **Orai1 y TRPC5**. La Ucn-2, disminuía la expresión e interacción de estos canales, así como la SOCE exacerbada por la I/R.

Finalmente, se estudió **la regulación de Orai1 y TRPC5 por el factor de transcripción CREB**. Por primera vez se describió una vía de señalización mediada por Orai1 que implicaba a la adenilato ciclasa 8 (AC8), CREB y la expresión de canales SOCC en células cardíacas.



ABSTRACT

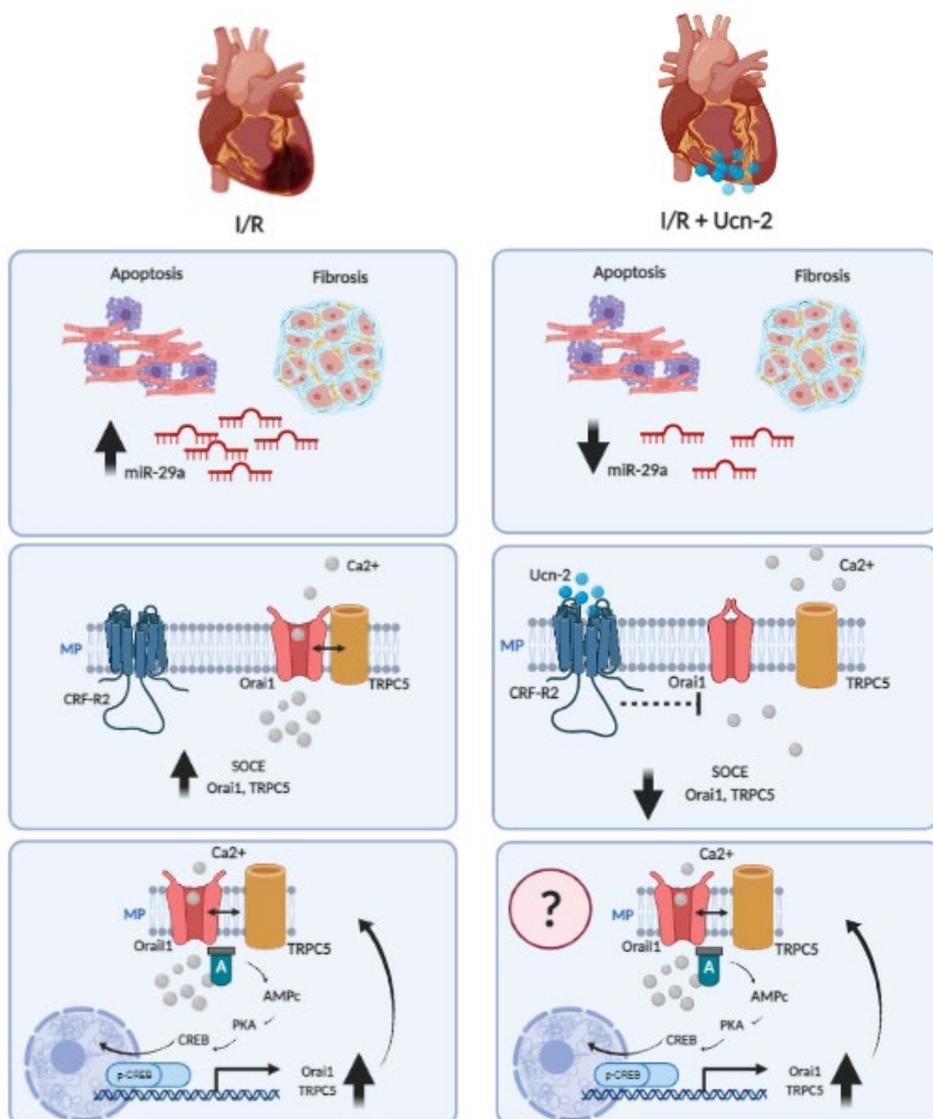
Cardiovascular diseases are the main cause of death in the first world. Being three of them the most prevalent for both sexes; ischemic heart disease (13 % of world mortality), stroke (12 %) and hypertension (2 %) (Virani et al., 2020). *Ischemic heart disease* is caused by a decrease in blood flow in the myocardial territory. Mainly, this decrease is due to acute alterations such as the presence of atherosclerotic plaques or thrombosis (Varela et al., 2020). The clinical manifestation par excellence of this pathology is **Acute Myocardial Infarction (AMI)**. The most effective therapeutic action to reduce the damage and size of the infarct area is reperfusion using a **Percutaneous Coronary Intervention (PCI)** and thrombolytic therapy. Despite the benefits of ICP, 20-30 % of patients underwent **Adverse Cardiac Remodeling (ACR)** and in the last period **Heart Failure (HF)**. This disease is responsible for the death of the 50 % of the patients 5 years after diagnosis (Segovia Cubero et al., 2004).

The affection of the myocardium due to revascularization is known as **Ischemia/Reperfusion syndrome (I/R)**. It is a complex process of ACR where different mechanisms are involved; such as deregulation of β -adrenergic signaling pathway, deregulation of Ca^{2+} homeostasis, cell death, post-transcriptional regulation or inflammation (Yellon and Hausenloy, 2007). Above all, early revascularization remains insufficient as a treatment and it is necessary to search new **cardioprotective strategies**. For this reason, this work has studied the effect of **Urocortin-2 (Ucn-2)** as a potential cardioprotective treatment.

Firstly, we had been focus on the **post-transcriptional regulation** of Ucn-2. We examined a wide range of microRNAs (miRNAs). Six of them were increased by I/R process and decreased by the administration of Ucn-2. However, only miR-29a showed a key role in **apoptosis and cardiac fibrosis**.

Secondly, we studied the **Store Operated Calcium Entry (SOCE)** which regulates the entry of extracellular calcium due to the emptying of intracellular deposits of the Sarcoplasmic Reticulum (SR). The SOCC (Store Operated Calcium Channels) which we had studied were: **Orai1 and TRPC5**. Thus, we discovered that the Ucn-2, decreased the expression and interaction of these channels and decreased the exacerbated SOCE response which appeared with I/R.

Finally, we studied the *regulation of Orai1 and TRPC5 mediated by the nuclear transcription factor CREB*. For the first time, we described a new intracellular pathway mediated by Orai1, implying the adenylyl cyclase 8 (AC8), CREB and SOCC expression in cardiac cells.





INTRODUCCIÓN

1. ISQUEMIA / REPERFUSIÓN EN LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en el mundo actual y de la reducción en la calidad de vida de la población. Dentro de su conjunto se engloban; la cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca o accidentes cerebrovasculares entre otras. Los últimos datos indican que cerca de 17,8 millones de personas mueren al año en todo el mundo de enfermedades cardiovasculares. La suma de las otras principales causas de muerte ni siquiera llegan a alcanzar el conjunto de mortalidad por enfermedades cardiacas (Figura 1) (Murphy, 2013).

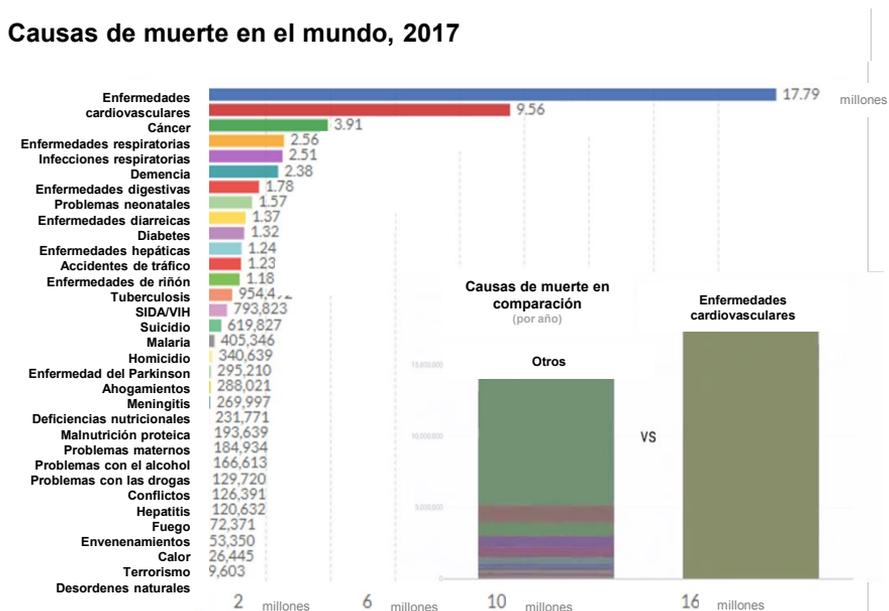


Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial en 2017 y la suma de todas las causas de muerte comparado con las enfermedades cardiovasculares. Fuente: *Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME)*.

El infarto agudo de miocardio (IAM), dentro del total de las enfermedades cardiovasculares, es la principal causa de muerte causando alrededor de 7,3 millones de fallecimientos por año en todo el mundo (Martínez-Pérez *et al.*, 2014). El tipo más común y agresivo es el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI, *ST-Elevation Myocardial Infarction*) (Foth and Mountfort, 2018). El IAM tiene su origen normalmente en la formación de una placa aterosclerótica en las paredes de las arterias coronarias que llevan sangre

al corazón (Figura 2). Cuando la placa se inestabiliza y se rompe, obstruye por una trombosis el vaso e interrumpe el flujo coronario, provocando que parte del territorio del miocardio afectado permanece isquémico y sin aporte de nutrientes (Reddy, Khaliq and Henning, 2015; Chapman, Adamson and Mills, 2017). Este hecho genera un daño miocárdico grave, produciendo una zona necrótica en el lugar del infarto, un área isquémica o de riesgo alrededor de dicha zona y un área más alejada, denominada remota. Todos los cambios estructurales y moleculares acaban generando un remodelado cardiaco fisiopatológico (Richardson *et al.*, 2015).

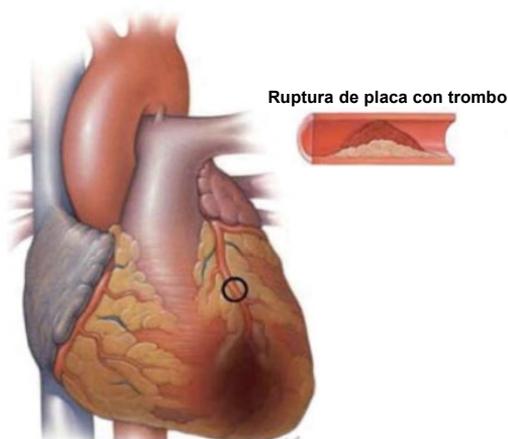


Figura 2. Infarto agudo de miocardio debido a la oclusión de la arteria coronaria por placa aterosclerótica u otros factores: formación del territorio isquémico. Modificado de (Reddy, Khaliq and Henning, 2015).

Actualmente, el tratamiento médico por excelencia consiste en restaurar el flujo coronario lo antes posible. Dicha reperfusión miocárdica se lleva a cabo gracias a terapia trombolítica o a la intervención coronaria percutánea mediante la angioplastia (Reddy, Khaliq and Henning, 2015). En la Figura 3 se puede observar el restablecimiento del riego sanguíneo tras un infarto, en la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Sin embargo, la propia terapia por reperfusión debido a la entrada brusca de sangre oxigenada genera daños asociados al restablecimiento del flujo sanguíneo. A dicho fenómeno se le denomina síndrome de Isquemia/Reperfusion (I/R). Además, en algunas ocasiones las arterias coronarias que han sido reparadas vuelven a ocluirse. Este fenómeno se conoce como reestenosis coronaria y ocurre aproximadamente entre un 10 % y 60 % en función del tipo de angioplastia y de *stent* coronario (Arroyave C Dr. and Cepeda G, 2012). Para lo cual, sigue siendo necesario la investigación en terapias cardioprotectoras.

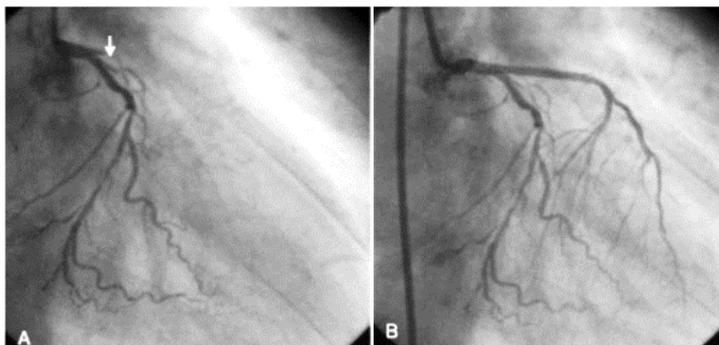


Figura 3. Coronagrafía que muestra la revascularización de la arteria coronaria cuyo flujo estaba interrumpido. **A)** Zona infartada y ocluida. **B)** Terapia de reperfusión por angioplastia primaria. Imagen de paciente cedida por la Dra. Gutiérrez-Carretero.

La cardiopatía isquémica es en la mayoría de los casos origen de Insuficiencia Cardíaca (IC). De hecho, más del 50 % de los casos de IC son de origen isquémico (Gheorghide and Bonow, 1998). La IC es un síndrome clínico progresivo que se acaba produciendo porque el corazón dañado es incapaz de mantener las necesidades metabólicas del organismo provocando un desequilibrio entre la capacidad del corazón para bombear sangre y las necesidades del organismo. Como resultado el paciente acaba desarrollando un cuadro clínico característico que deteriora su calidad de vida (cansancio anormal, dificultad para respirar, edemas...) (Dra. Paola Beltrán Troncoso, 2018; Macaya Miguel, 2018).

La IC sigue teniendo una alta mortalidad y morbilidad. La mortalidad acumulada por periodos anuales va desde aproximadamente el 10 % el primer año, hasta el 50 % al séptimo (Figura 4). Desde el diagnóstico del paciente hasta su muerte hay una media de 5 años (Pons *et al.*, 2010). Además, la IC se ha convertido en la primera causa de hospitalización en mayores de 65 años, el 68 % de los ingresos documentados por el Instituto Nacional de Estadística de los cuales reingresan el 20 %. Reflejando dichos datos en números se destina el 2,5 % del gasto total del Sistema Nacional de Salud en cuidados de estos pacientes (Lupón and Bayés-Genís, 2019).

Aunque el arsenal terapéutico actual para tratar la IC ha mejorado su pronóstico, su mortalidad ha continuado siendo elevada. Estudios recientes muestran que la prevalencia se incrementará de 6 millones actuales que sufren a más de 8 millones para 2030 (Heidenreich *et al.*, 2013).

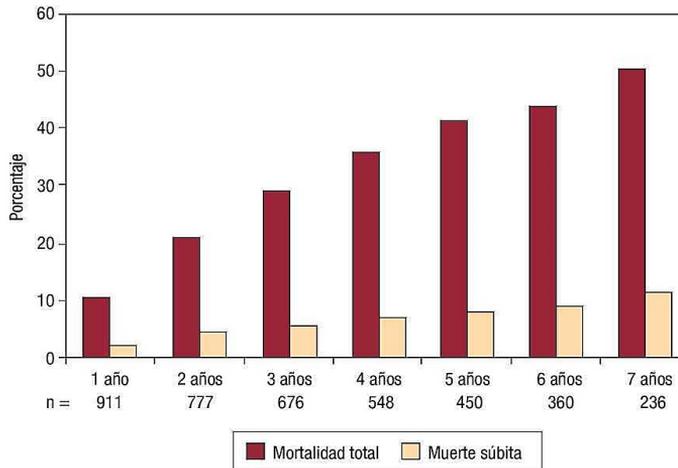


Figura 4. Porcentaje de muertes por IC con el paso de los años. Fuente: (Lupón and Bayés-Genís, 2019).

1.1. DAÑOS AGUDOS DERIVADOS DE I/R

Actualmente, tras sufrir un IAM, la terapia por reperfusión sigue siendo la primera línea de tratamiento. Sin embargo, el restablecimiento del flujo en sí mismo causa una serie de daños derivados del estrés oxidativo por la I/R provocando el denominado síndrome de I/R. Más allá de lo paradójico si cabe, un porcentaje de células cardíacas se precipitan hacia la muerte por la propia restauración del flujo sanguíneo (Piper, 1998) (Figura 5).

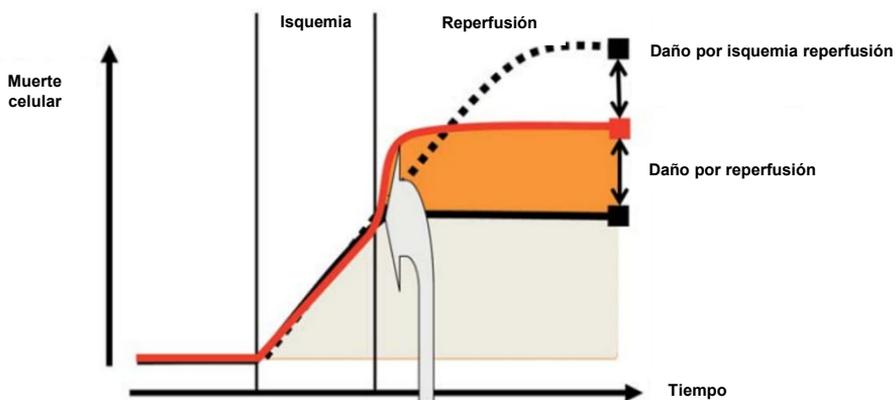


Figura 5. Muerte celular provocada por isquemia y fenómeno de I/R. Fuente: (Ovize *et al.*, 2010).

a) Lesiones por estrés oxidativo

Cuando ocurre la oclusión de la arteria coronaria, la isquemia aguda produce una serie de eventos tóxicos para las células del corazón. Si la oclusión persiste en el tiempo, el déficit de perfusión resultará en un daño irreversible, conllevando la muerte celular. No obstante, si la reperfusión ocurre antes de que el daño sea irreversible, la célula puede recuperarse, aunque el restablecimiento del flujo coronario pueda causar en algunas de ellas daño.

Este daño condicionado por la reperfusión se ha relacionado con muchas causas. Para empezar ocurre una acidificación del pH intracelular, ya que debido a la hipoxia se activa la glucólisis anaerobia y la síntesis enlentecida del ATP acumula grandes cantidades de lactato y protones (H^+) (Neely and Grotyohann, 1984). Además, se produce una sobrecarga de Calcio intracelular (Ca^{2+}_i) a consecuencia de un acumulo de Na^+_i durante la isquemia. El aumento sostenido de H^+ induce al intercambiador Na^+/H^+ a nivel del Retículo Sarcoplásmico (RS) y Membrana Plasmática (MP) a extraer H^+ e incorporar Na^+ . La disminución de ATP hace que deje de funcionar tan eficientemente la bomba Na^+/K^+ fomentando también la acumulación de Na^+ . Finalmente, ese aumento de Na^+ activa el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) de manera reversa y provoca una sobrecarga intracelular de Ca^{2+} (Pike *et al.*, 1993; Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009; Hausenloy and Yellon, 2013). Así mismo, se produce la inhibición de las ATPasas de Ca^{2+} del RS y MP por falta de ATP, favoreciendo de nuevo un cúmulo de Ca^{2+}_i (Steenbergen *et al.*, 1987). Sin embargo, la sobrecarga de Ca^{2+} continua durante el proceso de reperfusión. Se activan mecanismos de corrección de la acidosis intracelular a través del intercambiador Na^+/H^+ de la MP y del cotransportador Na^+/HCO^{3-} . Esta respuesta de corrección de la acidosis intracelular empeora aún más la sobrecarga citosólica de Na^+ y como consecuencia también de Ca^{2+} (Ruiz-Meana and García-Dorado, 2009) (Figura 6). Como resultado de todos estos mecanismos de corrección en cadena la célula reoxigenada acumula una gran cantidad de Ca^{2+} en su interior, comprometiendo seriamente su propia supervivencia.

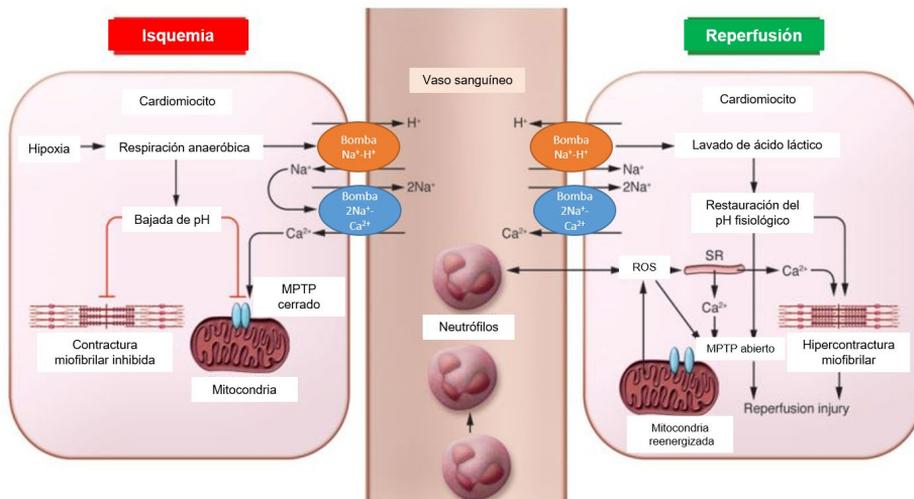


Figura 6. Cambios funcionales y estructurales durante el proceso de I/R en células cardíacas. Durante isquemia se produce un cambio a metabolismo anaeróbico, acidificación del pH, sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} . Tras la reperusión, el transporte de electrones se activa generando ROS (ROS, *Reactive Oxygen Species*) que provocan la apertura del poro mitocondrial (MPTP, *Mitochondrial Permeability Transition Pore*), disfunción del RS que contribuye más a la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular dañando la membrana celular por la peroxidación lipídica y al ADN por daño oxidativo directo, restauración rápida del pH fisiológico y fenómeno de hipercontractura. Los neutrófilos se acumulan en el tejido miocárdico. Fuente: (Hausenloy and Yellon, 2013).

Otro de los fenómenos importantes que ocurre es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) durante los primeros minutos (min) de la reperusión del miocardio (Zweier, Flaherty and Weisfeldt, 1987; Yellon and Hausenloy, 2007). La generación de los ROS provoca daño por diferentes mecanismos. Uno de ellos es la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP, *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) y la posterior liberación del citocromo C (Cytochrome C) desencadenando señal de muerte. El poro mitocondrial es un canal inespecífico cuya función en condiciones fisiológicas es modular los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La sobrecarga de Ca^{2+} y mitocondrial comienza durante la isquemia y se ve exacerbada durante la reperusión donde se reactiva la cadena de transporte de electrones y ocurre un daño inducido por el estrés oxidativo. En un primer momento durante la reperusión, la restauración del potencial de membrana mitocondrial contribuye a recuperar los niveles normales de Ca^{2+} ; a través de la apertura del MPTP. Sin embargo, este mecanismo que en condiciones fisiológicas sirve de ayuda, en esta

situación provoca una apertura descontrolada del poro, dando lugar a despolarización de la mitocondria, pérdida del gradiente de H^+ , cese de la síntesis de ATP y liberación del Ca^{2+} mitocondrial al citosol agravando todavía más la situación y llevando a las células cardiacas a muerte celular (Griffiths and Halestrap, 1995) (Figura 6).

El ion Ca^{2+} es esencial en la regulación de una gran diversidad de funciones celulares, teniendo un papel aún más relevante en los cardiomiocitos al tratarse de células contráctiles que deben ser rítmicas para el correcto funcionamiento del corazón. Así mismo, el Ca^{2+} adquiere un papel principal en determinadas enfermedades cuando el equilibrio en su concentración intracelular se rompe o aparece desregulado (Buja, Hagler and Willerson, 1988; Brooks *et al.*, 1994; Chang and Trayanova, 2016).

b) La importancia de la homeostasis del Ca^{2+}

Mecanismo de Excitación-Constracción (EC)

El corazón realiza dos movimientos para poder bombear la sangre a todos los órganos y territorios periféricos; movimiento de contracción o sístole y movimiento de relajación o diástole. Este movimiento a nivel macroscópico es resultante de la coordinación y sincronía de los cardiomiocitos del tejido cardiaco. La contracción o sístole se produce gracias a un aumento de Ca^{2+} citosólico (Ca^{2+}_c) en estas células proporcionado desde el medio extracelular y RS; y la relajación o diástole debido a una disminución de ese Ca^{2+}_c que recapta el RS y se devuelve al medio externo (Bers, 2000).

Son los canales iónicos y transportadores de la membrana y del RS los principales responsables de esta correcta homeostasis del Ca^{2+} . En condiciones normales, la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática ocurre principalmente a través de los canales de calcio tipo L (LTCC- *L-Type Calcium Channel*) que activan la liberación de Ca^{2+} a través los receptores de rianodina (RyR) en el RS, aumentando así la $[Ca^{2+}]_i$. El descenso de los niveles de Ca^{2+} se lleva a cabo a través del intercambiador NCX de la membrana plasmática, bombas Ca^{2+} /ATP-asa del RS (SERCA) y el transportador del Ca^{2+} de la membrana mitocondrial (Peana and Domeier, 2017) (Figura 7).

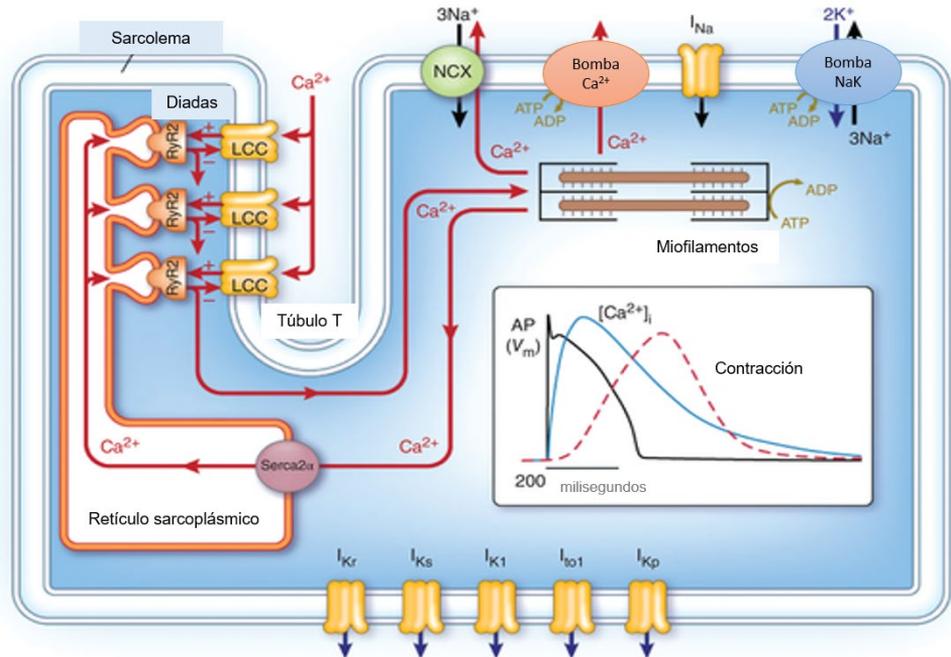


Figura 7. Bases estructurales y moleculares del acoplamiento excitación-contracción. Fuente: (Winslow, Walker and Greenstein, 2016).

Entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE, *Store Operated Ca^{2+} Entry*)

Recientemente, se ha descubierto que en situaciones fisiopatológicas como puede ser la isquemia, juegan un papel importante otros canales y sensores del Ca^{2+} que se activan por el vaciado de reservorios de Ca^{2+} del RS. Estos canales fueron descubiertos hace 35 años por Putney, pero sería más tarde en el año 1995 cuando se les denominó como canales tipo SOCC (*Store-Operated Calcium Channels*) haciendo honor a su función (Putney, 1986). Estos canales eran responsables del flujo de Ca^{2+} regulado por los reservorios, SOCE por sus siglas en inglés. Clásicamente se había descrito su papel en células no excitables pero cada vez más se reconoce su función en las excitables como el músculo cardíaco o liso (Palty *et al.*, 2012; Correll *et al.*, 2015).

En cuanto a los componentes moleculares que participan en SOCE, su descubrimiento ha ido surgiendo paulatinamente en el tiempo, STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) fue descubierta en 2005 y Orai un año más tarde (Roos *et*

al., 2005; Vig *et al.*, 2006). STIM es un sensor de Ca^{2+} presente en la membrana del RS que tras el vaciado del reservorio oligomeriza e interacciona con las unidades que forman SOCC en la membrana plasmática, como por ejemplo Orai, activando así la entrada de Ca^{2+} (Figura 8) (Prakriya and Lewis, 2015). Otras proteínas propuestas en formar SOCC fueron los canales TRP (*Transient receptor potential*) (Montell, 2005; Smani *et al.*, 2016). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la participación de los canales TRP en SOCE. La familia de canales TRP es muy amplia, se clasifican según la homología estructural en seis subfamilias pero son los TRPC los únicos que parecen participar en SOCE (Wu, Sweet and Clapham, 2010; Flockerzi and Nilius, 2014).

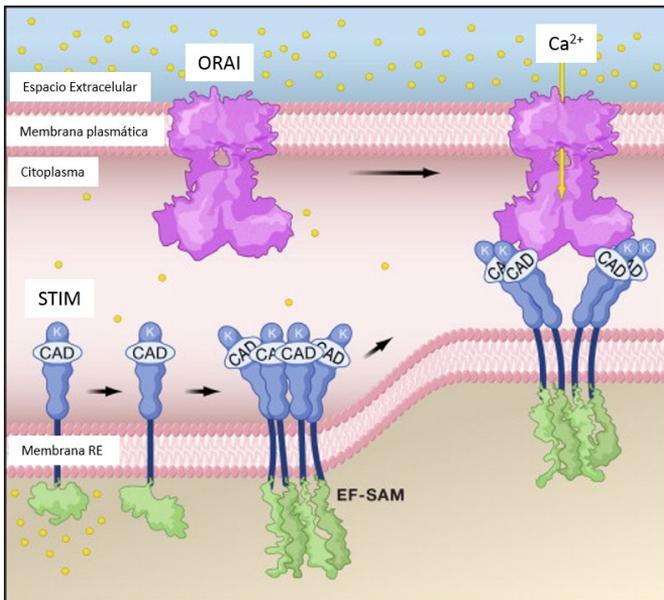


Figura 8. Esquema del acoplamiento de STIM-Orai tras el vaciado de reservorios. Cuando se libera Ca^{2+} del RS, STIM se agrega en complejos tetraméricos y se une a Orai. Los contactos entre el dominio de activación de CRAC (CAD) y los extremos carboxilo y amino de Orai abren el canal, entrando Ca^{2+} en el citoplasma. Fuente: (Stathopoulos *et al.*, 2008).

Los cardiomiocitos presentan las 3 isoformas existentes de Orai (Orai1, Orai2 y Orai3), las tres isoformas de STIM (STIM1, STIM2 y STIM1L) y las siete isoformas de la familia de TRPC (TRPC1-7) (Figura 10) (Avila-Medina *et al.*, 2018; Freichel *et al.*, 2019). Sin embargo, serán las dos primeras isoformas de Orai y STIM con algunas isoformas de TRPC las que tomarán importancia en el estudio de la sobrecarga de Ca^{2+} en el IAM (Collins *et al.*, 2013; Bootman and Rietdorf, 2017; Ma *et al.*, 2017; Bartoli *et al.*, 2019).

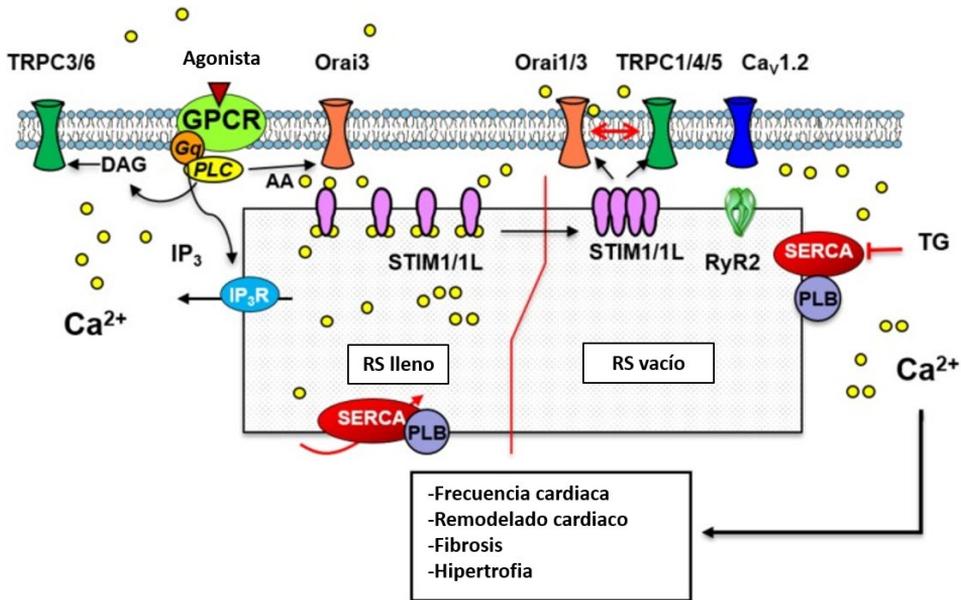


Figura 9. Mecanismo de SOCE en cardiomiocitos. Entrada capacitativa de Ca^{2+} dependiente de proteínas Orai, STIM y TRPC. Cuando los reservorios del RS se vacían, STIM sensor de Ca^{2+} , interacciona con Orai-TRPC los cuales oligomerizan y permiten la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. Fuente: (Avila-Medina *et al.*, 2018).

1.2. MUERTE CELULAR DESPUÉS DE I/R: APOPTOSIS Y NECROSIS

Durante el proceso de I/R, se producen daños celulares que culminan con el proceso de muerte celular. Existen tres tipos de muerte celular; la apoptosis, que es una forma de muerte celular programada con desintegración del ADN que depende del balance entre la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos (Saraste and Pulkki, 2000). Ésta se caracteriza por un encogimiento de la célula y su fragmentación en cuerpos apoptóticos que van a dar lugar a una rápida fagocitosis por macrófagos o células del parénquima, y por tanto no va asociada a una fuerte respuesta inflamatoria (Hofstra *et al.*, 2000; Orogo and Gustafsson, 2013). El segundo tipo de muerte celular; la necrosis, que se caracteriza por una fragmentación descontrolada del DNA, desorganización de los orgánulos celulares, rotura de la membrana plasmática y liberación al exterior del contenido intracelular, lo cual lleva asociado la activación de respuestas inflamatorias y señal de daño (Oerlemans *et al.*, 2013; Zhou and Yuan, 2014). Por último, la

autofagia, que ocurre de manera regulada y se caracteriza por secuestrar orgánulos o componentes celulares aberrantes en vesículas de doble membrana para liberarlos dentro de los lisosomas o vacuolas para su descomposición (Przyklenk *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2014). Sin embargo, ésta última a día de hoy no ha sido tan estudiada como las anteriores en el fenómeno de I/R (Figura 10).

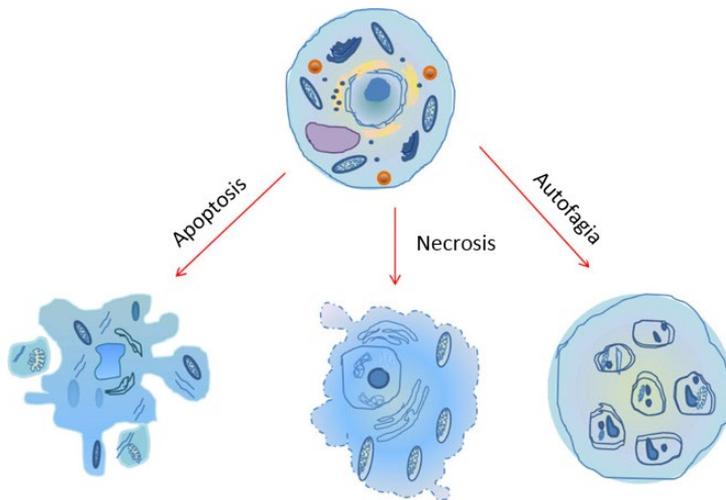


Figura 10. La morfología de las células en apoptosis, necrosis, autofagia. A la izquierda, célula apoptótica que muestra una contracción celular característica y cuerpos apoptóticos densamente empaquetados con orgánulos celulares. En medio, célula necrótica que muestra mitocondrias y orgánulos celulares dilatados debido al aumento de la permeabilidad de la membrana celular. A la derecha, célula autofágica que muestra vacuolas autofagosómicas unidas a doble membrana que secuestran el contenido citoplásmico, incluidas las mitocondrias y los ribosomas. Fuente: (Chilakamarthi and Giribabu, 2017).

Clásicamente se ha descrito que durante los primeros minutos de isquemia se produce muerte por necrosis, y es la perfusión cuando cobra importancia la muerte celular controlada por apoptosis (Gottlieb *et al.*, 1994; Gottlieb, 2011). Sin embargo, cada vez son más las evidencias de que los tipos de muerte celular están inevitablemente ligados entre sí (Baines, 2011). La mayoría de los cardiomiocitos en la región infartada mueren en las primeras 24 horas (h) tras la oclusión coronaria. Sin embargo, la activación de vías pro-inflamatorias en la región infartada, y el estrés biomecánico induce una segunda ola de muerte de

los cardiomiocitos mucho menos intensa que puede extender hasta los 3 días (Gersch *et al.*, 2002; Baines, 2011).

Dentro de toda esta situación el papel de la apoptosis es controvertido y complejo. Algunos autores presentan la apoptosis como un proceso fisiopatológico dañino que si se frenara haría que mejorase la supervivencia celular (Oerlemans *et al.*, 2013; Koshinuma *et al.*, 2014). No obstante, otros autores la proponen como un mecanismo de defensa frente a una muerte por necrosis exagerada donde se activan muchos más mecanismos inflamatorios que atraen células inflamatorias conduciendo el miocardio a altas cantidades de ROS, citosinas, activación de receptores tipo *toll*, secreción de enzimas tóxicas y activación de la cascada del complemento (Charununtakorn *et al.*, 2016). De esta manera, el proceso de apoptosis puede jugar un papel importante a largo plazo en el remodelado ventricular adverso y en la progresión hacia insuficiencia cardiaca (Anversa *et al.*, 1998).

1.3. REMODELADO CARDIACO ADVERSO

Se define como remodelado ventricular adverso post-infarto al cambio en la organización y arquitectura del corazón debido a un conjunto de alteraciones moleculares y estructurales que comprometen tanto la zona infartada como la zona remota alejada del infarto, causando al final una disfunción ventricular que tiene como consecuencia clínica la aparición de IC.

a) Fibrosis e hipertrofia

Existe un remodelado cardiaco temprano, que se observa en las primeras horas y días post-infarto caracterizado por muerte celular del tejido miocárdico acompañado de la movilización de células inflamatorias, la dilatación del miocardio de la zona infartada y la activación de los fibroblastos en la zona de daño para comenzar la reparación y cicatrización de la herida (Pfeffer and Braunwald, 1990; Cleutjens *et al.*, 1995). Sobre ese tejido miocárdico dañado se infiltran los fibroblastos cardiacos con el objetivo de reemplazar las células muertas y formando una matriz extracelular para cicatrizar el tejido dañado (Frangogiannis, 2017). Este fenómeno de fibrosis tiene como consecuencia un aumento de la tensión del tejido y una disminución de la contractilidad, que en

muchos casos desembocan en la aparición de insuficiencia cardiaca (Mewton *et al.*, 2011). La cicatriz que se forma en el tejido puede medirse y constituye el tamaño del infarto, siendo el indicador principal del remodelado y eventualmente de la evolución de la enfermedad (Eitel *et al.*, 2010).

Como mecanismo de compensación y con el objetivo de mantener el gasto cardiaco, el resto del corazón no dañado (zona remota) se remodela. Durante semanas y meses post-infarto, aumentan los depósitos de colágeno y aparece fibrosis en las zonas remotas. La zona más alejada sufre una pérdida de la función contráctil y la mayoría de procesos moleculares anteriormente descritos; apoptosis y fibrosis (Wenk *et al.*, 2012; Prescimone *et al.*, 2013). Cada vez existen más estudios que se centran en la parte remota además de al isquémica pero aún queda mucho por conocer.

Desde el punto de vista estructural aparece la hipertrofia excéntrica, una disminución del grosor de la pared miocárdica, una dilatación compensatoria aumentando el tamaño del ventrículo izquierdo y en consecuencia un aumento de los volúmenes ventriculares al final de la sístole y diástole aumentando la precarga (Figura 11) (McKay *et al.*, 1986; Bhatt, Ambrosy and Velazquez, 2017).

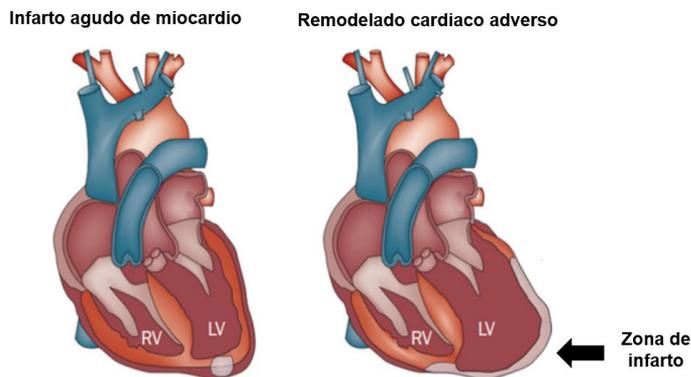


Figura 11. Remodelado cardiaco adverso tras un IAM y su reperfundición. Existen cambios estructurales y moleculares que desencadenan una hipertrofia excéntrica, una disminución del grosor de la pared miocárdica, una dilatación del ventrículo izquierdo y en último término una IC. Fuente: (Curley *et al.*, 2018).

b) Factores de transcripción en células cardiacas

Uno de los factores de transcripción que más se ha estudiado en el corazón es NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) (Heineke *et al.*, 2005; Echtermeyer *et al.*, 2011). Clásicamente el factor de transcripción NFAT fue descrito en las células del sistema inmunitario y hoy en día es ampliamente descrito en enfermedades del corazón como la IC, hipertrofia y arritmias (Molkentin, 2004; Gerçek *et al.*, 2017; Nie *et al.*, 2019). La activación de la calcineurina por un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ conduce a la desfosforilación de NFAT, altamente fosforilado en el citoplasma de las células en reposo, lo que origina la exposición de las secuencias de localización nuclear y la consiguiente translocación del factor al núcleo donde se une a elementos específicos en el ADN. NFAT necesita una estancia sostenida para transactivar los genes que regula. Dicha estancia en el núcleo vendría determinada por la duración de la elevación de los niveles de Ca^{2+} . Esto plantea la cuestión de cómo se activa NFAT de una manera dependiente de Ca^{2+} , ya sea normalmente o durante situaciones patológicas donde están involucrados los canales de Ca^{2+} (Crabtree and Olson, 2002). De hecho, determinados componentes de los SOCC, como la familia de TRPC (Eder, 2017), Orai1 (Zhang *et al.*, 2019) o STIM1 (Correll *et al.*, 2015), que se expresan en diferentes patologías cardiovasculares, estarían involucrados en la entrada de Ca^{2+} y por tanto en la activación de NFAT que participará en la regulación génica.

Pocos factores de transcripción más se han descrito en corazón. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral es evaluar el papel del factor de transcripción CREB (*cAMP Response Element-Binding*) en las células cardiacas en el modelo experimental de I/R. El factor de transcripción CREB ha sido descrito ampliamente en el campo de neurociencia. La fosforilación de CREB juega un papel importante en la adquisición y mantenimiento de la memoria así como en la fisiopatología de enfermedades (Wang *et al.*, 2018; Bartolotti and Lazarov, 2019; Du, Zhu and Si, 2020). La activación de CREB ocurre con la fosforilación de la serina 133 en respuesta a Adenosín Monofosfato-3',5' cíclico (AMPC) y el reclutamiento de cofactores de transcripción como CBP (*CREB binding protein*) (Figura 12) siendo esto suficiente para la expresión del gen objetivo.

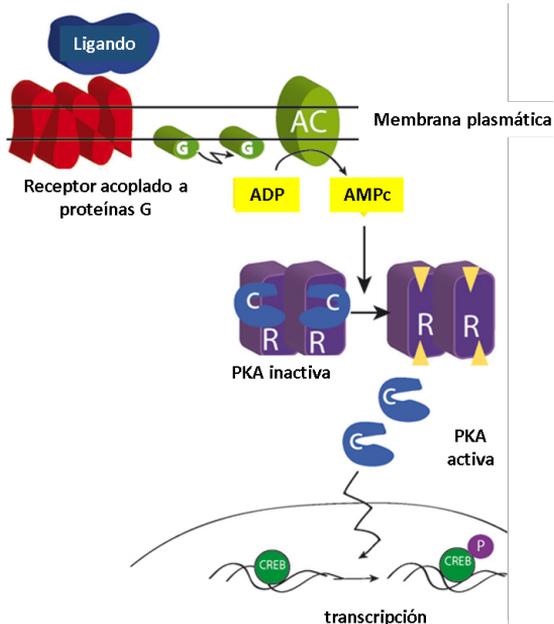


Figura 12. Activación del factor de transcripción CREB. La cascada de activación comienza con receptores acoplados a proteínas G que activan a las adenilato ciclasas (AC) que pasan el ADP a AMPc y éste activa la Proteína Kinasa A (PKA) que fosforila a CREB. p-CREB entra al núcleo para comenzar la transcripción de genes. Fuente: (Linglart *et al.*, 2011)

Su papel en células cardiacas está apenas descrito, aunque cada vez son más comunes los estudios de CREB en células involucradas en la patología cardiaca como células de músculo liso o inflamatorias (Pulver *et al.*, 2004; Shanmughapriya *et al.*, 2015). De hecho, la respuesta desencadenante de la activación del factor CREB en estos estudios es la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo SOCC y proteínas SOCE. Datos previos del laboratorio en músculo liso, muestran que CREB requiere una vía de señalización compleja que involucra, por un lado, SOCE mediada por STIM1, Orai1 y TRPC1 (Rodríguez-Moyano *et al.*, 2013). Igualmente, Parker *et al.* proponen que la activación de SOCE incrementa el AMPc y active a la PKA de las arterias coronarias activando la fosforilación de CREB (Parker *et al.*, 2019). Simo-Cheyrou *et al.* también muestran evidencias de que CREB se activaba debido a SOCE en el mismo tipo celular (Simo-Cheyrou *et al.*, 2017).

Los pocos estudios que sitúan a CREB como factor de transcripción cardiaco son relacionados con genes hipertróficos (Shanmugam *et al.*, 2011; Chien *et al.*, 2015) u oncogenes como *cFos* (Chen *et al.*, 2020).

2. PAPEL DE LOS microRNAS EN EL INFARTO CARDIACO

Si el ADN es la base de datos donde se encuentra toda la información del genoma, el ARN mensajero es el transcrito codificante encargado de llevar esa información hasta los ribosomas y las proteínas son los productos finales resultantes del código genético; los microRNAs (miRNAs) son pequeños ARNs endógenos no codificantes (22 nucleótidos) que controlan la expresión génica después de la transcripción (Aghaee-Bakhtiari, 2019). Concretamente, su función es regular la expresión génica a nivel post transcripcional mediante la unión con la región no codificante en el extremo 3' (3' UTR) del ARN mensajero de sus genes diana, lo que induce su degradación o inhibe la traducción a proteína (Parker and Song, 2004). El proceso de regulación génica mediada por estos miRNAs es altamente complejo, pues un miRNA puede tener como diana varios genes y a su vez los genes pueden ser diana de más de un miRNA. Es más, un miRNA puede modular la transcripción de otros miRNAs (Lim *et al.*, 2005). Los miRNAs suelen agruparse formando grupos o *clusters* para trabajar sobre una única diana o bien regulando una ruta de señalización completa. Al tratarse normalmente de un proceso orquestado por varios participantes, los efectos sobre los genes dianas no son severos, sino que más bien atenúan su expresión (Desvignes *et al.*, 2015).

Los miRNAs se caracterizan por regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del ARN mensajero (ARNm) diana y la represión traduccional. Si la complementariedad entre el miRNA y el ARNm es total o elevada se producirá la degradación completa de ese ARNm. Sin embargo, si la complementariedad es menor se producirá una inhibición de la traducción (Figura 13) (Bartel, 2004). El hecho de que exista solapamiento completo o no depende de la energía de libre unión que existe entre los primeros 8 nucleótidos del extremo 5' del miRNA y el ARNm.

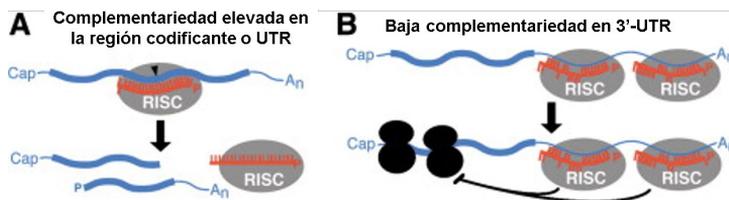


Figura 13. Inhibición de la expresión génica. A) Escisión de ARNm específico por un miRNA. La punta de flecha negra indica el sitio de escisión. **B)** Represión de la traducción mediada por miRNAs.

En el primero de los casos, el complejo RISC identifica la complementariedad perfecta (o casi perfecta) entre el miRNA y el ARNm, y luego la endonucleasa del RISC escinde el ARNm en un sitio en posición central dentro de esa complementariedad, midiendo desde el extremo 5' del miRNA. El segundo caso el miRNA se une al ARNm impidiendo el acceso del ribosoma.

2.1. MiRNAS EN EL INFARTO

Existen cada vez más evidencias sobre el papel que juegan los miRNAs en los procesos celulares asociados con isquemia y posterior revascularización en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea; así como a nivel experimental en modelos *in vivo* e *in vitro* (Eltzschig and Eckle, 2011; Su *et al.*, 2018). Los miRNAs se caracterizan en el IAM o I/R por adquirir un papel patológico o protector, involucrados en la regulación de los genes, inflamación, respuestas al estrés, angiogénesis o apoptosis (Fasanaro *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2017; Shao *et al.*, 2018)

Una de las características de los miRNAs que los hacen tan interesantes es la posibilidad de modificar de forma muy específica su expresión, lo que los hace una prometedora herramienta terapéutica. Diferentes investigaciones en ciencia básica han mostrado que la sobreexpresión o la inhibición de miRNAs pueden alterar las respuestas patológicas en las enfermedades cardiovasculares. Los *antagomir* son oligonucleótidos antisentido que se unen a un miRNA concreto consiguiendo una inactivación muy específica y eficiente. De la misma manera, existen oligonucleótidos análogos a los miRNAs denominados *mimics* que realizan la misma acción que los miRNAs endógenos.

Un gran número de familias de miRNA se han relacionado con los efectos anti-apoptóticos y la supervivencia celular durante la I/R cardíaca, como miR-1, miR-21, miR-24, miR-125, miR-133 o miR-98 entre otros (Figura 14) (Cheng *et al.*, 2010; Matkovich *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2019). Por ejemplo, modelos experimentales de IAM y I/R, indicaron que miR-21 tiene acción antiapoptótica regulando la muerte celular programada (Cheng *et al.*, 2010), la vía la señalización PTEN/Akt (Tu *et al.*, 2013) o la vía Akt y Bcl2/Bax (Ma *et al.*, 2016). Otros casos son los de los agonistas del miR-1 y miR-133a que también atenúan la apoptosis, aunque esta vez mediante la inhibición

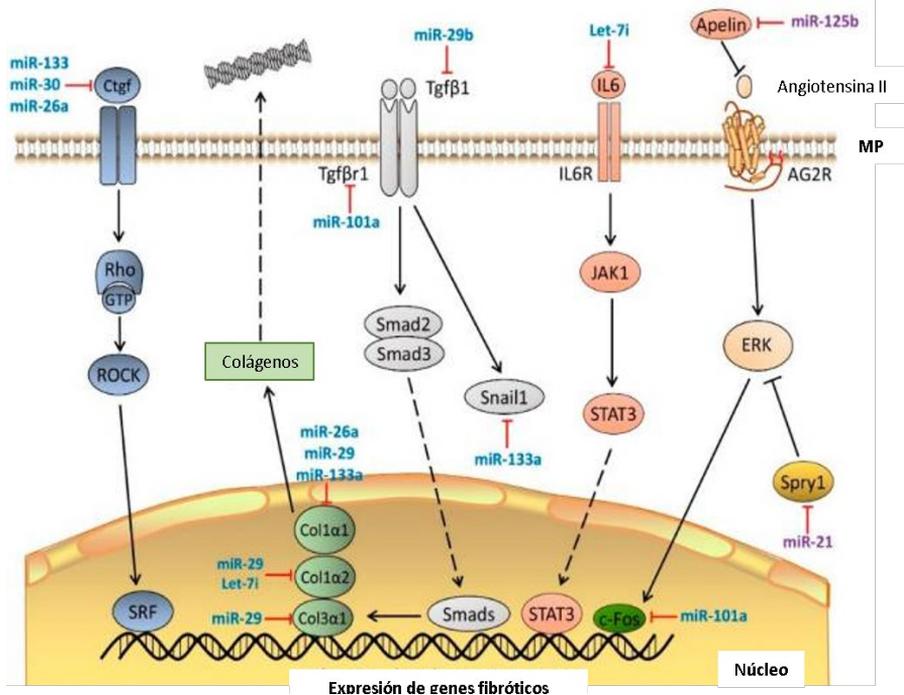


Figura 15. MiRNAs implicados en fibrosis. Fuente: (J. Wang *et al.*, 2016)

2.2. MiRNAs COMO PERSPECTIVAS FUTURAS

A pesar de que existen ejemplos prometedores utilizando el sistema terapéutico basado en miRNAs en animales de experimentación para la mejora de la función ventricular, hipertrofia y remodelado cardiaco en IC, la reducción de muerte celular y fibrosis tras un infarto, la mejora de la arteriosclerosis-reestenosis o incluso para la dislipemia (Nabeebaccus, Zheng and Shah, 2016; Lucas, Bonauer and Dimmeler, 2018); son pocos o casi inexistentes los ensayos clínicos en la fisiopatología cardiaca en humanos.

Los *antagomir* en general se pueden administrar por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea y con una inhibición eficaz a largo plazo durante varias semanas. La mayoría de los estudios utilizaron dosis únicas o repetitivas de 0.5 a 25 mg / kg de peso corporal en rata y/o ratón. Sin embargo, para el tejido cardiaco se necesitaban concentraciones más altas para los *antagomirs* (8–80 mg / kg de peso corporal) para suprimir eficazmente los miRNAs (Lucas, Bonauer and

Dimmeler, 2018). Curiosamente, la dosis eficiente y el esquema de dosificación dependen no solo de la química sino también de la secuencia objetivo.

Tomando lo anterior en consideración, se puede afirmar que gracias a su capacidad para actuar sobre diferentes dianas génicas y participar en la regulación de su expresión, los miRNAs son unas moléculas potencialmente útiles para el tratamiento de patologías cardíacas. Abriendo un amplio abanico desde su papel como biomarcadores pronósticos o diagnósticos así como moléculas terapéuticas ya que son moléculas muy estables *in vivo* (Aghaee-Bakhtiari, 2019; Condrat *et al.*, 2020).

3. UROCORTINA COMO TRATAMIENTO CARDIOPROTECTOR

3.1. PÉPTIDOS Y RECEPTORES

La Urocortina (Ucn) es un neuropéptido de mamífero de unos 40 aminoácidos que está directamente relacionado con el factor liberador de corticotropina (CRF), descubierto en 1981 (Bittencourt, 2013). La familia incluye tres isoformas diferentes de Ucn; Ucn-1, Ucn-2 y Ucn-3.

La principal diferencia entre las tres isoformas es su localización dentro del organismo, así la Ucn-1 está presente en el cerebro, placenta, tracto gastrointestinal, tejido sinovial, linfocitos, tejido adiposo, células endoteliales y corazón (Iino *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2002). La Ucn-2 es expresada mayoritariamente en corazón y áreas concretas del sistema nervioso central (Hillhouse and Grammatopoulos, 2006). Por último, la Ucn-3 fundamentalmente se encuentra en la glándula pituitaria e hipotálamo, con menores niveles en aurículas y ventrículos del corazón (Lewis *et al.*, 2001). Su vida media es relativamente corta, de unos 10 min cuando se trata de las isoformas 2 y 3 (Davis *et al.*, 2007), mientras que la 1 puede durar hasta 50 min (Davis *et al.*, 2005).

La Ucn realiza su función fisiológica mediante la activación paracrina o autocrina de receptores de CRF (CRF-R) expresados en la membrana celular de las células diana. Igual que las diferentes isoformas de la Ucn presentan una localización determinada dentro del organismo lo mismo ocurre con sus receptores. Existen dos tipos de receptores: CRF-R1 y CRF-R2, ambos acoplados

a proteínas G (GPCRs) con 7 dominios transmembrana. El primero de ellos está altamente expresado en el cerebro y el segundo se localiza más en tejidos periféricos; músculo cardíaco, liso y esquelético, siendo baja su presencia en cerebro (Van Pett *et al.*, 2000). Además, la afinidad con la Ucn se une a uno u otro receptor varía, pues presenta 40 veces más afinidad por el CRF-R2 (Lovenberg *et al.*, 1995).

	Localización principal	Ligando
CRF-R1	Cerebro	CRH/Ucn-1
CRF-R2	Cerebro	Ucn-1
	Corazón	Ucn-1, Ucn-2
	Músculo esquelético	Ucn-3

Tabla 1. Localización de los CRFs y sus ligandos. Fuente: (Takefuji and Murohara, 2019).

3.2. EFECTOS CARDIOVASCULARES

En el tejido miocárdico, la Ucn tiene efectos inotrópicos y lusitropicos positivos mediados a través del CRF-R2. Es decir, participa en el aumento de la contractilidad y acortando el periodo de relajación.

A inicios de siglo, se disponía de pocos datos sobre los mecanismos de señalización celular subyacentes a las acciones inotrópicas y lusitropicas de la Ucn-2 en el corazón. Es decir, de su aumento de contractilidad y acortamiento de periodo de relajación (Makarewich *et al.*, 2015). Finalmente se descubrió que estos efectos se deben a que los CRF-R2s acoplados a proteínas G activan la ruta de señalización AMPc-PKA (*Protein Kinase A*). Y a su vez, la estimulación de la actividad de la PKA provoca la fosforilación de varias proteínas clave implicadas en el acoplamiento de EC cardíaco incluyendo a los canales de Ca²⁺ tipo L, el RyR o el fosfolamban (Yang *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que muchas otras vías de señalización están involucradas en los efectos de Ucn en el corazón relacionadas con PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKB (*Protein Kinase B*), PKC (*Protein Kinase C*), la familia de las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) o EPAC (*Exchange Protein Activated by cAMP*) (Figura 16) (Calderón-Sánchez *et al.*, 2009; Smani *et al.*, 2010).

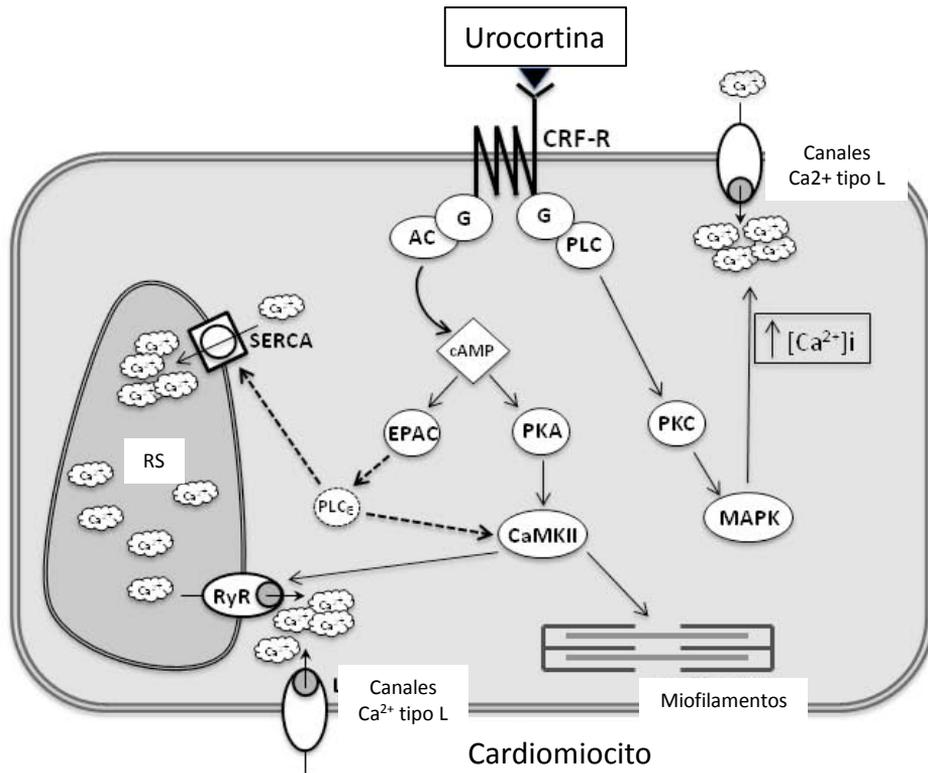


Figura 16. Efecto de la Ucn en cardiomiocitos. La unión de la Ucn a los receptores de CRF en los miocitos cardiacos promueve efectos inotrópicos y lusitrópicos positivos que implican: aumento de AMPc, estimulación de PKA y EPAC, activación de cascadas de quinasas como PKC y MAPK, y al final aumento de la concentración de Ca^{2+}_i . Fuente:(Diaz and Smani, 2013).

Con todo ello, se puede concluir que los péptidos de Ucn actúan a través de múltiples vías de señalización para promover la contractilidad y la relajación de los cardiomiocitos (Rademaker and Richards, 2017).

3.3. EL PAPEL DE LA UCN EN LA MUERTE CELULAR Y REMODELADO CARDIACO

Se han llevado a cabo numerosos estudios de la Ucn en diferentes patologías que afectan al sistema cardiovascular, desde la IC, la enfermedad isquémica, hipertensión arterial, diabetes e incluso hipertensión pulmonar (Monteiro-Pinto *et al.*, 2019).

La patología de estudio en esta tesis doctoral es la isquemia miocárdica, y como se ha comentado anteriormente a nivel molecular la isquemia provoca diferentes tipos de muerte celular, desde necrosis en el núcleo infartado a apoptosis en zonas limítrofes al área de muerte (Díaz *et al.*, 2017). Y es en este contexto, donde los péptidos de Ucn podrían colaborar con la mejora de la patología mostrando su papel cardioprotector según describen otros autores. Tanto Calderón-Sánchez *et al.* como Williams *et al.* describieron como los péptidos de Ucn promueven la supervivencia celular induciendo apoptosis como un modelo de muerte programada y controlada que evita la pérdida de cardiomiocitos y procesos inflamatorios durante el proceso de I/R (Calderón-Sánchez *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2017).

Además, se ha visto que la Ucn es capaz de actuar sobre la regulación de genes apoptóticos como *Xiap*, *p-Bad*, *Cd40-L* (Barry *et al.*, 2010; Calderón-Sánchez *et al.*, 2016). Es más, se ha descrito cómo la Ucn modula la expresión de determinados miRNAs que participan en la expresión de genes de apoptosis. La Ucn-1 regulan positivamente la expresión de miR-125a-3p y miR-324-3p y negativamente la del miR-139-3p. De igual manera la Ucn-2 participa en la expresión del miR-324-3p y miR-139-3p. A su vez, la sobreexpresión de estos miRNAs promueve la desregulación de la expresión de genes implicados en la muerte celular y apoptosis como *Brca1*, *Bim*, *Stat2* (Díaz *et al.*, 2017). Además, la Ucn-2 regula miR-221, miR-150 y miR-206 que a su vez regulan genes anti-apoptóticos como algunas caspasas, o anti-autofágicos como *Lc3*. Concretamente, el miR-221 disminuye *Ddit4*, *Tp53inp1*, *P27*, *Bak1*, *Bim* y *Bmf* (Zhou, Chen, Lew, A Mark Richards, *et al.*, 2016).

Además del papel que tiene Ucn en la muerte celular, también participa en otros parámetros más clínicos como el tamaño de infarto, la fibrosis o hipertrofia cardiaca. La administración de la Ucn al inicio de la reperfusión reducía significativamente el tamaño del infarto en corazones de ratas de I/R (Brar *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). La fibrosis también se mejoraba en modelos de ratas diabéticas (Liu *et al.*, 2016). Un tratamiento crónico de Ucn llegó a disminuir los depósitos de colágeno, mejorar la morfología ventricular y en definitiva la función cardiaca (Ellmers *et al.*, 2015). En cuanto a la hipertrofia cardiaca, no existen tantos estudios pero la mayoría afirma que la Ucn podría inducirla (Gruson *et al.*, 2012).



OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar los cambios fisiopatológicos que ocurren durante el síndrome de I/R y en el remodelado cardiaco adverso, sin olvidar el papel cardioprotector de la urocortina-2.

Puntualizando dicho objetivo principal se encuentran los siguientes *ítems*:

1. Analizar la función cardiaca y cambios fisiopatológicos ocurridos en el modelo experimental de isquemia y reperfusión.
2. Caracterizar el papel de los canales SOCC en modelo de I/R, y su participación en la homeostasis del Ca^{2+} cardiaca.
3. Estudiar elementos de regulación post-transcripcional relacionados tanto con la regulación génica mediada por factores de transcripción como por miRNAs.
4. Determinar el efecto cardioprotector de la Ucn-2, centrándose en la regulación que pueda ejercer sobre la homeostasis del Ca^{2+} y a nivel post-transcripcional.



MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis doctoral se realizó de acuerdo con las recomendaciones del Real Decreto 53/2013 de acuerdo con la Directiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo y aprobado por el Comité de Ética local en Investigación humana del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Sevilla.

1. ESTUDIOS REALIZADOS CON MUESTRAS DE PACIENTES

El estudio se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki (Carlson, Boyd and Webb, 2004), los requisitos pertinentes de la legislación española y el dictamen favorable del Comité de Ética (no. 2013PI/096) de la Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío de Sevilla. Durante todo el proceso, se garantizó la confidencialidad de los datos de acuerdo a la legislación vigente. Todos los sujetos del estudio participaron voluntariamente y firmaron un formulario de consentimiento informado. En el caso de donaciones para trasplante, el consentimiento informado fue firmado por escrito por ambas familias.

Primero se evaluó la expresión de miRNAs en muestras de sangre sin anticoagulantes de pacientes que sufrieron un primer IAM recogido 3 h después de la intervención coronaria percutánea. Se obtuvo el suero mediante una centrifugación de 1500 g durante 15 min. Los criterios de inclusión fueron: pacientes menores de 75 años, diagnosticados de IAM, que presentaron síntomas de 2 a 6 h previas a la angioplastia y que presentaran oclusión de la arteria descendente anterior con grado de flujo epicárdico TIMI (Trombólisis en Infarto de Miocardio) de 0 en el angiograma inicial. Se excluyeron los pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica, una tasa de filtración glomerular menor de 30 ml / min, grado de flujo TIMI > 0-1 en el momento de la angiografía. Los pacientes recibieron terapia farmacológica estándar según las guías clínicas actuales.

En segundo lugar, se evaluó la expresión de los miRNAs y de genes en biopsias de músculo cardíaco de 7 pacientes (4 hombres y 3 mujeres) IC de origen isquémico. Los pacientes con IC tenían una mediana de edad de 58,6 años y su Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo (FEVI) era del $35,6 \pm 14,8$ %.

2. MODELO ANIMAL DE I/R

1.1. MODELO DE I/R EN RATA ADULTA

El objetivo principal de esta intervención fue la ligadura reversible de la arteria coronaria izquierda para simular lo que ocurre durante el IAM y posterior reperfusión. Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar macho de 250 ± 50 g anestesiadas con mezcla de ketamina (50 mg / kg)-xilacina (8 mg / kg) para la inducción del sueño y O_2 / sevoflurano al 2 % para el mantenimiento del mismo durante la operación. Todos los animales recibieron ventilación mecánica (*Harvard Apparatus*, EE.UU.) utilizando un volumen tidal de 1.5–2.0 ml a 75–80 ventilaciones / min y fueron monitorizados por el electrocardiograma (ECG). Además, durante toda la cirugía se controló la temperatura (T^a) con una manta eléctrica para que fuera constante a 37 °C. Posteriormente se realizó una toracotomía izquierda, mediante la disección de los músculos pectorales, abriendo el espacio intercostal entre la tercera y cuarta costilla, apertura de la pleura y posterior pericardiectomía hasta visualizar el corazón. La oclusión de la arteria coronaria izquierda se realizó utilizando hilo de sutura de seda de 6-0 *ProleneTM* (*Ethicon*, EE.UU.). Para realizar el IAM se dio un punto a la altura de la arteria coronaria descendente anterior colocando un tubo de diámetro muy pequeño entre el corazón y el punto de sutura para realizar después la reperfusión (Figura 17). Para comprobar que la ligadura se había realizado correctamente se observó cómo la zona del corazón cercana al infarto se volvía cianótica y cómo el segmento ST se elevó en el ECG.

Antes de la reperfusión (5 min), se administró suero salino (0,9 % NaCl) con o sin Ucn-2 de manera intravenosa por la cola. Tras 45 min de isquemia se inició la reperfusión cortando el punto de sutura y retirando el tubo. Se confirma que la reperfusión se realizó correctamente porque se observó una hiperemia epicárdica y un ECG normal. Para terminar, se cerró el tórax teniendo que drenar previamente el neumotórax producido durante la cirugía. Para ello se utilizó una jeringuilla para aspirar, provocando un vacío en la cavidad torácica.

El mantenimiento de la anestesia gaseosa se continuó hasta que el animal comenzó a tener reflejos. Para terminar, se administró analgésico para el dolor

post-operatorio con meloxicam (1 mg / kg) por vía subcutánea. La frecuencia de supervivencia en todos los grupos tras la cirugía fue de un 95 %.

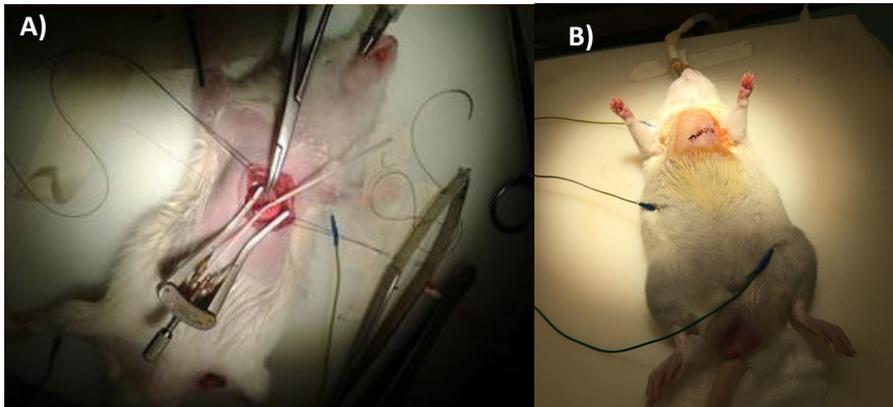


Figura 17. Operación de I/R de rata Wistar. **A)** Periodo de isquemia, se ha dado el punto alrededor de la arteria coronaria y está puesto el tubo para poder cortar después el punto y hacer la reperfusión. **B)** Momento del despertar sobre placa calefactora y monitorizada con el ECG post-cirugía. La rata está entubada en todo momento hasta que empieza a tener reflejos.

Una vez las ratas fueron operadas, dependiendo de los experimentos que se quisieron realizar, el tiempo de reperfusión fue de 24 h, a 6 semanas. Siendo la mayoría de veces el tiempo final una semana (Figura 18). Para su sacrificio, se utilizó una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg / Kg).

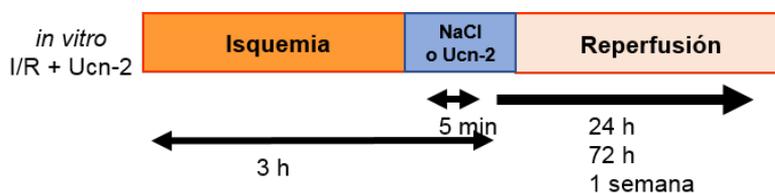


Figura 18. Esquema de trabajo para ratas operadas de I/R o I/R+Ucn-2.

Para administrar la Ucn-2 (150 μ g / Kg, *Sigma-Aldrich*- EE.UU.) se infundió 5 min antes de reperfundir el tejido miocárdico a través de la vena de la cola según se explica en la Figura 18. Para el modelo animal Sham se realizó la misma cirugía excepto la ligación de la arteria coronaria. Igualmente se administró la solución vehículo de suero salino (0,9 % NaCl) por la vena de la cola.

1.2. CULTIVO PRIMARIO DE RATAS NEONATALES

Se llevaron a cabo cultivos primarios de cardiomiocitos ventriculares de ratas Wistar recién nacidas (NRVM, *Neonatal Rat Ventricular Myocytes*) entre los días 1 y 3 (p1-p3). Tras el sacrificio, las aurículas se descartaron y las células ventriculares fueron dispersadas mecánicamente con cortes en condiciones de esterilidad dentro de la campana de flujo. Seguidamente, se lavaron y se comenzó la disgregación enzimática con tripsina-DNA-asa (0,125 %) (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.). Tras 5 pases con tripsina durante 20 min, se incubaron las células en placas de cultivo (6 cm Ø) durante 1 h a 37 °C para separar fibroblastos de cardiomiocitos. Estos últimos al ser más pequeños y pesar menos se encuentran en suspensión durante la primera hora mientras que los fibroblastos terminan por depositarse en el fondo de la placa. Tras 1 h de incubación se sembraron los cardiomiocitos con medio de cultivo al 15 % de suero (Tabla 2) en placas de cultivo (3 cm Ø) con cubres estériles destinadas a la medición de Ca²⁺ intracelular con una densidad de millón y medio de células por placa, y en placas de cultivo más grandes (6 cm Ø) para la extracción de ARN-proteínas con una densidad de tres millones y medio de células por placa.

Porcentaje de suero	Composición
Medio al 15%	Medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium), medium 199 (4:1) suplementados con 10% de suero de caballo (HS, <i>Horse Serum</i>), 5% de suero fetal bovino (FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i>) (<i>Thermo Fisher</i> , EE.UU.), 100µg/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina (<i>Sigma-Aldrich</i> , EE.UU.)
Medio al 1%	Medio DMEN, medium 199 (4:1) suplementados con 0,75% de HBS y 0,25% de FBS, 100µg/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina

Tabla 2. Composición medios de cultivo.

Los NRVM se sometieron a una isquemia simulada en medio isquémico (Tabla 3), en la cámara hipóxica al 1 % O₂ y al 5 % de CO₂. La reperfusión consiste en

poner las células en medio al 1 % de suero (Tabla 2) y en un incubador al 21 % O₂ y 5 % CO₂. Cuando se administró el tratamiento con Ucn-2 (10 nM) o Ucn-2 + astresina (500 nM) (*Tocris*, GB), el inhibidor específico del receptor de la Ucn-2 (CRF-R2), se hizo desde el momento que las células se sometían a isquemia.

Solución	Composición (mM)	pH
Medio isquémico	142 NaCl	6,22
	3.6 KCl	
	1.2 MgCl ₂	
	1.8 CaCl ₂	
	5 NaHCO ₃	
	20 Hepes	
	20 Lactato-Na	
20 sucrosa		

Tabla 3. Composición medio isquémico.

En función de los experimentos que se quisieron realizar, el tiempo de reperfusión fue de 5 min, 30 min, 24 h o 72 h (Figura 19).

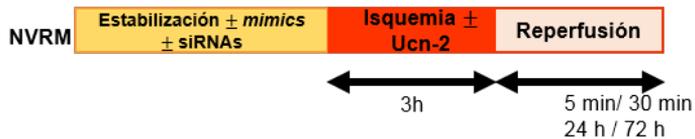


Figura 19. Esquema de trabajo para experimentos con NRVM.

En resumen, el flujo de trabajo fue el siguiente:

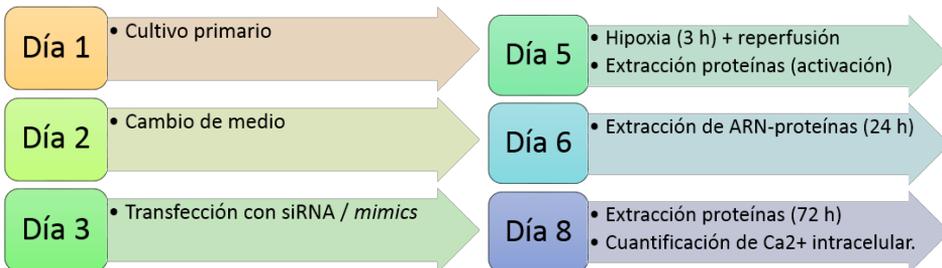


Figura 20. Esquema de trabajo con el cultivo primario de NRVM.

3. TÉCNICAS DE IMAGEN POR ULTRASONIDOS Y MEDICINA NUCLEAR

Para las técnicas de imagen las ratas fueron anestesiadas al 2 % de sevofluorano, monitorizadas por ECG y controladas térmicamente por un termómetro anal. Se realizaron ecocardiografías transtorácicas usando el sistema de ultrasonidos *VevoTM 2100 transducer MS250* a una frecuencia de 13-24 MHz (*VisualSonicsTM*, CA). La función cardiaca fue analizada previa a la cirugía y después de la cirugía según los tiempos establecidos. Las imágenes que se obtuvieron fueron en modo M a nivel de los músculos papilares y los diferentes parámetros funcionales y hemodinámicos se adquirieron y evaluaron de manera ciega.

Los estudios con resonancia magnética fueron llevados a cabo por el sistema de imagen *ICON 1T (Bruker, EE.UU.)* para evaluar la función cardiaca, las imágenes fueron adquiridas en la secuencia *spin-eco-cine T1* ponderada en eje corto desde la base hasta la altura de la válvula mitral hasta el ápex ventricular izquierdo. Además, para cuantificar el área isquémica las imágenes se adquirieron con la secuencia en gradiente eco aproximadamente 15 min tras la administración de gadolinio (*Sigma-Aldrich, EE.UU.*) para visualizar contraste, el cual resaltaba las áreas fibróticas.

Estos experimentos fueron llevados a cabo por la técnico responsable del servicio de imagen en el Instituto.

4. CORTES HISTOLÓGICOS Y TAMAÑO DE INFARTO

Tras la cardiectomia los corazones de rata fueron inmersos en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (1x) frío para limpiarlos de la sangre. Después se congelaron 1 h a -20°C y se cortaron en rodajas de 2 mm. Posteriormente, las rodajas se sumergieron en solución al 1 % de cloruro de tetrazolio (TTC) en PBS (1x) a 37 °C durante 30 min. Con esta técnica el miocardio sano muestra un intenso color rojo por la actividad redox de las deshidrogenasas mientras que el área necrótica permanece blanca. Las rodajas de corazón se fotografiaron y el área de infarto fue cuantificada usando *ImageJ (National Institutes of Health, EE.UU.)*. El tamaño del infarto fue medido como porcentaje del total del ventrículo izquierdo a nivel de los músculos papilares.

5. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN: SILENCIAMIENTO Y SOBREPRESIÓN DE GENES EN NRVM

Cuando los NRVM tenían una confluencia superior o igual al 70 %, se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento con siRNAs (*small interfering RNA*) con el fin de eliminar específicamente el ARNm que codifica para proteína, y ensayos de sobreexpresión con *mimics* para imitar a los miRNAs endógenos. Para ello se utilizó *Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent* (Thermo Fisher, EEUU). Se diluyeron 5 µl de lipofectamina en 150 µl de *Opti-MEN® Medium* (Gibco, EE.UU.). Después se añadieron 3 µl a 10 µM del siRNA a 150 µl de Opti-MEN®. Ambas preparaciones se mezclaron en proporción 1:1 y se incubaron 5 min a Tª ambiente. Finalmente se añadió la mezcla a las placas de cultivo de 3 cm Ø (para las de 6 cm Ø se utilizó el doble de los reactivos). El silenciamiento se dejó durante las siguientes 24 / 48 h. Como control positivo de la transfección se utilizó el producto comercial *BLOCK-iTTM Alexa Fluor® Red MEM® Medium* (Thermo Fisher, EE.UU.), que entra por los poros creados por la lipofectamina y prueba la eficiencia de la transfección.

Los siRNAs que se utilizaron fueron de los siguientes genes con las secuencias detalladas en la Tabla 4:

siRNA	Sentido	Antisentido	Referencia
siOrai1	5'-CCUGUUUGCGCUCAUGAUC-3'	5'-GAUCAUGAGCGCAAACAGG-3'	Dharmacon (EE.UU.)
siTRPC5	5'-GGUGACACAGAAUA-3'	5'-AAUCAUSUUCUGUGUCACC-3'	Ambion, Thermo Fisher (EE.UU.)
siCREB	5'-CCAUGGAGCUGAACGAAUU-3'	5'-AAUUCGUUCAGCUCCAUGC-3'	Ambion, Thermo Fisher (EE.UU.)
siAC8	5'-GCCUCUCAUUCUCCGAAA-3'	5'-UUUGCGGAGAAUGAGAGGC-3'	Ambion, Thermo Fisher (EE.UU.)
siControl	5'-CAAUAGCAAUCAUJACCAU-3'	5'-AUGGUAUUGAUUGCUAUUG	Ambion, Thermo Fisher (EE.UU.)

Tabla 4. Secuencias de siRNA en dirección 5' – 3' y referencia.

Los *mimics* que se utilizaron fueron los siguientes miRNAs detalladas en la Tabla 5:

<i>Mimics</i>	Secuencia madura miRNA	Referencia
Rno -miR 29a	5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'	<i>Thermo Fisher</i> (EE.UU.)
Rno -miR 451_1*	5'-AAACCGUUACCAUACUGAGUU-3'	<i>Thermo Fisher</i> (EE.UU.)
Control Negativo	Acuerdo de confidencialidad	<i>Thermo Fisher</i> (EE.UU.)

Tabla 5. Secuencias maduras de *mimics* y referencia.

6. EXTRACCIÓN DE ARN y RT-qPCR

6.1. EXTRACCIÓN DE miRNA Y ARN TOTAL

Para realizar la extracción de miRNA/ARN total (ARNt) a partir de NRVM fue necesario colocar las placas en hielo, retirar el medio de cultivo, lavar con PBS (1x) frío para añadir 1 ml de *QIAzol lysis reagent* (*Qiagen*, DEU), producto similar al *TRIzol*[®], y comenzar a rascar la placa. En el caso de las muestras de tejido de humano y de corazón completo de rata se cortó el tejido congelado, pesando cerca de 20 mg. Posteriormente, se trituró el tejido en el de N₂-homogenizador a ciclos de 1 min a 30 Hz 3 veces, la tercera vez se añade el *QIAzol* a cada *ependorf*. Posteriormente, se centrifugó o a 13000 rpm durante 1 min a 4 °C.

A continuación, se siguieron las instrucciones de extracción del kit *miRNAeasy* (*Qiagen*, DEU). El segundo paso tras la adición del *QIAzol*, para conseguir la separación de fases que permita aislar el RNA, fue añadir 200 µL de cloroformo (*Panreac Applichem*, EE.UU.). La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex 15 s y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C para obtener una fase inferior, una interfase de fenol-cloroformo y una fase superior acuosa que contenía el ARN y que fue recogida con precaución de no alterar las otras fases. Dependiendo del volumen obtenido de la fase acuosa se añadieron 1,5 volúmenes de etanol. La siguiente etapa comprendió la precipitación del miRNA / ARNt. Para ello, la fase acuosa-etanol se hizo pasar por las columnas del kit comercial y posteriormente se intercalaron se centrifugaciones de 1 min a 8000 rpm con los *buffer* comerciales a T^a ambiente. El volumen de elución dela muestra fue de 30 µl de agua libre de ARN-asas.

Se vio que para la cuantificación del miRNA y el ARNt era mucho más correcto utilizar dos métodos de cuantificación diferentes. Para cuantificar ARNt, se utilizó el *Nanodrop* (*Thermo Fisher*, EE.UU.) midiendo la absorbancia a 260 nm. Por lo contrario, se vio que para cuantificar con exactitud la cantidad de miRNAs en la muestra era mucho más eficaz el fluorómetro *Qubit 5.0* (*Thermo Fisher*, EE.UU.). El ensayo es altamente selectivo de miRNA obviando ARNr (ARN ribosómico) o ARNm (>1000 bp) teniendo la particularidad de que se necesita *Qubit microRNA Assay Kit* (*Thermo Fisher*, EE.UU.) para realizar la medición. El fluoróforo del kit se une a las moléculas de miRNA y el aparato es capaz de detectar dicha fluorescencia. Por cada muestra se prepara 1 μ l de fluoróforo y 199 μ l de buffer comercial. Posteriormente, se mantiene la misma proporción y se mezclan 1 μ l de ARNt y 199 μ l de fluoróforo-*buffer*. Al final somos capaces de obtener la cantidad de miRNAs presentes en la muestra en ng / ml.

6.2 RETROTRANSCRIPCIÓN

La transcripción inversa, transcripción reversa o retrotranscripción (RT) es una reacción que implica la generación de una cadena de ADN de doble cadena complementaria al ARN o miRNA de cadena simple. En este caso se llevaron a cabo tres tipos de RT diferentes, en función de si se trabajaba con miRNAs, ARNt o ARNt para *PrimePCR*, placas diseñadas comercialmente. Todas ellas a 500 ng.

Para la RT de miRNAs se utilizó *miScript II RT Kit* (*Qiagen*, DEU) con el *buffer HiSpec*, cuya formulación impide la retrotranscripción de moléculas de ARN de gran longitud y favoreciendo la síntesis de miRNAs maduros de < 25 bp (Figura 20, Tabla 6). El programa del termociclador utilizado fue de 1 h a 37 °C seguido de una incubación de 1 min a 95 °C.

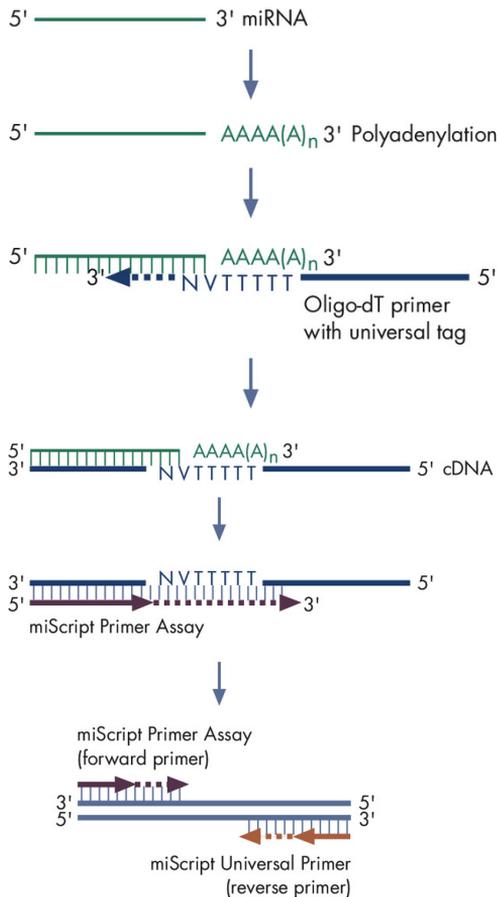


Figura 21. Esquema retrotranscripción. Con *miScript HiSpect Buffer*, los miRNAs maduros son poliadenilados por la polimerasa A y convertidos en ADN complementario (ADNc) por la retrotranscriptasa inversa con el *oligo T priming*.

Sin embargo, para la RT de ARNt se utilizó *iScript cDNA Synthesis Kit* (Biorad EE.UU.) y en el caso de las placas *PrimePCR* comerciales prediseñadas *iScript Adv cDNA Kit for RT-qPCR* (Biorad, EE.UU.) (Tabla 6). En el primero de los casos el programa de la RT fue *priming* 5 min a 25 °C, transcripción reversa 20 min a 46 °C, inactivación de la RT 1 min a 95 °C. En el segundo caso, la transcripción reversa duró 20 min a 46 °C y 1 min a 95 °C.

Kit de RTs	Composición	Volumen/reacción
<i>miScript II RT Kit</i>	5x <i>miScript HiSpec Buffer</i>	4 µl
	10x <i>miScript Nucleics Mix</i>	2 µl
	<i>miScript Reverse Transcriptase Mix</i>	1 µl
	ADNc	Variable
	Agua libre de ARN-asas	Variable

<i>iScript cDNA Synthesis Kit</i>	<i>5x reverse-transcription reaction mix</i>	4µl
	<i>iScript reverse transcriptase</i>	1µl
	ADNc	Variable
	Agua libre de ARN-asas	Variable
<i>iScript Adv cDNA Kit for RT-qPCR</i>	<i>iScript Advanced 5x Reaction Mix</i>	4µl
	<i>iScript Advanced Reverse Transcriptase</i>	1µl
	ADNc	Variable
	Agua libre de ARN-asas	Variable

Tabla 6. Resumen de kits de RT utilizados.

6.3. qPCR PARA MiRNAs DIANA Y GENES APOPTÓTICOS/FIBRÓTICOS

Para la cuantificación de la expresión génica en las muestras, se realizó una qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) a partir del ADN complementario (ADNc). De nuevo, existieron diferencias en la metodología empleada para mirar la expresión de miRNAs, genes o genes incorporados en una placa *PrimePCR* comercial prediseñada (*PrimePCR Tier 1 Apoptosis and Survival (Qiagen, DEU)*). En el primero de los casos, se preparó una dilución del ADNc de las muestras a 1:10 para cargar en la placa, de esta manera se reducen los inhibidores de la reacción. Se realizaron triplicados de cada muestra para cada condición cargados en placas de 384 pocillos *FrameStar 384 Well PCR Plate (4attitude, EE.UU.)*. Los reactivos a utilizar fueron: *Sybr-Green (Biorad, EE.UU.)*, *miScript Primer Assay (Tabla 7) (Qiagen, DEU)* y *10x miScript Universal Primer (Qiagen, DEU) (Tabla 15)*. Las placas fueron agitadas en vórtex para placa y centrifugadas durante 1 min a 3000 rpm. El programa de ciclos de la qPCR fue 95 °C 20 s, 40 ciclos a 95 °C durante 1 min y 60 °C durante 20 s en el termociclador *Viiia7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE.UU.)*.

<i>miScript Primer Assay</i>	<i>Mature Accesion</i>	<i>Referencia</i>
Rn-miR-21_2	MS00013216	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-29a_2	MS00033397	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-125a-3p_1	MS00012992	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-139-3p_1	MS00013048	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-324-3p	MS0006181	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-324-5p	MS00005747	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-339-5P_1	MS00033453	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-423_1	MS00013615	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-451_1*	MS00033726	<i>Qiagen</i> (DEU)
Rn-miR-499-5p_1	MS00001169	<i>Qiagen</i> (DEU)
Snord95	MS00033726	<i>Qiagen</i> (DEU)
Ctrl_miRTC1_1	MS00000001	<i>Qiagen</i> (DEU)

Tabla 7. *Primers* de miRNAs utilizados.

En segundo lugar, se diluyeron las muestras a 1:10 en H₂O, y se realizaron triplicados de cada muestra para cada condición utilizando placas de 384 pocillos *FrameStar 384 Well PCR Plate*. En este caso se utilizó *Sybr-Green* y los oligonucleótidos sentido y antisentido de cada gen en cuestión (Tabla 8). Las placas fueron agitadas en vórtex para placa y centrifugadas durante 1 min a 3000 rpm. El programa de ciclos de la qPCR fue 95 °C 20 s, 40 ciclos a 95 °C durante 1 min y 60 °C durante 20 s en el termociclador *Vii7 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, EE.UU.).

Oligonucleótidos	Secuencia	Referencia
<i>Creb Forward</i>	5'-CCAACTAGCAGTGGGCAGT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Creb Reverse</i>	5'-GAATGGTAGTACCCGGCTGA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Trpc5 Forward</i>	5'-AAGTTTCGAATTTGAGGAGCAGA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Trpc5 Reverse</i>	-AATCTCTGATGGCATCGCATCGCACA-	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Orai1 Forward</i>	5'-CCATAAGACGGACCGACAGT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Orai1 Reverse</i>	5'-GGGAAGGTGAGGAXTTAGGC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Col-I Forward</i>	5'-TTCACCTACAGCACGCTTGT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Col-I Reverse</i>	5'-TTGGGATGGAGGGAGTTTAC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Col-III Forward</i>	5'-GGTCACTTTCACTGGTTGACGA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Col-III Reverse</i>	5'-TTGAATATCAAACACGCAAGGC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)

<i>Tgf-β1 Forward</i>	5'-ATTCCTGGCGTTACCTTGG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Tgf-β1 Reverse</i>	5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Tgf-β2 Forward</i>	5'-GCAGAGTTCAGGGTCTTTTCG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Tgf-β2 Reverse</i>	5'-GCTGGGTTGGAGATGTTAGG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Bcl-2 Forward</i>	5'-TTCGGGATGGAGTAACTGG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Bcl-2 Reverse</i>	5'-AAGGCTCTAGGTGGTCATTCAG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Cycs Forward</i>	5'-CAAAGTGTGCCAGTGCCA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Cycs Reverse</i>	5'-CAGCAGCCTGGCCTGTCTTC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Apaf-1 Forward</i>	5'-TCCAGCGGCAAGGACACAGACG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Apaf-1 Reverse</i>	5'-CAAACCGCGTGCAAAGATTCTGCA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Mapk-8 Forward</i>	5'-TGCCATCATGAGCAGAAAGCAAAC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Mapk-8 Reverse</i>	5'TCTGATTCTGAAATGGCCGGCTG-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Hmox-1 Forward</i>	5'-AGGCTAAGACCGCCTTCCT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Hmox-1 Reverse</i>	5'-TGTGTTCTCTGTGTCAGCATCA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Aifm-1 Forward</i>	5'-GAGAAACAGAGAAGAGCCA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Aifm-1 Reverse</i>	5'-GTCACGTCCCTTTCCTGCT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Gapdh Forward</i>	5'-ATGGGAGCTGGTCATCAAC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Gapdh Reverse</i>	5'-TTGCTGACAATCTTGAGGGA-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>β-actina Forward</i>	5'-TTCTTCCTGGGTATGGAAT-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>β-actina Reverse</i>	5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3'	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)

Tabla 8. Primers de genes utilizados. *Creb; Trpc; Orai; Col; Tgf; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Cycs; Apaf, Apoptosis protease-activating factor; Mapk; Hmox, Heme oxygenase; Aifm, Apoptosis inducing factor; Gapdh, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; β-actina.*

Se realizaron también *PrimePCR* de placas comerciales prediseñadas con *primers* para genes relacionados con la apoptosis y la muerte celular en cada uno de sus pocillos (Tabla 9). Cada placa de 384 pocillos estaba formada por 4 placas de 96 genes. El protocolo indicaba que las muestras debían ser diluidas 1:15. Como en los casos anteriores, las placas fueron agitadas en vórtex para placa y centrifugadas durante 1 min a 3000 rpm. El programa de ciclos de la qPCR fue igual que para una PCR normal de genes.

<i>Abl-1</i>	<i>Cflar</i>	<i>Ifng</i>	<i>Pten</i>	gDNA
<i>Aifm-1</i>	<i>Clu</i>	<i>Igf-1</i>	<i>Pycard</i>	PCR
<i>Akt-1</i>	<i>CtnnB1</i>	<i>Igf-BP3</i>	<i>Raf-1</i>	RQ1
<i>Akt-2</i>	<i>Cyca</i>	<i>Igf-BP7</i>	<i>Rb-1</i>	RQ2
<i>Akt-3</i>	<i>Dlc-1</i>	<i>Il-17A</i>	<i>Rps6kB-1</i>	RT
<i>Apaf-1</i>	<i>ErbB-3</i>	<i>Il-18</i>	<i>S100-A9</i>	
<i>Apc</i>	<i>ErbB-4</i>	<i>Il-1B</i>	<i>Sfrp-1</i>	
<i>Atm</i>	<i>Fadd</i>	<i>Jak-2</i>	<i>Sod-1</i>	
<i>Bad</i>	<i>Fas</i>	<i>Lcn-2</i>	<i>Sod-2</i>	
<i>Bak-1</i>	<i>FasLG</i>	<i>Mapk-1</i>	<i>Src</i>	
<i>Bax</i>	<i>Fgf-2</i>	<i>Mapk-14</i>	<i>Stat-1</i>	
<i>Bcl-2</i>	<i>Fgf-R2</i>	<i>Mapk-3</i>	<i>Tbp</i>	
<i>Bcl-2L1</i>	<i>Foxo-1</i>	<i>Mapk-8</i>	<i>Tgf-β 1</i>	
<i>Birc-5</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>Tnf</i>	
<i>Casp-1</i>	<i>Hgf</i>	<i>Mdm-2</i>	<i>Tnfrsf-10A</i>	
<i>Casp-3</i>	<i>Hmgb-1</i>	<i>Myc</i>	<i>Tnfrsf-10B</i>	
<i>Casp-8</i>	<i>Hmox-1</i>	<i>Nfk-β1</i>	<i>VegfA</i>	
<i>Casp-9</i>	<i>Hprt-1</i>	<i>Nfk-β1A</i>	<i>Tnfrsf-1A</i>	
<i>Cav-1</i>	<i>Hras</i>	<i>Ngf</i>	<i>Tnfrsf-1B</i>	
<i>Cd4</i>	<i>Hsp90-AA1</i>	<i>Pik-3CA</i>	<i>Tnfsf-10</i>	
<i>Cd44</i>	<i>Hspa1A</i>	<i>Pik-3CG</i>	<i>Tp-53</i>	
<i>Cdkn1A</i>	<i>Hspa-5</i>	<i>Prkcd</i>	<i>Tp-63</i>	
<i>Cdkn2A</i>	<i>HspD1</i>	<i>Ngf-1</i>	<i>Xiap</i>	

Tabla 9. Diseño de placa comercial *PrimePCR Apoptosis and Survival Tier 1*. *Abl*, Proto-Oncogene; *Aifm*; *Akt*, Serine/Threonine Kinase; *Apaf*; *Apc*, regulator of WNT signaling pathway; *Atm*, Ataxia Telangiectasia Mutated; *Bad*, *Bcl-2* antagonist of cell death; *Bak*, *Bcl2*-antagonist/killer ; *Bax*, *Bcl-2*-like protein ; *Bd*, β -defensin; *Birc*, Baculoviral IAP repeat containing; *Casp*, Caspase; *Cav*, caveolin; *Cd*, Cluster of differentiation; *Cdkn*, Cyclin dependent kinase inhibitor; *ErbB*, Estrogen receptor β ; *Fadd*, Fas associated death domain; *Fgf*, Fibroblast grow factor; *Foxo*, Forkhead box O1; *Gapdh*; *Hgf*, Hepatocyte growth factor; *Hmg*, High-mobility group; *Hmox*; *Hprt*, Hypoxanthine phosphoribosyl transferase; *Hras*, HRas Proto-Oncogene, GTPase; *Hsp*, Heat shock protein; *Il*, Interleukin; *Jak*, Janus Kinase; *Lcn*, Lipocalins; *Mapk*, Mitogen-activated protein kinase; *Mcl*, Myeloid cell leukemia; *Mdm*, Mouse double minute; *Myc*, MYC Proto-Oncogene; *Nfk*, Nuclear factor kappa; *Ngf*, Nerve grow factor; *Pik*, Phosphoinositide kinase; *Prkcd*, Protein kinase C δ type; *S100-A9*, Calcium-binding protein A9; *Sfrp*, Soluble frizzled-related proteins; *Sod*, Superoxide dismutase; *Src*, SRC Proto-Oncogen; *Stat*, Signal Transducer Activator Of Transcription; *Tbp*, TATA Box binding protein; *Tgf*; *Tnf*, Tumor necrosis factor; *Vegf*, Vascular endothelial grow factor; *Tp*, Tumor protein; *Xiap*, X-linked inhibitor of apoptosis protein; gDNA, genome DNA; PCR; RQ, Relative Quatification; RT.

6.4. CUANTIFICACIÓN RELATIVA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA qPCR

Los datos fueron analizados mediante el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$ (Schmittgen and Livak, 2008). Este método consistió en comparar el ciclo umbral (Ct, *Cycle threshold*) normalizado a la expresión de un gen endógeno. En el caso de las qPCRs donde se estudiaron los miRNAs los controles endógenos fueron RTC1, Snord95 o la media entre ambos y para el análisis de genes la β -actina, el *Gapdh* o, de nuevo, la media entre ambos. Dicha resta entre el Ct de la muestra y del gen endógeno o sus medias daría el ΔCt :

$$\Delta Ct \text{ miRNA} = Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ RTC1} / Ct \text{ Snord95} / Ct \text{ media}$$

$$\Delta C \text{ tgen} = Ct \text{ gen} - Ct \beta\text{-actina} / Ct \text{ GAPDH} / Ct \text{ media}$$

Para estudiar cómo variaba un mismo gen en muestras diferentes, se calculó el valor del $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct \text{ muestra} = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

De manera que así se obtuvo la tasa de cambio ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de un miRNA/gen normalizado para poder compararlo. Para hacer las comparaciones estadísticas, se tomó como calibrador la media de los ΔCt Controles pudiendo obtener el error estándar de cada grupo. Todos los análisis se hicieron con el *software QuantStudio Real Time PCR* (Thermo Fisher, EE.UU.).

6.5. MICROARRAY DE SUERO DE PACIENTES

Se recolectaron muestras de sangre antes de la intervención percutánea y se estudió su suero. Para ello usamos el kit *miRNeasy Serum / Plasma* (Qiagen, DEU) para extraer los miRNAs según las instrucciones del fabricante. Los miRNAs eluidos se cuantificaron usando el aparato Qubit (Thermo Fisher, EE.UU.). Se usaron *TaqMan array miRNA card pool A* (Thermo Fisher, EE.UU.) para examinar la expresión de los miRNAs en 9 pacientes con STEMI y 3 pacientes de control. Una vez que seleccionados los miRNAs candidatos, se diseñaron *arrays* de miRNAs *TaqMan* personalizados (Thermo Fisher, EE.UU.). Para validar la expresión de los miRNAs por RT-qPCR se usaron *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit*, *TaqMan Advanced miRNA Assay* y *TaqMan Fast Advanced Master Mix technology* (Thermo Fisher, EE.UU.). La RT-qPCR se realizó en el termociclador

Vii7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE.UU.). Los análisis de cuantificación relativa se realizaron utilizando el *software SDS2.2 y Expression Suite Software V1.0.3 (Thermo Fisher EE.UU.)*, Los cambios de veces en la expresión de miRNAs se calcularon utilizando el método de CT de umbral anteriormente explicado.

7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Para la obtención de extractos de proteínas de los cultivos celulares, primero se colocaron las placas del cultivo celular en hielo y se lavaron las células con PBS a 4 °C. A continuación, se les añadió 300 µl del *buffer* de lisis (Inhibidor de proteasas 7x (*Roche, SUI*), *phosphostop* 10x (*Roche, SUI*), *PMSF (Sigma-Aldrich, EE.UU.)* y *NP40 (Thermo Fisher, EE.UU.)* por cada placa de 6 cm Ø y se rasparon en frío. Seguidamente, se dejaron reposar en frío a 4 °C durante 20 min y posteriormente se centrifugaron 20 min a 12000 rpm a 4 °C. El siguiente paso fue recuperar el sobrenadante donde estaban las proteínas y almacenarlas a -80°C o directamente cuantificarlas. El protocolo a partir de muestras de corazón de rata o humano fue algo diferente. A partir de tejido congelado a -80 °C, se cortaron porciones de ≈ 20 mg con bisturí en seco sobre una placa de cultivo de 9 cm Ø. Posteriormente, se utilizaron tubos de 2 ml con cierre seguro (*Eppendorf, DEU*) a los que se añadirá el trozo de corazón y una bola metálica de tamaño grande. A continuación, se hicieron 3 ciclos de; congelación de la muestra en N₂ líquido, homogenizador 1 min a 30 Hz, congelación en N₂ y centrifugación a 4 °C a 13000 rpm durante 1 min. Una vez se tuvo el tejido hecho polvo, se añadieron 400 µl de *buffer* de lisis y se pasaron por el homogenizador y la centrifuga una vez más. Por último, se recuperó el sobrenadante con las proteínas en suspensión.

Para la cuantificación se utilizó el método *Bradford (Biorad, EE.UU.)*, usando una recta patrón con cantidades crecientes de la proteína BSA en el espectrofotómetro. Posteriormente, se cargaron 30 µg de proteínas por cada pocillo con *Laemmli sample buffer*, desnaturalizando a 95 °C durante 5 min en la antes de cargar.

Antes de realizar la técnica de *Western Blot (WB)* fue necesario preparar los geles de acrilamida (*BioRad, EE.UU.*) al 10 %. El siguiente paso fue hacer la electroforesis en geles de poliacrilamida *SDS-PAGE* cargando mismas cantidades

de cada muestra en el sistema de cubetas (*Biorad*, EE.UU.) con *Running buffer*. Se fijó un voltaje constante de 120 mV y se dejaron correr las proteínas cerca de hora y media. Igualmente, en ese tiempo de espera se prepararon las membranas de PVDF (*GE Healthcare*, EE.UU.) las cuales fueron activadas con metanol (5 min en movimiento lento), lavadas en H₂O (5 min, en movimiento rápido) y dejadas reposar en *transfer buffer*. En función del peso molecular de las proteínas de estudio, se usaron dos tipos de transferencias; seca (30 min, a 0,34 A) (*Biorad*, EE.UU.) y húmeda (16 h, a 30 mV) (*Biorad*, EE.UU.). Posteriormente, se bloquearon las membranas con leche al 5 % en *TBS-Tween* durante 1 h o más en movimiento de agitación lento, y se dejaron incubando con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo BSA al 5 % en *TBS-Tween* a 4 °C *overnight* (Tabla 10). Al día siguiente se realizaron 4-5 lavados con *TBS-Tween* de 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h en solución de bloqueo de leche al 5 % en *TBS-Tween* (Tabla 11). Por último, se volvieron a hacer lavados de 10 min y se revelaron las membranas. La detección de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo mediante el reactivo *ECL prime* de alta sensibilidad (*Amersham Bioscience*, EE.UU.) y el sistema de adquisición *Chemidoc* (*Biorad*, EE.UU.). La cuantificación se realizó mediante un análisis densitométrico de las bandas para cada anticuerpo, normalizadas a su correspondiente señal de GAPDH o β -actina, mediante el *software Image Lab* (*Biorad*, EE.UU.). Todos los *buffer* se detallan en la Tabla 12.

Anticuerpo primario	Concentración de trabajo	Referencia
<i>Mouse anti-Orai1</i>	1:500	<i>Novus</i> (EE.UU.)
<i>Mouse anti-Orai1</i>	1:200	<i>Abcam</i> (GB)
<i>Rabbit anti-Orai1</i>	1:1000	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-TRPC5</i>	1:500	<i>Abcam</i> (GB)
<i>Mouse anti-pCREB</i>	1:1000	<i>Cell Signaling</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-CREB</i>	1:1000	<i>Cell Signaling</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-AC8</i>	1:1000	<i>Promega</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-CRF-R2</i>	1:1000	<i>Novus</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-GAPDH</i>	1:10000	<i>Gene Tex</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-TUBULINA</i>	1:10000	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
<i>Rabbit anti-β-ACTINA</i>	1:10000	<i>Cell Signaling</i> (EE.UU.)

Tabla 10. Anticuerpos primarios usados para la técnica de WB.

Anticuerpo secundario	Concentración de trabajo	Referencia
<i>HRP-Goat anti-Mouse IgG</i>	1:2000	<i>Jackson Immuno Research (GB)</i>
<i>HRP-Goat anti-Rabbit IgG</i>	1:10000	<i>Jackson Immuno Research (GB)</i>

Tabla 11. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de WB.

Solución	Composición	Cantidad
Tris-Glicina (10x)	Tris Base	0,25M
	Glicina	1,92M
TBS (10x) <i>(Tris-Buffered Saline)</i>	Tris Base	0,1M
	NaCl	1,5M
<i>Running Buffer</i>	Tris-Glicina (10x)	10%
	SDS (10x)	0,10%
<i>TBS-Tween (1x)</i>	TBS (10x)	10%
	<i>Tween 20</i>	0,10%
<i>Transfer Buffer</i>	Tris-Glicina (10x)	10%
	Metanol	20%

Tabla 12. Composiciones utilizadas durante los experimentos de WB.

8. ENSAYOS DE MICROSCOPIA

8.1. SISTEMA DE MICROFLUORIMETRÍA DE Ca^{2+}

Para registrar la $[Ca^{2+}]_i$ de en NRVM se emplearon técnicas microfluorométricas con el FURA-2 como sonda fluorescente. Éste fluoróforo actúa como quelante de Ca^{2+} uniéndose a varios grupos carboxilos (-COOH). Es altamente selectivo para el Ca^{2+} y casi insensible a pequeñas fluctuaciones de pH en el rango fisiológico. Su estructura deriva del potente quelante de Ca^{2+} , EGTA (*Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N, N, N, N-tetraacetic acid*). Concretamente, se ha usado la forma esterificada del FURA-2, FURA-2 AM, que es permeable a través de la membrana plasmática de las células. Al penetrar en las células, las propias esterases hidrolizan este fluoróforo quedando libre en el citosol pudiendo quelar el Ca^{2+} disponible.

Esta molécula tiene un comportamiento peculiar, ya que sea al ser excitada a menores o mayores longitudes de onda (λ) tiene un comportamiento directa o

indirectamente proporcional al $[Ca^{2+}]_i$. Así, el mayor rango dinámico para las señales de fluorescencia dependientes de Ca^{2+} se obtiene cuando el fluoróforo se excita a 340 nm, cuando la fluorescencia cambia de forma directamente proporcional al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y a 380 nm cuando la fluorescencia cambia de forma inversamente proporcional al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 22). La ratio (R) de las intensidades de fluorescencia emitidas a 510 nm (F_{340}/F_{380} nm) nos da una estimación de los cambios la $[Ca^{2+}]_i$. Usando la ratio de las intensidades de fluorescencia emitidas por la excitación a esas dos λ se consigue minimizar el efecto de una distribución irregular del marcador fluorescente.

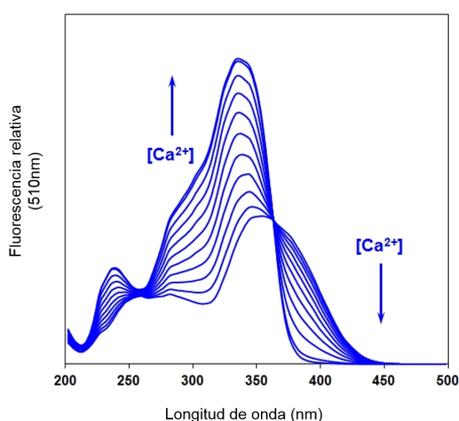


Figura 22. Espectro de excitación del FURA-2AM.

La fuente de excitación utilizada fue una lámpara de xenón, la cual emite una amplia gama de longitudes de onda que serán seleccionadas a una banda de λ más estrecha por el monocromador que actuó como nuestro sistema de excitación. Así mismo, se pudo registrar la fluorescencia con el microscopio invertido (*Leica*, DEU) equipado con un objetivo 20X flúor (0,75 NA), un espejo dicróico de 510 nm y filtros de emisión para la misma longitud de onda. Todo ello permite hacer incidir la luz sobre las células y recolectar la fluorescencia emitida por las mismas en una cámara CCD (*Cooke PixelFly*, EE.UU.) de 12 bits sensible a la luz acoplada al microscopio invertido.

El programa informático utilizado durante todo el registro fue *HImage64*, el cual permite registrar al mismo tiempo la fluorescencia emitida con las dos λ de excitación y realizar el cociente o ratio entre ambas. Las células se excitaron a 340 nm y 380 nm y la longitud de onda emitida se recolectó a 510 nm. De esta forma,

podemos determinar la ratio F_{340}/F_{380} ($R = F_{340}/F_{380}$) y las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ tras aplicar un estímulo concreto, ya que los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ producidos se podrán estimar calculando la diferencia entre el pico máximo de la ratio después de añadir dicho estímulo y valor basal de la ratio antes de añadir el mismo (Δ ratio), expresado en unidades arbitrarias.

Mediante *software*, a cada experimento se le restó la señal de fondo o *background*, establecida fuera de foco, para evitar posibles artefactos.

a) Protocolo del experimento

Durante los experimentos las células fueron sometidas a diferentes estímulos gracias a un sistema de solución de fluidos que permitía bañar las muestras con diferentes drogas y soluciones. A continuación, se detalla la composición de dichas soluciones.

Soluciones	Composición (concentración)	Referencia
Ca ²⁺ (pH7,4)	NaCl (140 Mm)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	KCl (2,7 mM)	<i>Panreac Applichem</i> (EE.UU.)
	CaCl ₂ (1,8 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	MgCl ₂ (1 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	HEPES (10 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	Glucosa (10 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
0Ca ²⁺ (pH7,4)	NaCl (140 Mm)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	KCl (2,7 mM)	<i>Panreac Applichem</i> (EE.UU.)
	MgCl ₂ (1 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	HEPES (10 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	Glucosa (10 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
70KCl (pH7,4)	NaCl (70 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	KCl (70 mM)	<i>Panreac Applichem</i> (EE.UU.)
	CaCl ₂ (1,8 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	MgCl ₂ (1 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	HEPES (10 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)
	Glucosa (10 mM)	<i>Sigma-Aldrich</i> (EE.UU.)

Tabla 13. Composiciones de soluciones utilizadas en el sistema de Ca²⁺.

Los NRVM se sembraron sobre cubres de pequeño tamaño y siguieron los protocolos de silenciamiento génico e I/R en las mismas condiciones que placas destinadas a extracción de proteínas. Una vez transcurridas 72 h del evento isquémico se incubaron durante 35-40 min a T^a ambiente con el marcador fluorescente FURA-2-AM (*Invitrogen*, EE.UU.) en medio DMEN sin suero (5 μ M). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con DMEN.

Posteriormente, a la hora de realizar los registros la pauta de trabajo fue la siguiente: solución 0Ca²⁺ con tapsigargina (TG, 2 μ M) y nifedipina (Nif 10 μ M) durante 3 min y luego Ca²⁺ a (2,5 mM) con TG y Nif. La TG es un inhibidor no competitivo de SERCA y la nifedipina es un bloqueador de canales de calcio del tipo L. Únicamente para registrar los cambios en la [Ca²⁺]_i producidos por la entrada de Ca²⁺ a través de LTCC se utilizó una solución con alta concentración de KCl (70 mM), para inducir la despolarización de la membrana celular y activación de estos canales.

8.2. INMUNOFLUORESCENCIA

a) Determinación del área celular: *Wheat Germ Agglutinin (WGA)*

Para conocer el área de los cardiomiocitos y así estudiar la hipertrofia cardíaca, se utilizó una técnica de inmunofluorescencia que delimitaba intensamente el bode exterior de cada una de las células. El producto utilizado fue un conjugado entre la aglutinina del germen de trigo (*WGA, Wheat Germ Agglutinin*), y el fluoróforo *Alexa Fluor[®] 488*, el cual muestra una fluorescencia verde brillante del colorante *Alexa Fluor[®]* (nivel máximo de excitación / emisión ~495 / 519 nm). Dicho conjugado, *WGA- Alexa Fluor[®] 488*, se une a residuos de ácido siálico y N-acetilglucosaminil presentes en la membrana celular, y por tanto útiles para delimitar el borde exterior de las células.

Previamente a la incubación de la inmunofluorescencia, corazones completos de ratas que habían sido fijados en parafina, fueron desparafinados, cortados en secciones de (6 μ m), deshidratados y rehidratados 3 veces con xilene y posteriormente lavados con etanol. Después, fueron lavados 2 min en agua previo a la tinción con *WGA-Alexa Fluor 488 (Life Technologies, EE.UU.)* a 10 μ g / ml durante 30 min.

Tras la tinción inmunofluorescente, se realizaron dos lavados con PBS (1x) y se montaron en el portaobjetos utilizando el medio de montaje *Fluorescence Mounting Medium* (Dako, DK). Se dejó un día secando a T^a ambiente y en oscuridad. Las imágenes fueron adquiridas a un aumento de 40x en el microscopio confocal (Nikon, JPN). La cuantificación de dichas áreas se realizó con el programa *NIS-Elements* (Nikon, JPN). Para seguir criterios uniformes de cuantificación sólo se seleccionaron cardiomiocitos a los que membranas se identificaban correctamente. El área de >200 cardiomiocitos fueron medidas (Figura 23).

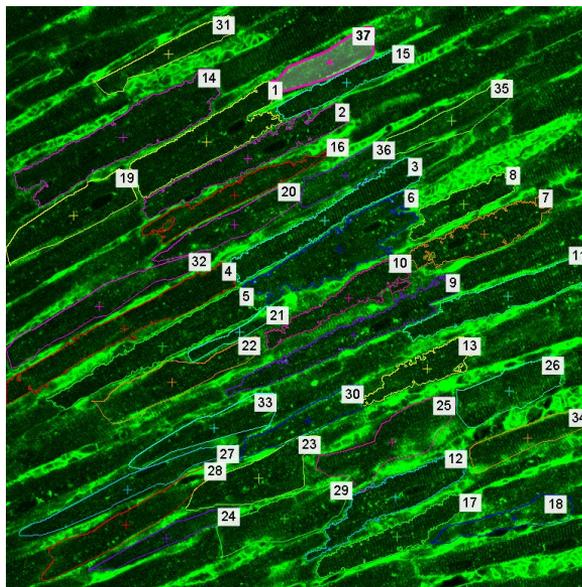


Figura 23. Análisis de la tinción WGA. Células cardíacas de corazón de rata delimitadas utilizando el programa *NIS-Elements*.

b) Determinación de la co-localización intracelular: Proximity Ligation Assay (PLA)

Para estudiar la co-localización de las proteínas Orai1 y TRPC5 se utilizó la tecnología de inmunofluorescencia *in situ* PLA (*Proximity Ligation Assay*). El ensayo de *Duolink in situ PLA red kit* (Sigma-Aldrich, EE.UU.) utiliza la ligación por proximidad *in situ* para detectar, visualizar y cuantificar la localización celular de interacciones de proteínas en un mismo experimento mediante fluorescencia,

permitiendo analizar la co-localización de canales de membrana, en este caso, que se expresan endógenamente.

Los NRVM se sembraron en una placa μ -Slide VI 0,4 (*Ibidi*, DEU) que fueron tratadas con poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) durante 5 min para favorecer la adhesión celular. Las células sembradas en las placas fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol 100 % a -20 °C durante 5 min después del tratamiento correspondiente. Después de lavar las células 5 veces con PBS durante 10 min, las uniones inespecíficas de las mismas se bloquearon durante 30 min a T^a ambiente con solución de bloqueo. Posteriormente, los cardiomiocitos se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 h a T^a ambiente en solución de bloqueo. Después de eliminar los anticuerpos mediante tampón de lavado A, las células fueron marcadas con sondas *Duolink PLA anti-rabbit PLUS* y *Duolink PLA anti-mouse MINUS* durante 1 h a 37 °C. Tras lavar con tampón de lavado A, se incubaron con una solución de ligación durante 30 min a 37 °C que contiene dos oligonucleótidos que hibridarán con las sondas sólo si las proteínas están a menos de 40 nm de separación. Tras lavar con tampón de lavado A e incubar con una solución de amplificación durante 100 min a 37 °C, teniendo como resultado un amplicón concatémico circular y marcado fluorescentemente en rojo. Por último, se lavaron con el tampón de lavado B, se dejaron secar las muestras montadas en las placas de *Ibidi* con *Duolink Mounting Medium* que incluye DAPI para teñir los núcleos. La señal fluorescente se visualizó en un microscopio confocal (*Nikon*, JPN).

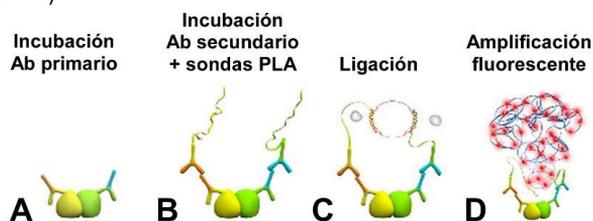


Figura 24. Protocolo resumido del ensayo *in situ* PLA. **A)** Los dos anticuerpos primarios se unen a las dos proteínas en estudio. **B)** Los anticuerpos secundarios marcados con sondas de oligonucleótidos específicas se unirán a su anticuerpo primario correspondiente. **C)** Se produce la hibridación de las sondas en un círculo cerrado si las proteínas se encuentran próximas entre sí. **D)** Se genera un producto de amplificación circular, usando el círculo ligado como molde, al que se unen oligonucleótidos marcados fluorescentemente. Modificado de (www.Sigmaaldrich.com).

Para los experimentos control, se utilizaron; un antígeno de TRPC5 y un anticuerpo anti-Orai1 que por sí solos no mostraban ninguna señal de PLA detectable.

La inmunodetección múltiple se realizó utilizando los siguientes anticuerpos primarios y secundarios:

Anticuerpo primario	Concentración de trabajo	Referencia
<i>Mouse anti-Orai1</i>	1:100	<i>Novus (GB)</i>
<i>Rabbit anti-TRPC5</i>	1:200	<i>Abcam (EE.UU.)</i>

Tabla 14. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de PLA.

Anticuerpo secundario	Concentración de trabajo	Referencia
<i>Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit</i>	1:400	<i>Molecular Probes (EE.UU.)</i>
<i>Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse</i>	1:400	<i>Molecular Probes (EE.UU.)</i>

Tabla 15. Anticuerpos secundarios de inmunofluorescencia.

9. ELISA

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es una técnica de inmunoensayo. En esta tesis doctoral se llevaron a cabo tres ensayos de ELISA diferentes.

9.1. ENSAYO DE LA UCN-2

Este ensayo se realizó a partir de las muestras de suero de rata de 3 grupos experimentales: Sham, I/R e I/R + Ucn-2 a 1 semana y 6 semanas post-I/R. La inmunoplaaca de este kit (*Phoenix Pharmaceuticals, EE.UU.*) estaba cubierta con anticuerpo secundario y los sitios de unión inespecíficos estaban bloqueados. El anticuerpo secundario pudo unirse al fragmento Fc del anticuerpo primario (anticuerpo peptídico) cuyo fragmento Fab estaba unido competitivamente al péptido biotinilado. Finalmente, el péptido biotinilado interactuó con la estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP) que catalizó el sustrato. La

intensidad de color amarillo fue directamente proporcional a la cantidad de péptido biotinilado complejo SA-HRP pero inversamente proporcional a la cantidad de péptido en soluciones estándar o muestras (Figura 25). Esto se debió a la unión competitiva del péptido biotinilado con el péptido estándar). Las placas se leyeron utilizando un luminómetro de lectura de microplacas *Clariostar* (BMG Labtech, DEU) Las unidades arbitrarias fueron normalizadas a la cantidad de proteína.



Figura 25. Principio del ensayo de Ucn-2.

9.2. ENSAYO DE LA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citosólica estable soluble presente en muchos tipos de células que se libera rápidamente. Cuando los niveles de LDH en la sangre están altos puede indicar que ciertos tejidos del cuerpo han sufrido daño por enfermedad o lesión La LDH es un marcador ampliamente utilizado en ensayos de citotoxicidad que proporcionan un método bioluminiscente simple para cuantificar la liberación de LDH. El ensayo de citotoxicidad *LDH-Glo™* (Promega, EE.UU.) se llevó a cabo con muestras de suero de rata de 3 grupos experimentales: Sham, I/R e I/R + Ucn-2 tras 24h post-isquemia.

El ensayo *LDH-Glo™* contiene el reactivo de detección de LDH con lactato, NAD^+ , reductasa y sustrato y *Ultra-Glo™ rLuciferase*. Si la muestra contiene LDH, las reacciones acopladas a enzimas que se muestran en la Figura 26 proporcionan una señal luminiscente de manera proporcional a la cantidad de LDH en la muestra. La señal aumenta hasta que se consume todo el sustrato reductasa y la señal de reacción ya no está en el rango lineal del ensayo. La medición se llevó a cabo con el luminómetro de microplacas *Clariostar* (BMG Labtech, DEU). Las unidades arbitrarias fueron normalizadas a la cantidad de proteína de la muestra.

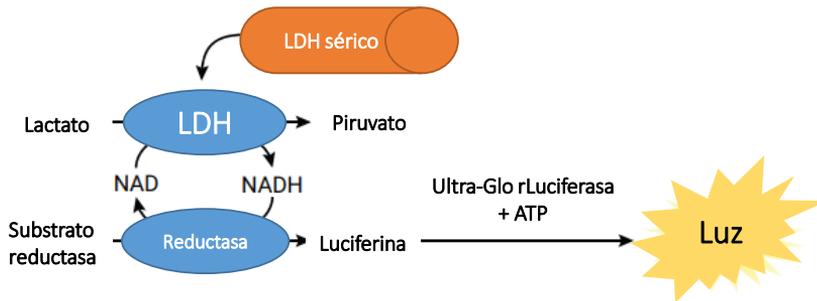


Figura 26. Principio del ensayo de citotoxicidad LDH-Glo™. Lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la oxidación de lactato con reducción concomitante de NAD^+ a NADH. La reductasa utiliza NADH y sustrato reductasa para generar luciferina, que se convierte en una señal bioluminiscente por la *rLuciferasa Ultra-Glo™*. La señal luminosa generada es proporcional a la cantidad de LDH presente.

9.3. ENSAYO DEL AMPc

El ensayo *cAMP-Glo™* (Promega, EE.UU.) está diseñado para controlar la producción de AMPc en respuesta a los efectos de los GPCR. Los GPCR que se acoplan con la adenilato ciclasa aumentan o disminuyen el AMPc intracelular. El ensayo se basa en el principio de que el AMPc estimula la actividad de la holoenzima de la proteína quinasa A (PKA), disminuyendo el ATP disponible y provocando una disminución de la producción de luz en una reacción de luciferasa acoplada.

Las células de NRVM se sometieron al proceso de I/R a los tiempos de 2 min, 5 min y 48 h. Tras la inducción de la activación del AMPc, las células se lisan, se agrega la solución de detección de AMPc, que contiene PKA. Luego, se agrega el reactivo *Kinase-Glo®* para terminar la reacción de PKA y detectar el ATP restante mediante una reacción de luciferasa (Figura 27). Las placas se leen utilizando un luminómetro de lectura de microplacas *Clariostar (BMG Labtech, DEU)*. Se utilizó como control positivo el isoproterenol (10 mM) (*Sigma-Aldrich, EE.UU.*) y como control negativo el GSK-7975-A (10 mM). Las unidades arbitrarias fueron normalizadas a la cantidad de proteína.

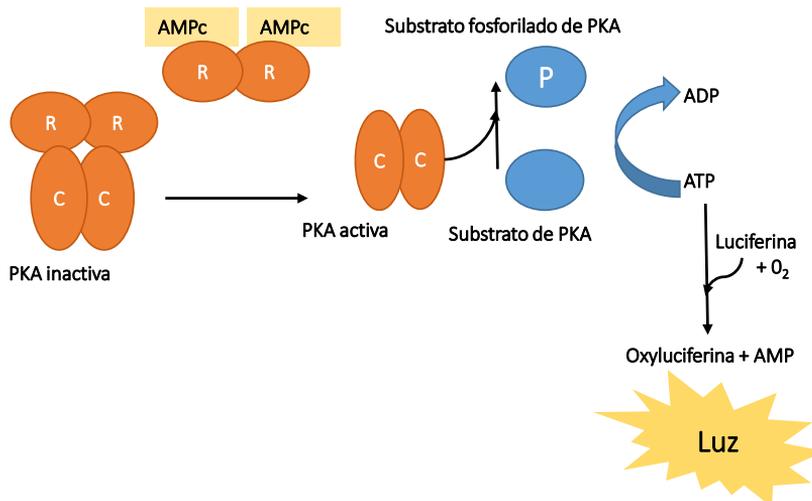


Figura 27. Principio del ensayo *cAMP-Glo*™. El AMPc derivado de la actividad de la AC activa la PKA y ésta fosforila a su sustrato generando una reacción con la luciferina produciendo una señal bioluminiscente. R representa la subunidad reguladora y C representa la subunidad catalítica.

10. BIOINFORMÁTICA

El análisis bioinformático *in silico* de los genes diana que podían estar regulados por los miRNAs de interés se realizó utilizando diferentes bases de datos electrónicas. Concretamente, *TargetScan7* (<http://www.targetscan.org>), *MirDB* (<http://mirdb.org/>) la aplicación de *Exiqon* (<https://www.bionova.es>).

Para enriquecer y comprobar los resultados se utilizó la aplicación *online Panther* para identificar cómo se distribuían esos genes de diana según la función. Ésta distribución está basada en las bases de datos *UniProt Release 2019_04*, *Ensembl release 95* and *Ensembl Genome release 42 data bases*. Dirección web: <http://pantherdb.org/genelistanalysis.do>.

11. ANÁLISIS DE LOS DATOS

El análisis de los datos se realizó mediante el software *Graph Path Prism*. (*GraphPad Software*, EE.UU.) Al inicio de cada estudio, se llevó a cabo un cálculo del tamaño muestral necesario. Los valores atípicos se eliminaron según los resultados de una herramienta *online* de *GraphPad*

(<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>), y durante el análisis estadístico en todos los casos se comprobó que la muestra seguía una distribución normal mediante el test de *Shapiro-Wilk*, en el que si los valores de p eran $>$ a 0,05 indicaba una distribución normal. Si los datos seguían una distribución normal se realizó la comparación de medias entre dos grupos con la prueba *t Student* y entre varios grupos un análisis de varianzas ANOVA (análisis ordinario o sin corrección de *LSD de Fisher*) Para la distribución no normal, se utilizó el test de *Mann-Whitney* para la comparación de dos grupos y la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* con múltiples comparaciones corregidas por la prueba de *Dunn*. Los resultados se representan como la media \pm la media del error estándar de la media (SEM, *Standard Error Mean*). Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de p era al menos inferior a 0,05.



RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE PÁRAMETROS HEMODINÁMICOS EN EL MODELO ANIMAL DE I/R TRATADO CON UCN-2

Durante toda la caracterización del modelo animal y la recolección de muestras, éstas se estudiaron haciendo distinción entre: la parte isquémica o de riesgo, cerca de la zona donde se ha producido el daño; y la zona remota más alejada de dicha zona como se puede apreciar en la Figura 28. Los datos presentados a continuación se centraron únicamente en esa zona de riesgo.

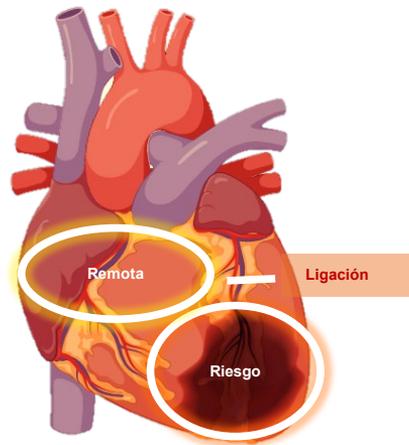


Figura 28. Esquema de trabajo con las muestras de corazón: zona remota y zona isquémica o de riesgo.

1.1. LA UCN-2: CARDIOPROTECTOR NATURAL TRAS I/R

Basándose en conocimientos anteriores sobre el posible efecto cardioprotector de la Ucn-2, se decidió estudiar el nivel sérico de Ucn-2 secretado y la expresión del receptor CRF-R2 en el tejido cardíaco del modelo animal de I/R. Figura 29A muestra que 1 semana después de I/R existía una liberación de carácter significativo de Ucn-2 en sangre, sin embargo, a las 6 semanas los niveles de Ucn-2 descendieron a valores cercanos al control. De igual manera, se observó un incremento significativo de la expresión del receptor de Ucn-2, CRF-R2, en el corazón de rata 1 semana después de I/R, mientras descendía 6 semanas después de I/R (Figura 29B).

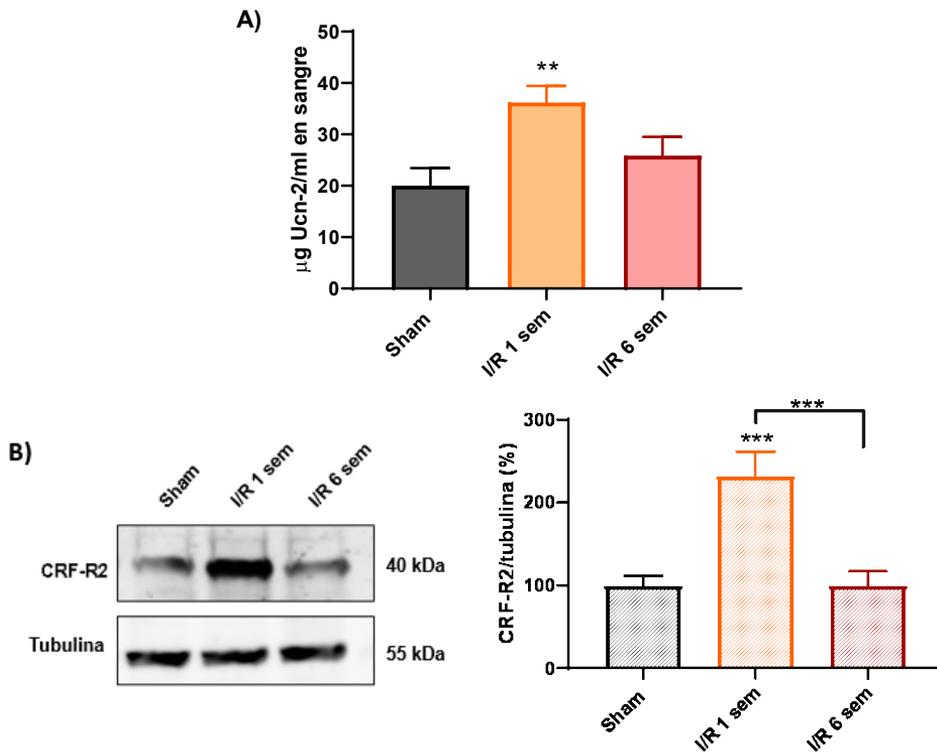


Figura 29. Los niveles de Ucn-2 se regularon positivamente durante la lesión por I/R a 1 semana en suero sanguíneo así como en el receptor de Ucn-2 (CRF-R2). **A)** Gráfico de barras representativo de la medición de Ucn-2 en suero sanguíneo de ratas Sham, operadas de I/R tras 1 semana o 6 semanas. **B)** Imagen de WB y gráfico de barras que representan la expresión de CRF-R2 en ratas Sham, I/R a 1 semana y 6 semanas. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 8). “**” y “***” indican significancia de $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente.

1.2. LA UCN-2 MEJORA LA FUNCIÓN CARDIACA, DISMINUYE EL TAMAÑO DE INFARTO Y MEJORA LA FIBROSIS

Lo primero que se quiso comprobar en el modelo de I/R a una semana fue si la Ucn-2 mejoraba la función cardíaca deteriorada por el daño isquémico. Para ello se decidió estudiar parámetros hemodinámicos tales como la fracción de eyección (FE) y de acortamiento (FA), así como el tamaño de infarto, la hipertrofia y la fibrosis.

Tal como se muestra en la Figura 30, la capacidad contráctil del corazón a 1 semana después de I/R se ve mermada durante sístole y diástole. Existe una disminución en la fracción de eyección (FE = 56,9 % ± 3,3) y de acortamiento (FA = 40,1 % ± 3,4) en el grupo de I/R en comparación con Sham (FE = 71,8 % ± 1,3 y FA = 50,7 % ± 4,0). Sin embargo, cuando se administra Ucn-2, 5 min antes de reestablecer el flujo, se observó una recuperación significativa de la contractilidad (FE = 64,12 % ± 1,53, FA = 47,6 % ± 0,9). Además, se ven mejorados otros parámetros hemodinámicos con la administración de Ucn-2, como se resume en la Tabla 16.

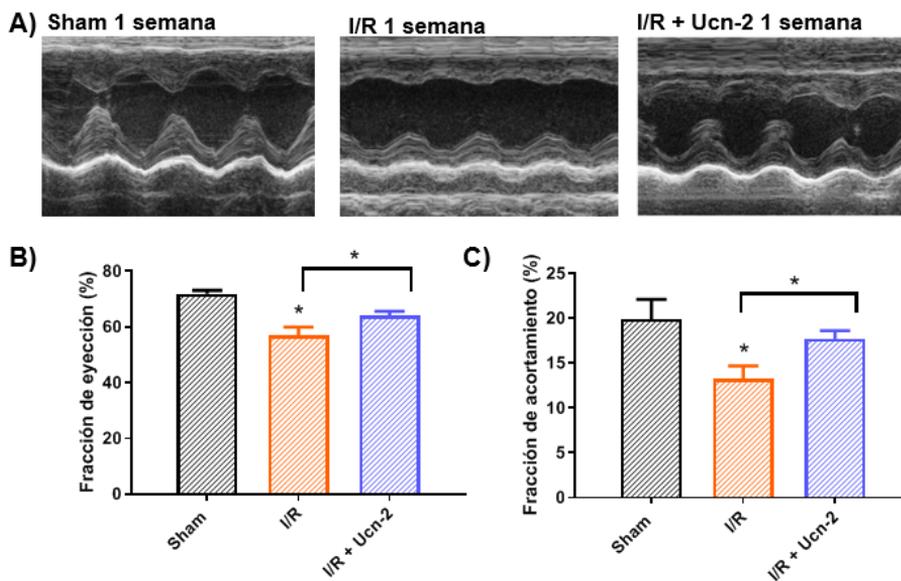
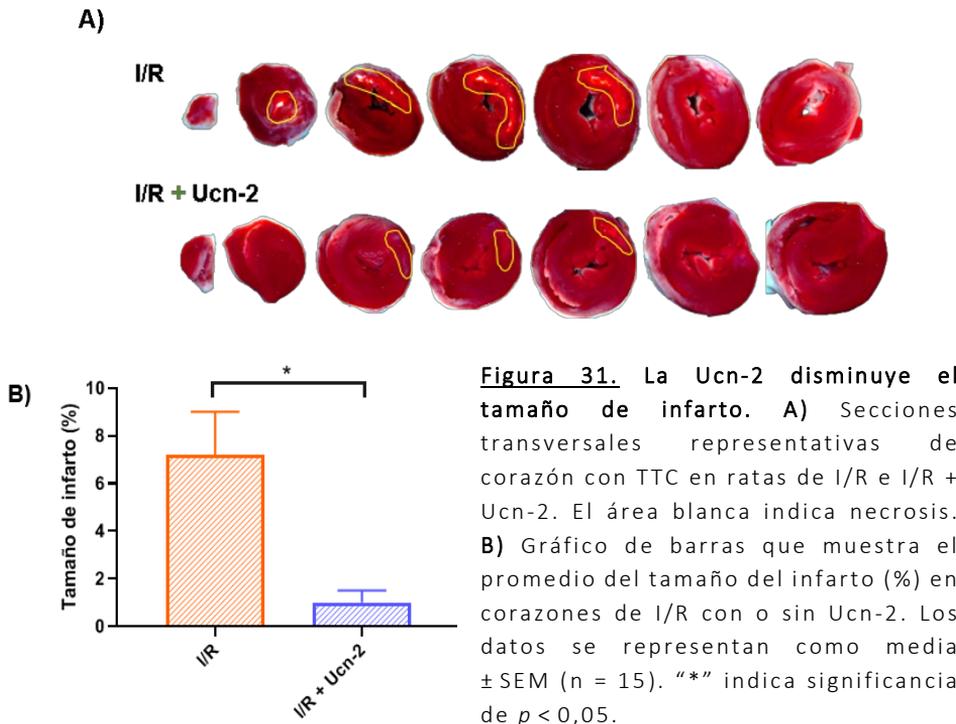


Figura 30. La Ucn-2 mejora la contractilidad cardiaca en modelo I/R de rata. **A)** Imágenes ecocardiográficas representativas en modo M evaluadas en ratas Sham, I/R e I/R +Ucn-2 a una semana. **B-C)** Gráficos de barras de los valores de fracción eyección (FE) y acortamiento (FA). Sham (n = 8); I/R (n = 15) y ratas de I/R infundidas con Ucn-2 (150 µg / Kg) 5 min antes de la reperusión (n = 14). Los datos se representan como media ± SEM. “*” indica significancia a $p < 0,05$.

Condición	Sham	I/R	I/R + Ucn-2
FC (latidos / min)	436 ± 5,3	424,22 ± 6,3	416,3 ± 3,8
FE (%)	71,8 ± 1,2	54,5 ± 2,8 *	65,2 ± 1,1 *
FA (%)	50,7 ± 4	40,1 ± 3,4 *	47,6 ± 0,9 *
Diámetro al final de sístole (mm)	2,7 ± 0,2	4,1 ± 0,3 **	3,5 ± 0,1 *
Diámetro al final de diástole (mm)	6,4 ± 0,1	6,8 ± 0,2 *	5,9 ± 0,1
VS (μl)	119,5 ± 5,5	207,8 ± 24,01 *	142,7 ± 7,8 **
VD (μl)	427,4 ± 19,9	494,5 ± 36,4	397,4 ± 13,8 **
n	8	15	16

Tabla 16. Resumen de los parámetros hemodinámicos evaluados en ratas Sham, I/R e I/R+Ucn-2 a 1 semana. FC, Frecuencia Cardíaca; FE, Fracción de Eyección, FA, Fracción de Acortamiento; Diámetro al final de sístole ventricular izquierdo, Diámetro al final de diástole ventricular izquierdo; VS, Volumen Sistólico; VD, Volumen Diastólico. Los datos se representan como media ± SEM. "*" y "**" indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Por otra parte, la infusión de Ucn-2 disminuyó significativamente el tamaño de infarto asociado con la ligación de la arteria coronaria como se ilustra en los cortes de corazón desde la parte apical a la basal la Figura 31 en ratas operadas de I/R a 1 semana. La muerte celular del tejido cardíaco es la zona blanquecina.



Además, se analizó los niveles de LDH, indicador del daño celular, en suero de ratas de I/R y tratadas con Ucn-2 a las 24 h. La Figura 32 muestra una elevación significativa del LDH en ratas I/R sin tratamiento, sin embargo, los niveles de LDH disminuyeron en ratas de I/R tratadas previamente con Ucn-2.

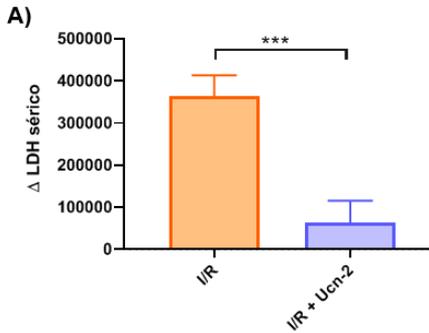


Figura 32. Incremento del LDH en suero de ratas operadas de I/R y tratadas con Ucn-2. **A)** Ensayo de citotoxicidad *LDH-Glo™* realizado en muestras de suero de ratas I/R e I/R + Ucn-2 a 24 h. Los datos se representan como incremento \pm SEM ($n = 4$). “***” indica significancia de $p < 0,001$.

Haciendo uso de la resonancia magnética se comprobó la presencia de fibrosis reactiva en las ratas sometidas a I/R y una disminución significativa en aquellas tratadas con Ucn-2 a 1 semana post-I/R (Figura 33).

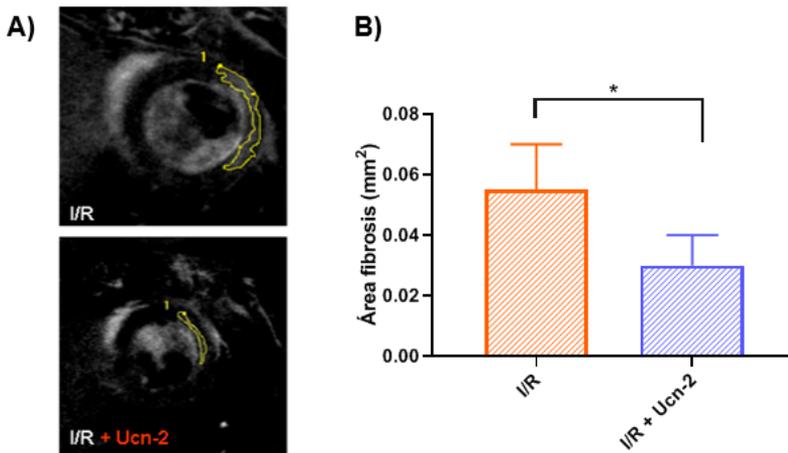


Figura 33. La Ucn-2 previene la fibrosis cardíaca. **A)** Resonancia magnética *in vivo* que muestra imágenes de corazón de rata donde el área señalada en amarillo es el área fibrótica para ratas de I/R tratadas o no con Ucn-2. **B)** Gráfico de barras que resume el área de fibrosis (mm²). Los datos se presentan como media \pm SEM ($n = 8$). “*” indica significancia de $p < 0,05$.

Así mismo, desde un punto de vista molecular se examinó la expresión de marcadores fibróticos clásicos de corazón a una semana post-infarto. Esos

marcadores fueron colágeno tipo I (Col-I) y III (Col-III) o factores de crecimiento transformantes β de tipo I y II (Tgf- β I Tgf- β II) ampliamente descritos en el campo (Carreño et al., 2006; Raaf et al., 2011). Como se ilustra en la Figura 34 una semana tras I/R se observó un aumento de los 4 marcadores de fibrosis a nivel de ARNm en muestras de corazón y una disminución de los mismos cuando esas ratas fueron tratadas con Ucn-2.

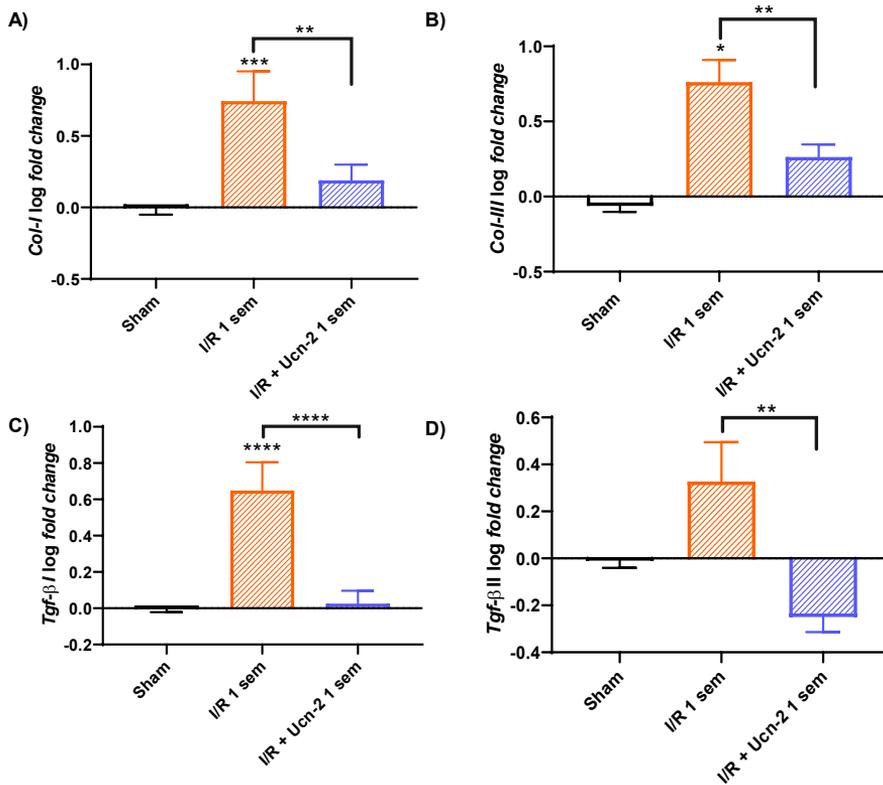


Figura 34. Ucn-2 regula la expresión de genes relacionados con la fibrosis en modelo animal de I/R a 1 semana. Gráficos de barra muestran los cambios de expresión entre los genes de fibrosis (*Col-I*, *Col-III* y *Tgf- β I* y *Tgf- β II*) por RT-PCR. Datos de ratas Sham, de I/R e I/R tratadas con Ucn-2. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 4). “*”, “**”, “***”, “****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

Por otra parte, analizamos si la hipertrofia inducida por la I/R se mejoraba con la Ucn-2 y se vio que no disminuía dicho parámetro. La hipertrofia se analizó utilizando la tinción de WGA la cual marcaba los límites de los cardiomiocitos

pudiendo cuantificar su área. La Figura 35 muestra que no existían cambios con el tratamiento de Ucn-2 al analizar la hipertrofia.

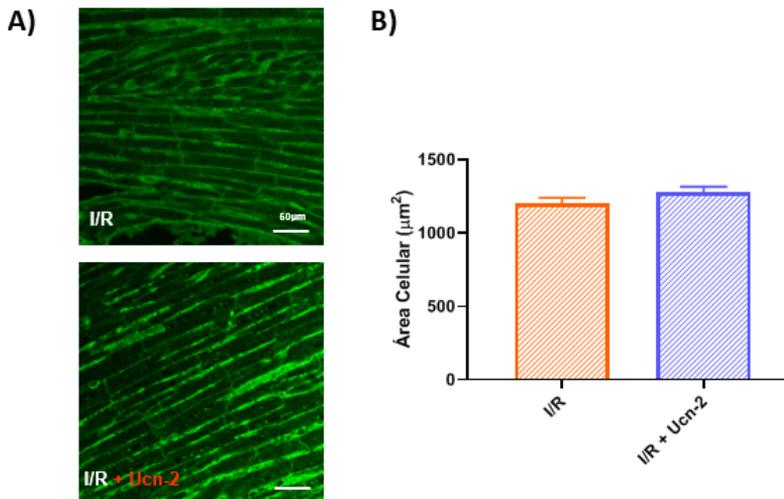


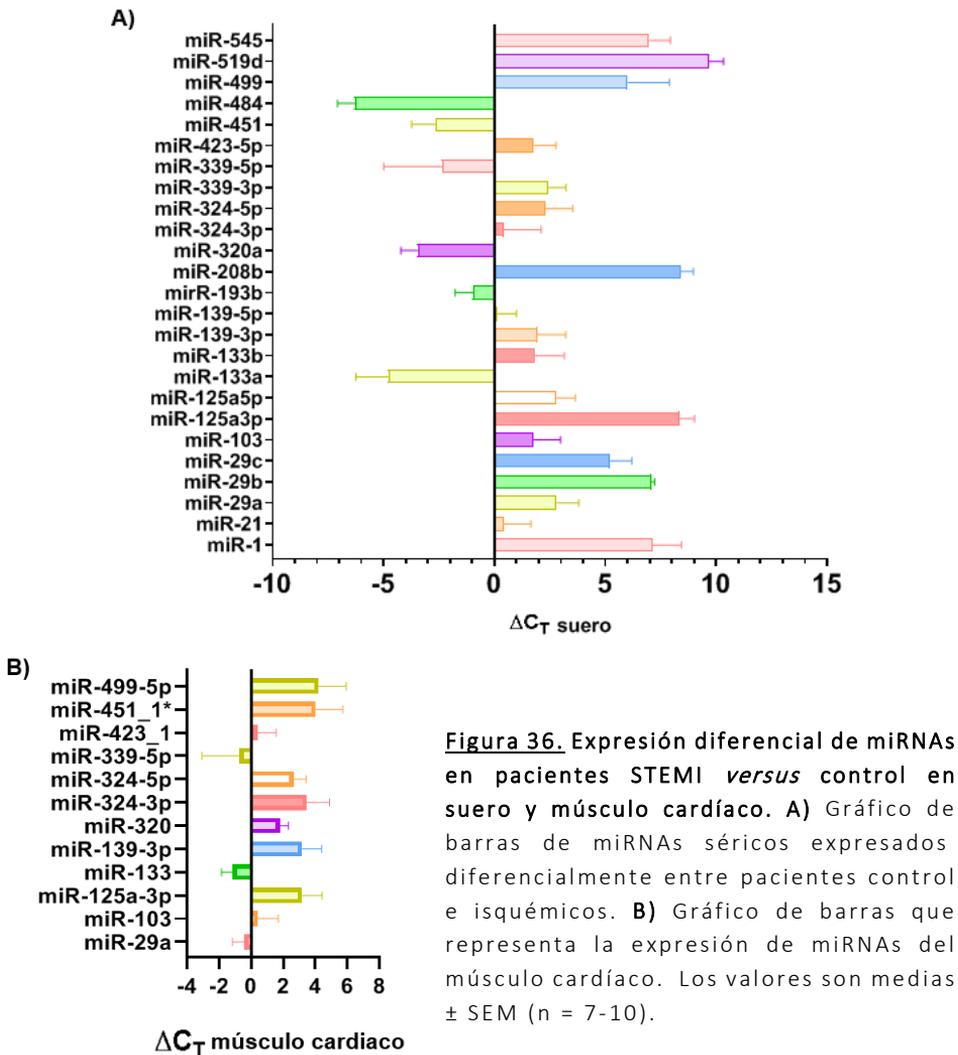
Figura 35. La Ucn-2 preserva la hipertrofia cardíaca producida durante el I/R. A) Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con WGA en ratas I/R e I/R + Ucn-2. B) Gráfico de barras que muestra la media del área celular en I/R y I/R + Ucn-2. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 6).

En este primer apartado, planteamos el papel que ha mostrado la Ucn-2 en cardioprotección contra las lesiones por I/R. La administración intravenosa de Ucn-2 antes de la reperusión cardíaca en el modelo de I/R de rata Wistar recuperó la contractilidad cardíaca y redujo el tamaño del infarto, la fibrosis, la liberación de LDH pero no la hipertrofia.

2. LA UCN-2 DESENCADENA UNA COMPLEJA REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL IMPLICADA EN LA APOPTOSIS Y FIBROSIS CARDÍACA DERIVADA DE I/R

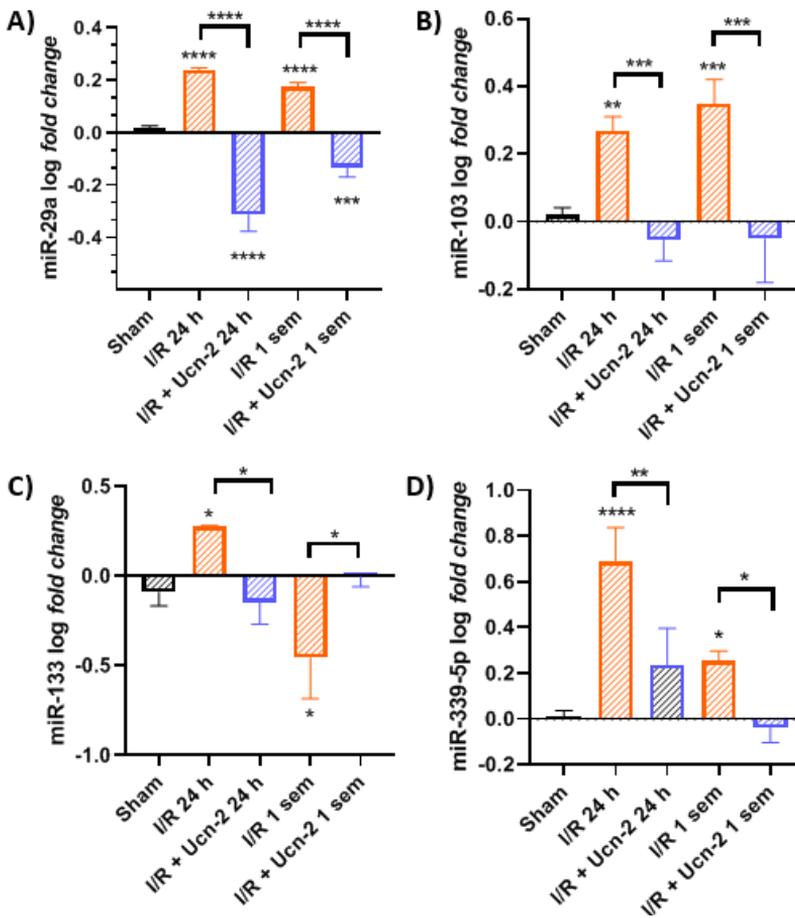
Dada la importancia de la regulación post-transcripcional de la expresión de genes en procesos fisiológicos y patológicos cardíacos (Fasanaro et al., 2008; Díaz et al., 2017; Shao et al., 2018), se decidió analizar si la Ucn-2 podría regular la expresión de miRNAs en el modelo rata de I/R.

Utilizando datos previos del laboratorio basados en el análisis de miRNAs circulantes en pacientes que sufrieron IAM con STEMI tratados con intervención percutánea primaria. Como se muestra en la Figura 36A, se observó una alteración significativa en la expresión de varios miRNAs circulantes en pacientes con STEMI hasta 6 h después de la angioplastia en comparación con sus niveles en pacientes control. Además, como se representa en la Figura 36B, la expresión de 12 miRNAs (miR-29a, miR-103, miR-125a-3p, miR-133, miR-139-3p, miR-320, miR-324-3p, miR-324-5p, miR-339-5p, miR-423_1, miR-451_1 * y miR-499-5p) se detectaron en tejido cardíaco aislado de pacientes con insuficiencia cardíaca de origen isquémico.



2.1. LA UCN-2 MODULA LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN CORAZONES I/R

Basándonos en los datos previos de muestras humanas, se decidió estudiar la expresión y el efecto de Ucn-2 sobre los 12 miRNAs en el área de riesgo de corazones de rata sometidas a I/R. La Figura 37 muestra una expresión diferencial de miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1* a las 24 h y 1 semana después de I/R. Mientras tanto, la administración de Ucn-2 disminuyó la alteración de estos miRNAs excepto en el caso de miR-423_1 a las 24 h. Por otra parte, como se muestra en la Figura 38, a las 24 h también se vieron afectados los miRNAs: miR-125a, miR-139, miR-320 y miR-324-5p; sin embargo, la Ucn-2 no resolvió su aumento de expresión. Además, miR-324-3p y miR-499-5p no se veían afectados ni durante la isquemia ni con el tratamiento (Figuras 38D y 38F).



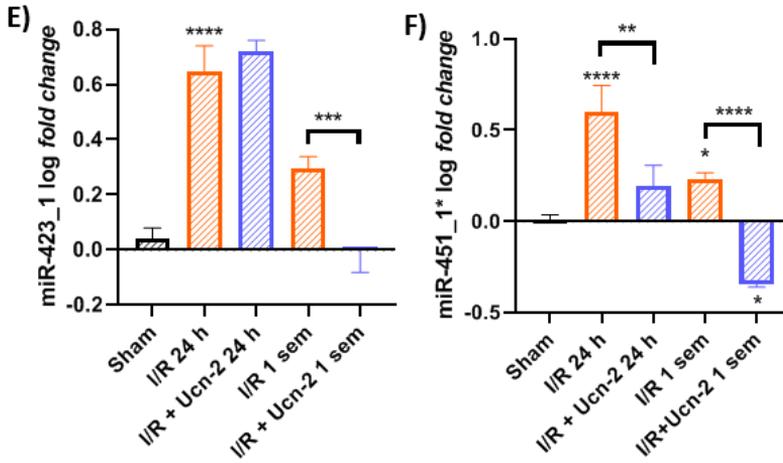
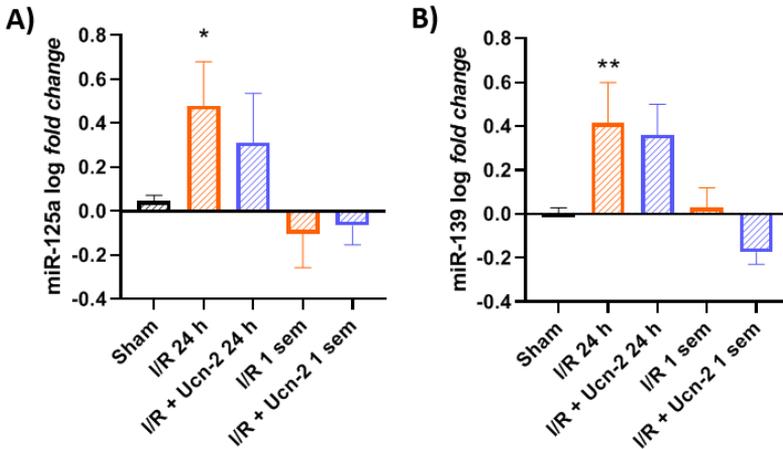


Figura 37. Diferencias significativas en la expresión de los miRNAs en el modelo animal de I/R e I/R tratado con Ucn-2. A-F) Gráficos de barra muestran la expresión de miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1*, en ratas Sham, I/R e I/R + Ucn2 a 24 h y 1 semana post-I/R. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 4-6). “*”, “***”, “****” y “*****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente.



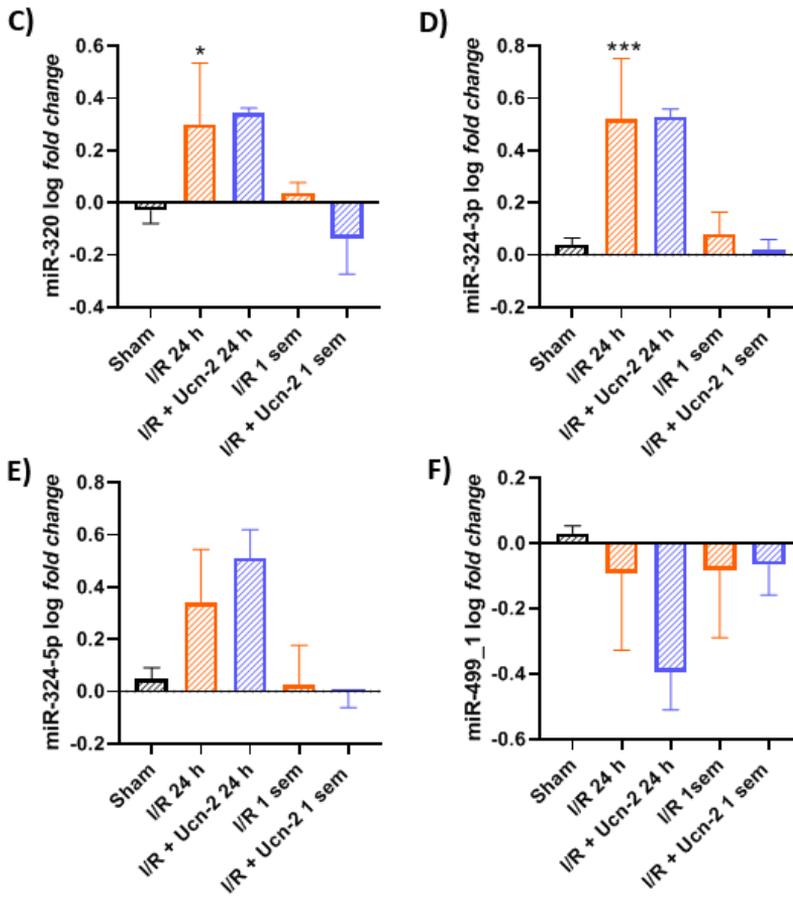
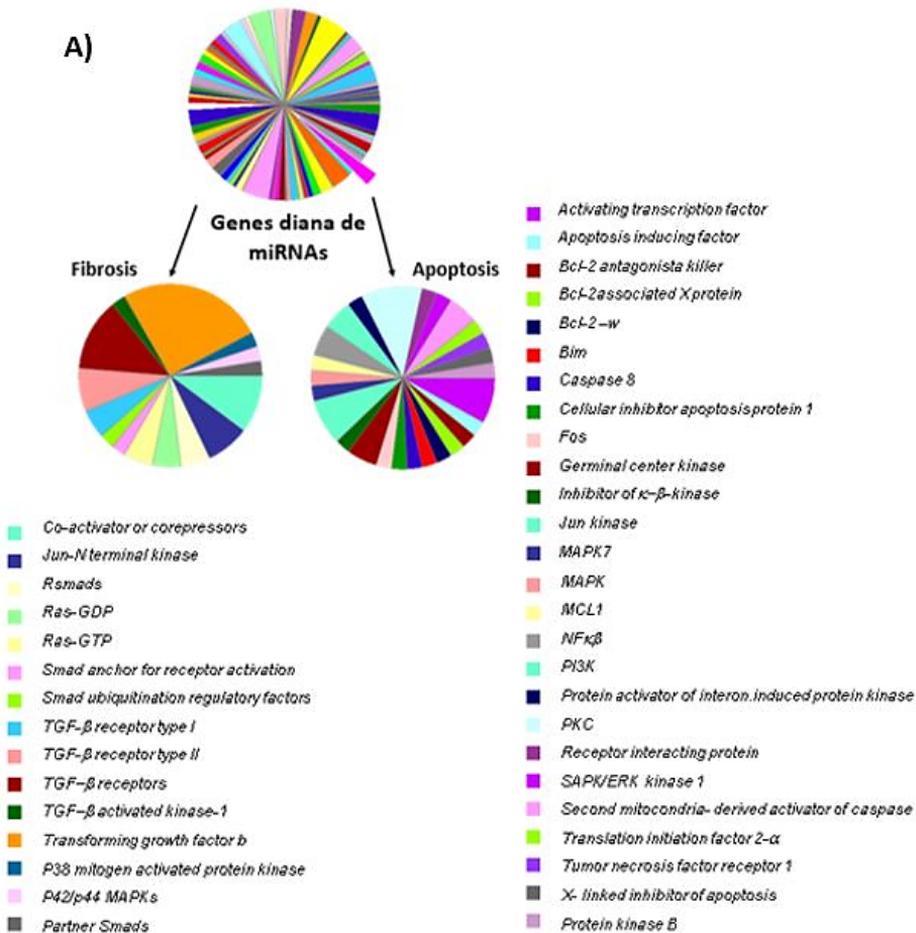


Figura 38. Diferencias significativas de expresión de miRNAs a 24h tras I/R no resueltas por Ucn-2 y sin cambios a 1 semana post-infarto. A-F) Gráficos de barra muestran la expresión de miR-125, miR-139, miR-320, miR-324-3p, miR-324-5p y miR-499_1, en ratas Sham, I/R e I/R + Ucn-2 a 24 h y 1 semana post-I/R. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 4-6). “*”, “***” y “****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente

2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DIANA QUE AFECTAN LOS miRNAS DESREGULADOS POR LA UCN-2

Queriendo conocer qué genes podían verse regulados por aquellos miRNAs que se vieron aumentados en I/R y reducidos por Ucn-2, se realizó un análisis *in silico* utilizando las herramientas en línea: *miRDB*, *TargetScan* y *Exiqon*. Posteriormente, usando el *software* PANTHER, el cual proporciona un análisis a

través de relaciones evolutivas, se generó un gráfico (Figura 39A) que mostraba que 102 genes podían ser posibles dianas de estos miRNAs, de ellos 57 implicados en la apoptosis y 45 en fibrosis. Concretamente esos genes se encontraban agrupados en 41 vías de señalización diferentes implicadas en los procesos celulares asociados con el remodelado post-IAM. Una vez conocido cuántos genes en total regulaban los cinco miRNAs que habían salido diferencialmente expresado, se quiso ver concretamente cuáles de esos miRNAs tenían un papel importante en la regulación de genes apoptóticos y fibróticos. Como se resume en la Figura 39B, de los miRNAs analizados destacaron miR-29a y miR-451_1* que regularían a 16 y 17 genes apoptóticos, y 14 y 18 genes relacionados con la fibrosis, respectivamente.



B)

	Genes apoptóticos	Genes fibróticos
miR-29a	16	14
miR-103	5	4
miR-133	15	6
miR-339-5p	3	3
miR-423_1	1	-
miR-451_1*	17	18
Genes totales	57	45

Figura 39. Análisis *in silico* de genes diana regulados por miR-29a, miR-103, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1*. **A)** Gráfico circular que destaca los genes de apoptosis y fibrosis (n = 102) (rosa y gris respectivamente), así como información amplificada sobre las vías de apoptosis y fibrosis (total = 41). **B)** Tabla con el número de genes de apoptosis y fibrosis diana por cada miRNA. (<http://www.pantherdb.org/>)

2.3. MiR-29a REGULA GENES APOPTÓTICOS Y REDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES DE FIBROSIS INDUCIDOS POR I/R

MiR-29a y miR-451_1* fueron los miRNAs que más genes diana relacionados con la apoptosis y la fibrosis previsiblemente regulaban. El siguiente paso fue validar su posible papel en la regulación de genes apoptóticos. Para ello se hizo un ensayo usando placas comerciales de qPCR *PrimePCR Tier 1 Apoptosis and Survival plates*. Se validó la expresión de 76 genes en muestras aisladas de NRVM sometidos al protocolo de I/R *in vitro*, así como de células transfectadas con miR-29a o miR-451_1* *mimics* para determinar qué genes apoptóticos que se sobrepresaban o se inhibían en cada condición.

En primer lugar, los datos reflejados en la Figura 40 confirmaron que los niveles de miR-29a y miR-451-1* aumentaron significativamente después de la transfección con *mimics* en cultivo de NRVM.

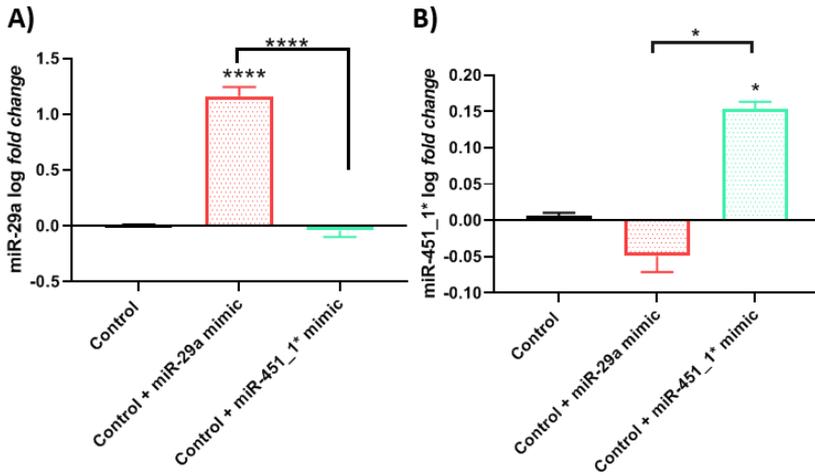
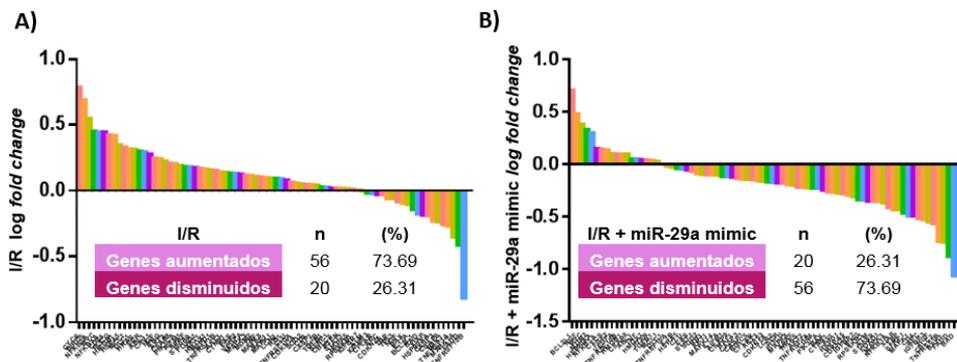


Figura 40. Sobrexpresión de miR-29a y miR-451_1* en NRVM. Gráficos de barra muestran que la transfección de células NRVM con *mimics* que aumentaban específicamente la expresión de miR-29a (A) y miR-451_1* (B) con respecto a control. Los datos se presentan como media \pm SEM ($n = 4$). “*” Y “****” indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,0001$, respectivamente.

En segundo lugar, siguiendo el protocolo de I/R *in vitro* observamos que en cultivo sometido sólo a I/R la expresión de 56 genes apoptóticos fueron regulados positivamente mientras que 20 genes lo hacían negativamente (Figura 41A). Sin embargo, en NRVM con I/R transfectados con *mimics* para miR-29a y miR-451_1* serían 56 y 49 los genes apoptóticos regulados negativamente y 20 y 27 de manera positiva, respectivamente (Figuras 41B-C).



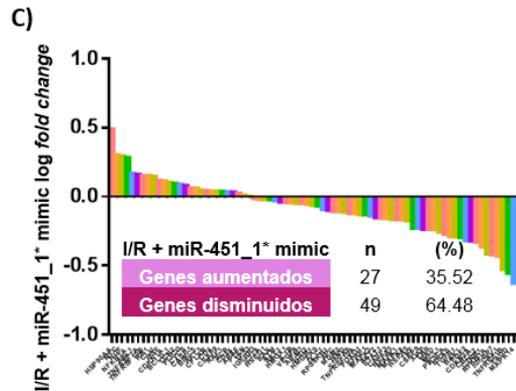


Figura 41. *Microarray* de genes apoptóticos en las condiciones de I/R e I/R con sobreexpresión de los miR-29a y miR-451_1* en NRVM. A-C) Gráficas de barras que representan los resultados de expresión del *microarray* para genes apoptóticos utilizando la placa comercial *PrimePCR Apoptosis and Survival Tier 1*. Los insertos muestran el número y porcentaje (%) de genes aumentados y disminuidos para cada condición.

Para validar los resultados del ensayo de *PrimePCR*, se midieron los niveles de ARNm de 6 genes seleccionados: *Apaf-1*, *Aifm-1*, *Hmox-1*, *Bcl-2*, *Cyts* y *Mapk-8*. La selección de genes fue en función de su porcentaje de cambio medido por el *log fold change* así como por su implicación en el proceso de I/R como se describió en la literatura (Yano *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2014; Y. Wang *et al.*, 2016; Basaiyye *et al.*, 2018; Eid *et al.*, 2020; Gao, Gao and Lv, 2020).

Las Figuras 42A-B muestran que 24 h después del proceso de I/R en NRVM la expresión de *Apaf-1* y *Hmox-1* aumentó bajo I/R mientras que miR-29a evitó significativamente esta regulación positiva. Otros genes no parecen tener cambios significativos en I/R. Por otra parte, las Figuras 42C-D y 42F muestran que miR-29a también afectó la expresión de *Cyts* y *Mapk-8* y *Aifm-1* aunque estos no habían sido alterados por I/R. En el caso de miR-451_1 *, apenas se alteró significativamente la expresión de estos genes inducidos por I/R.

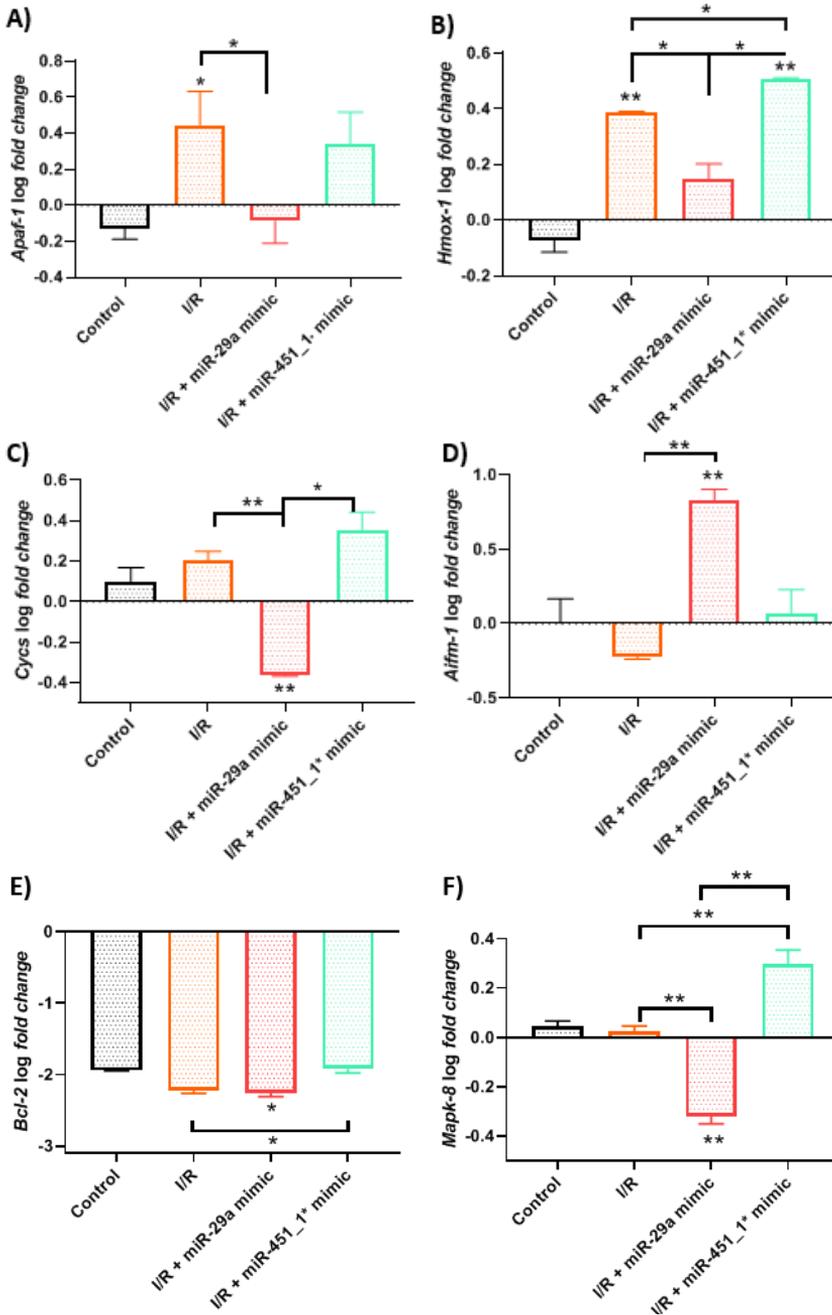


Figura 42. Expresión de los genes apoptóticos en NRVM transfectados con miR-29a y miR-451_1* *mimics* en modelo de I/R *in vitro*. A-F) Gráficos de barras que representan la validación de la expresión de los genes de apoptosis (*Apaf-1*, *Hmox-1*, *Cyca*, *Aifm-1*, *Bcl-2* y *Mapk-8*) en situación control, I/R y en I/R + miR-29a y 451_1* *mimics*. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 4). "*" Y "**" indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

A continuación, se analizó si miR-29a y miR-451_1* podrían afectar a genes de fibrosis en NRVM bajo I/R, como se observó con Ucn-2 en corazón de rata. Como se muestra en la Figura 43, miR-29a evocó una regulación negativa significativa con respecto al aumento inducido por I/R de colágeno I y III.

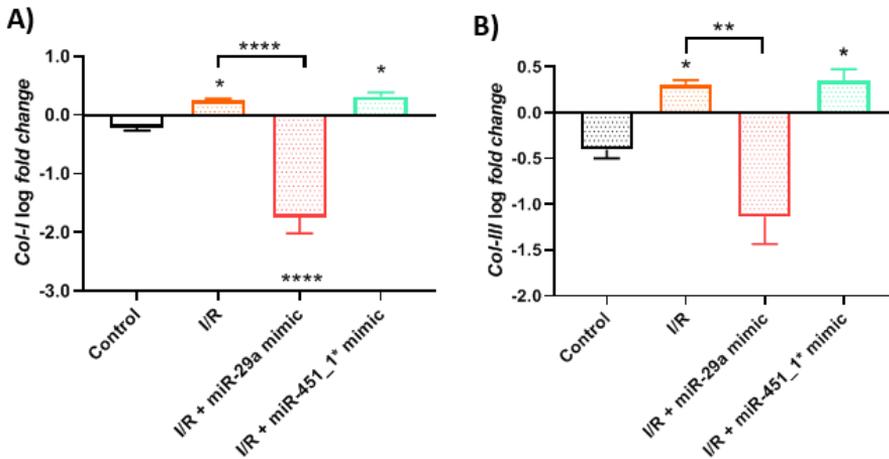


Figura 43. Expresión de los genes fibróticos en NRVM transfectados con miR-29a y miR-451_1* *mimics* en modelo de I/R *in vitro*. A-B) Gráficos de barras que representan la validación de expresión de genes de fibrosis (*Col-I*, *Col-III*) en situación control, I/R y con transfección en I/R de miR-29a y 451_1* *mimics*. Los datos se presentan como media \pm SEM ($n = 4$). “*”, “***” y “****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

2.4. EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS EN CORAZÓN INFARTADO

Teniendo en cuenta los resultados anteriores en NRVM, se examinó qué ocurría en el modelo animal de I/R. En la zona de riesgo, *Apaf-1*, *Hmox-1* y *Aifm-1* mostraron un aumento 24 h después de la I/R que disminuyó 1 semana después (Figuras 44A-C). También, se observó una disminución de la expresión de *Cyts* y *Mapk-8* a las 24 h y además a 1 semana en el caso de *Mapk-8* (Figuras 44D y 44F). *Bcl-2* no mostró cambios importantes en I/R (Figura 44E).

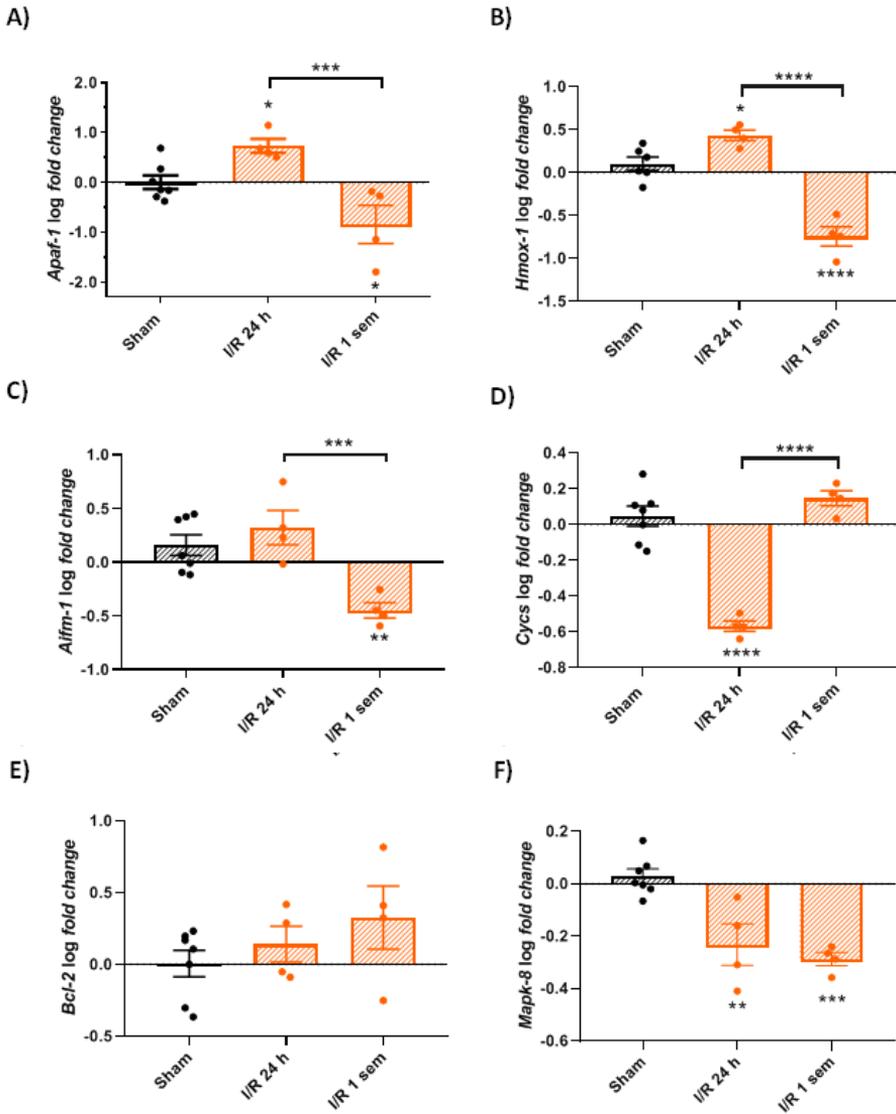


Figura 44. Expresión de genes apoptóticos en la zona de riesgo del modelo animal de I/R a 24 h y 1 semana. A-F) Los gráficos de barras muestran cambios en la expresión de los genes apoptóticos (*Apaf-1*, *Hmox-1*, *Aifm-1*, *Cycs*, *Bcl-2* y *Mapk-8*) en Sham e I/R a 24 h y 1 semana post-I/R. Los datos se presentan como media \pm SEM ($n = 4$). “*”, “**”, “***”, “****” y “*****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

En aquellos genes que se habían observado cambios para I/R se decidió mirar el efecto que tenía la infusión de Ucn-2 en modelo de ratas operadas a las 24 h y

a 1 semana post-I/R. Las Figuras 45A-B muestran que a las 24 h la Ucn-2 aumentaba la expresión de genes *Apaf-1* y *Aifm-1*, pero no la de *HmoX-1* (Figura 45C), en la zona de riesgo, mientras que una semana después del tratamiento con Ucn-2 disminuía la expresión de estos genes.

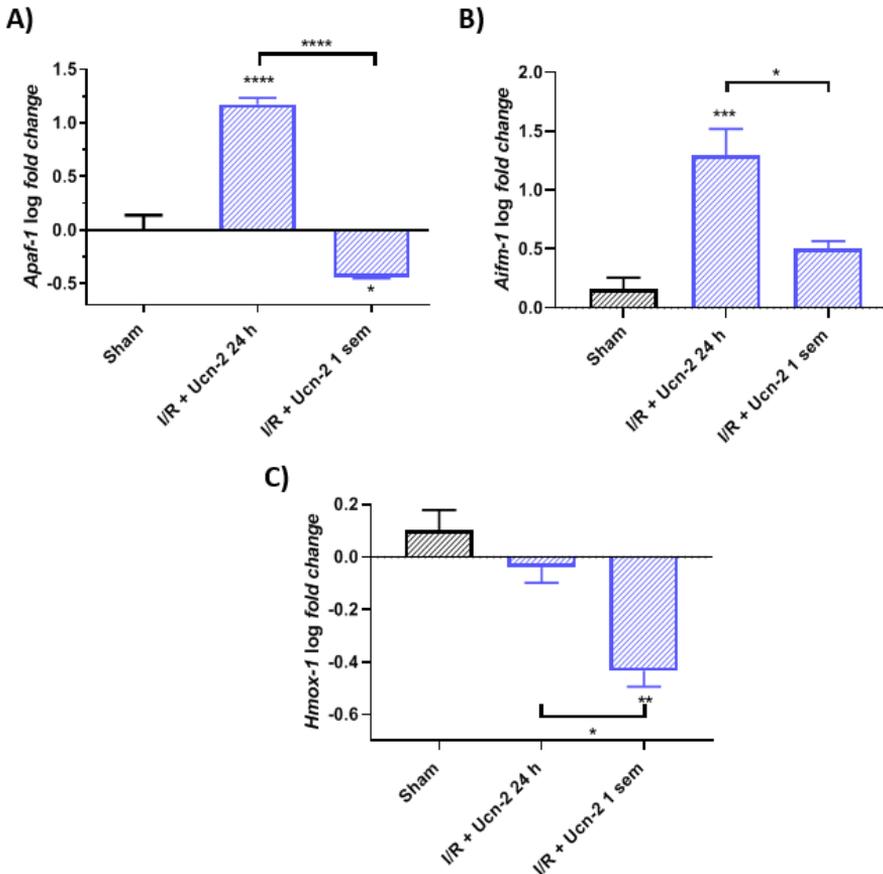


Figura 45. Efecto de la Ucn-2 sobre los genes apoptóticos en la zona de riesgo del modelo animal de I/R a 24 h y 1 semana. A-C) Gráficos de barras muestran cambios en la expresión de los genes apoptóticos (*Apaf-1*, *Aifm-1* y *HmoX-1*) en Sham e I/R + Ucn-2 a las 24 h y 1 semana post-I/R. Los datos se presentan como media \pm SEM ($n = 4$). “*”, “***”, “****” y “*****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

Ante estos resultados, y a pesar de que la tesis doctoral está centrada en todo momento en la zona de riesgo, se decidió analizar la zona más alejada del infarto, la zona denominada remota, para comprobar si la regulación positiva de los genes apoptóticos que ejercía la Ucn-2 en la zona de riesgo pudiera ser un mecanismo

de defensa, apostando por una muerte apoptótica frente a la necrosis. Así, vimos cómo en la zona remota a las 24 h la Ucn-2 no aumentaba la expresión de estos genes, sino que incluso en el caso de *Aifm-1* y *Hmox-1* la disminuía (Figura 46).

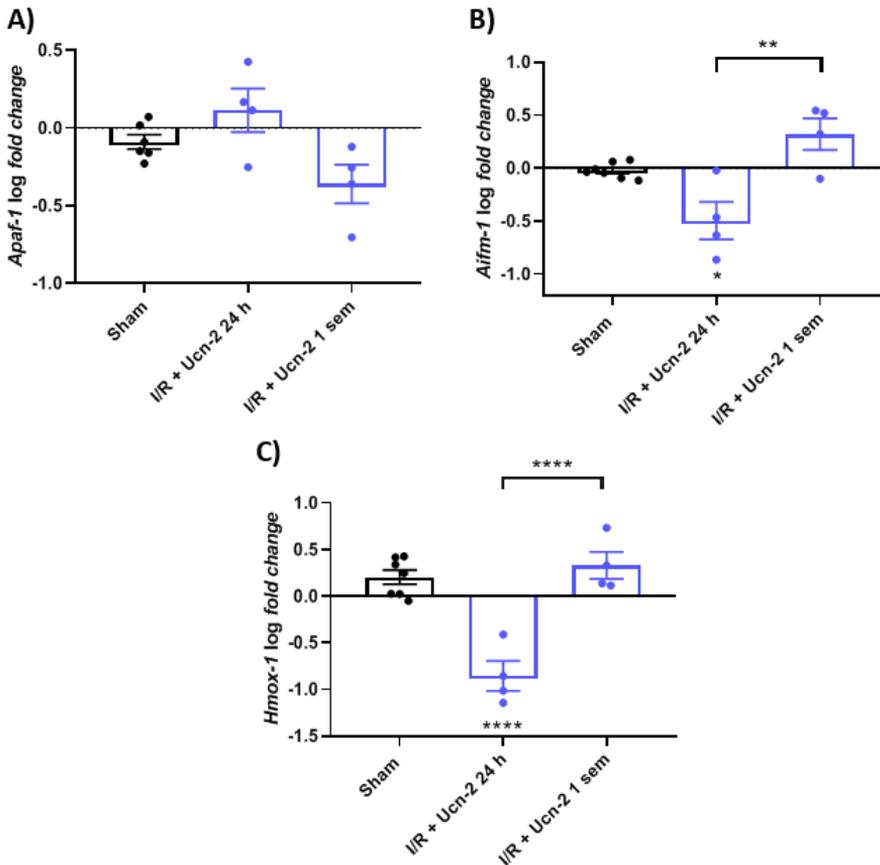


Figura 46. Efecto de la Ucn-2 sobre los genes apoptóticos en la zona remota del modelo animal de I/R a 24h y 1 semana. A-C) Gráficos de barras muestran cambios en la expresión de los genes apoptóticos (*Apaf-1*, *Aifm-1* y *Hmox-1*) en Sham e I/R + Ucn-2 a las 24 h y 1 semana post-I/R. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 4). “***” y “*****” indican significancia de $p < 0,01$ y $p < 0,0001$ respectivamente.

Por último, se estudió la expresión de estos genes de apoptosis en ventrículo izquierdo de pacientes con IC y se observó que sólo *Hmox-1* estaba sobrexpresado. Además, existía una correlación negativa entre la FEVI y la expresión de *Hmox-1*, proponiéndose como un posible mecanismo de defensa frente al daño al ser un gen anti-apoptótico aumentado con FEVI baja (Figura 47).

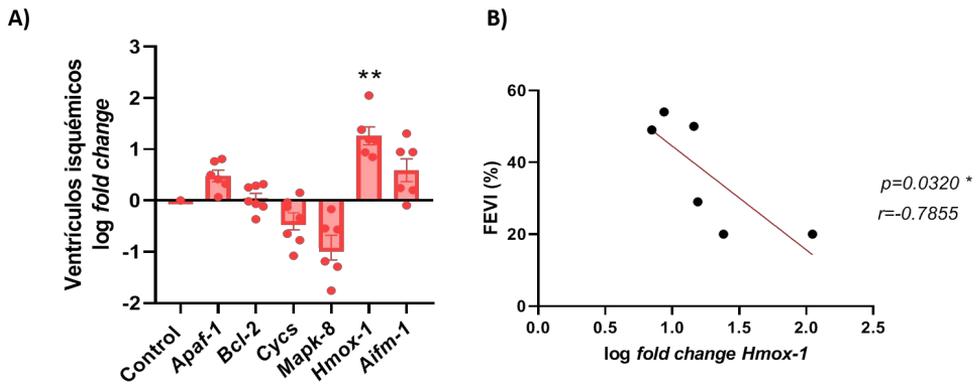


Figura 47. Expresión de genes apoptóticos en pacientes con IC de origen isquémico. **A)** Gráfico de barras que representa la expresión de genes de apoptosis del ventrículo de pacientes con IC en comparación con el ventrículo sano del control. **B)** Correlación de Pearson entre FEVI (%) y log fold change de *Hmox-1*. Los datos se presentan como media \pm SEM (n = 7). “**” indica significancia de $p < 0,01$.

En resumen, este segundo apartado nos mostró cómo la infusión de Ucn-2 inhibió la regulación al alza de seis miRNAs, asociados con IAM. El análisis *in silico* sugirió que el miR-29a y miR-451_1* eran los que podían regular más genes apoptóticos y fibróticos. A continuación, la transfección de NRVM con *mimics* nos proporcionó la información de que el miR-29a, pero no el miR-451_1*, prevenía los cambios inducidos por I/R de genes pro y antiapoptóticos como *Apaf-1*, *Hmox-1* y *Cyts*; así como genes fibróticos como *Col-I* y *Col-III*. Además, de los genes apoptóticos que se estaban analizando, *Hmox-1* también aparecía desregulado en muestras de ventrículo humano. Curiosamente, se observó una correlación negativa significativa entre *Hmox-1* y la FE del ventrículo izquierdo en pacientes con IC de origen isquémico. En conjunto, estos datos indican que Ucn-2 proporciona efectos cardioprotectores de larga duración, que implican la regulación post-transcripcional de genes apoptóticos y fibróticos a través de miR-29a.

3. LA UCN-2 MEJORA LA HOMEOSTASIS DEL Ca²⁺ EN LA PATOLOGÍA DE I/R

Generalmente, la insuficiencia cardíaca se caracteriza a nivel molecular por disfunción y anomalías en el manejo de [Ca²⁺]; con una significativa alteración en el acoplamiento de excitación-contracción (Gómez *et al.*, 1997; Lehnart, Maier and Hasenfuss, 2009). La disfunción observada en pacientes con insuficiencia cardíaca está relacionada con la alteración sufrida en la expresión y la actividad de proteínas que regulan el movimiento y la concentración de Ca²⁺ intracelular (Kho, Lee and Hajjar, 2012). De hecho, nuestro grupo de investigación demostró previamente que diferentes canales catiónicos de Ca²⁺ podían contribuir en miocardiopatías, fibrosis cardíaca y remodelado cardiaco (Smani *et al.*, 2015). Por eso, otro de los objetivos de esta tesis doctoral fue estudiar los canales de Ca²⁺ tipo SOCC que participan en SOCE en el modelo de I/R, así como el efecto que podría tener la Ucn-2 sobre esta vía.

3.1. LA UCN-2 REGULA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA HOMEOSTASIS DEL Ca²⁺

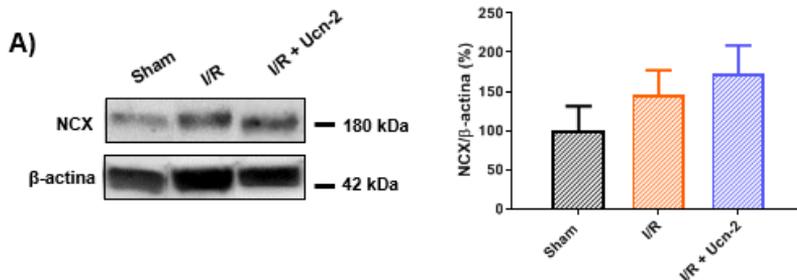
Para determinar los protagonistas moleculares que durante I/R participan en la homeostasis del Ca²⁺, se realizó un *microarray* para evaluar la expresión de 45 genes relacionados con la homeostasis de Ca²⁺ en zonas de riesgo. La Tabla 17 muestra que 14 de los genes examinados estaban significativamente incrementados en la zona de riesgo en comparación con Sham. Curiosamente, la mayoría de los genes regulados al alza pertenecían a la familia TRPC (*Trpc1/3/5/6*) y a los canales tipo SOCC (*Orai1/2* y *Stim1/2*).

	<i>Fold change</i>	<i>p</i> -valor
<i>Serca1</i>	1.28 ± 0.13	0.179
<i>Cacna1c</i>	1.39 ± 0.18	0.079
<i>Orai1</i>	1.45 ± 0.11	0.002
<i>Rapgef</i>	1.47 ± 0.16	0.002
<i>Trpc1</i>	1.57 ± 0.11	0.002
<i>Hcn4</i>	1.71 ± 0.36	0.033
<i>Trpc5</i>	1.71 ± 0.56	0.172

<i>Trpc3</i>	1.78 ± 0.21	0.001
<i>Slc8a1</i>	1.83 ± 0.18	0.001
<i>Trpc4</i>	2.08 ± 0.2	0.008
<i>Stim1</i>	2.15 ± 0.27	0.001
<i>Stim2</i>	2.38 ± 0.3	0.001
<i>Trpc6</i>	3.89 ± 0.88	0.001
<i>Orai2</i>	4.07 ± 1.35	0.001

Tabla 17. Microarray de genes relacionados con la homeostasis del Ca²⁺. El *microarray* se realizó en ratas Sham y ratas operadas de I/R a una semana. Los datos se presentan como media ± SEM (n = 4). *p*-valor significativo cuando *p*<0,05. *Cacna1c*, Calcium Voltage-gated Channel subunit alpha1 C; *Hcn4*, Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated potassium channel 4 (Ifunny); *Rapgef3*, Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 3 (*Epac*); *Serca1*, Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium; *Slc8a1*, Solute Carrier Family 8 Member A1 (intercambiador de Na⁺/Ca²⁺); *Stim1/2*, Stromal Interaction Molecule 1/2; *Trpc1/3/5/6*, Transient receptor potential 1/3/5/6.

Se validó la expresión de estos genes y se decidió estudiar cómo la Ucn-2 podía regularlos en el modelo de rata de I/R a 1 semana. La Figura 48 confirma que tanto EPAC, Orai1 y TRPC5 estaban elevados en I/R a nivel de proteína. Sin embargo, sólo la expresión de Orai1 y TRPC5 fue inhibida por la Ucn-2. Estos datos indicaron que Ucn-2 evitaría alteraciones en la expresión de estas proteínas involucradas en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺ tras I/R pudiendo desempeñar un papel significativo en el corazón. Por el contrario, NCX, STIM1 y TRPC6 no estuvieron aumentados significativamente en I/R ni afectados su expresión con el tratamiento de Ucn-2.



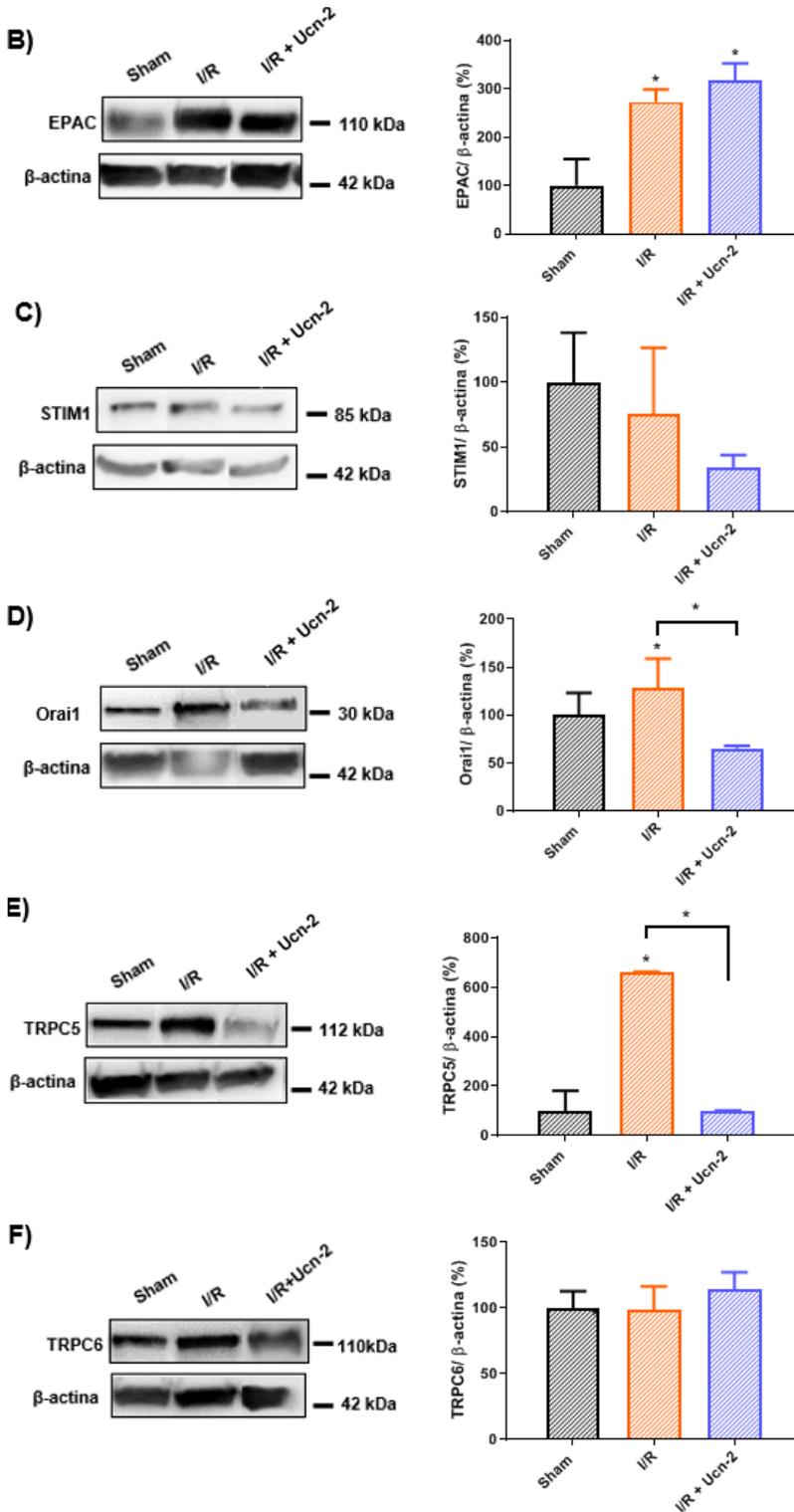


Figura 48. La Ucn-2 regula la expresión de Orai1 y TRPC5 tras I/R a 1 semana. A-F) Imágenes representativas de WB y gráficos de barras que muestran la expresión de NCX, EPAC, STIM1, Orai1, TRPC5 y TRPC6 normalizados con la expresión de β -actina, en Sham, I/R e I/R + Ucn-2 a 1 semana post-I/R. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 4-6). “*” indicia significancia de $p < 0,05$.

3.2. LA UCN-2 DISMINUYE LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}

Teniendo en cuenta los datos anteriores que demostraron que I/R promovía la alteración de varios canales catiónicos relacionados con la vía SOCE, se examinó si I/R estimulaba SOCE y si la Ucn-2 la regulaba. Se usó un protocolo clásico para la activación de los SOCC con tapsigargina (TG, 2 mM), que es un inhibidor de la proteína del SERCA en presencia de nifedipina (NIF, 10 mM), que es un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L. Gracias a la combinación de estas drogas se asumió que el aumento de Ca^{2+} intracelular que se observaba era debido a la entrada por los SOCC.

Cuando los NRVM fueron sometidos al protocolo *in vitro* de I/R, se observó que en I/R los niveles del Ca^{2+} eran altos y que con el tratamiento de la Ucn-2 post-I/R el incremento de SOCE disminuía a valores cercanos a control (Figura 49). Para comprobar que el efecto que se veía era de la Ucn-2, se administró astresina (1 mM), inhibidor específico del CRF-R2, en presencia de Ucn-2 y observamos que el Ca^{2+} no disminuía. Así se confirmó que la I/R potenciaba SOCE, y que la Ucn-2 inhibía esta entrada.

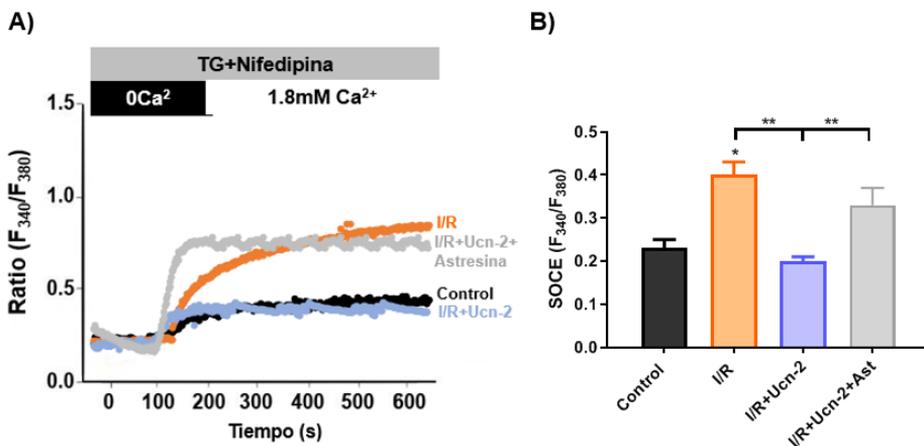


Figura 49. Urocortina-2 inhibe la SOCE exacerbada inducida por I/R en NRVM.

A) Trazos representativos que muestran los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en los NRVM cargados con FURA-2AM, presentados como relación F_{340}/F_{380} en situación control (negro), I/R (naranja), I/R+Ucn-2 (azul), e I/R+Ucn-2+ astresina (gris). **B)** Gráfico de barras de las variaciones del $[Ca^{2+}]_i$. Se aplicó taspigargina (TG, 2 μ M) y nifedipina (1 μ M) al inicio sin Ca^{2+} extracelular y al final añadiéndoselo (2,5 mM). Los datos se representan como media \pm SEM (n = 100-250 células). “**” indican significancia de $p < 0,01$ respectivamente.

3.3. LA UCN-2 AFECTA LA EXPRESIÓN DE Orai1 Y TRPC5

Basándose en los datos previos del modelo animal de I/R, dónde se observaban cambios significativos en la expresión de Orai1 y TRPC5, se evaluó si ocurría lo mismo en NVRM. En primer lugar, la Figura 50 muestra que I/R aumentó la expresión de Orai1 y TRPC5 en NRVM al igual que pasaba en cardiomiocitos adultos. Así mismo, es importante destacar que el tratamiento de las células con Ucn-2 (10 nM) inhibió la sobreexpresión de Orai1 y TRPC5 evocada por I/R. Por el contrario, el pretratamiento de las células con astresina (1 μ M) bloqueó el efecto de la Ucn-2 sobre estas dos proteínas.

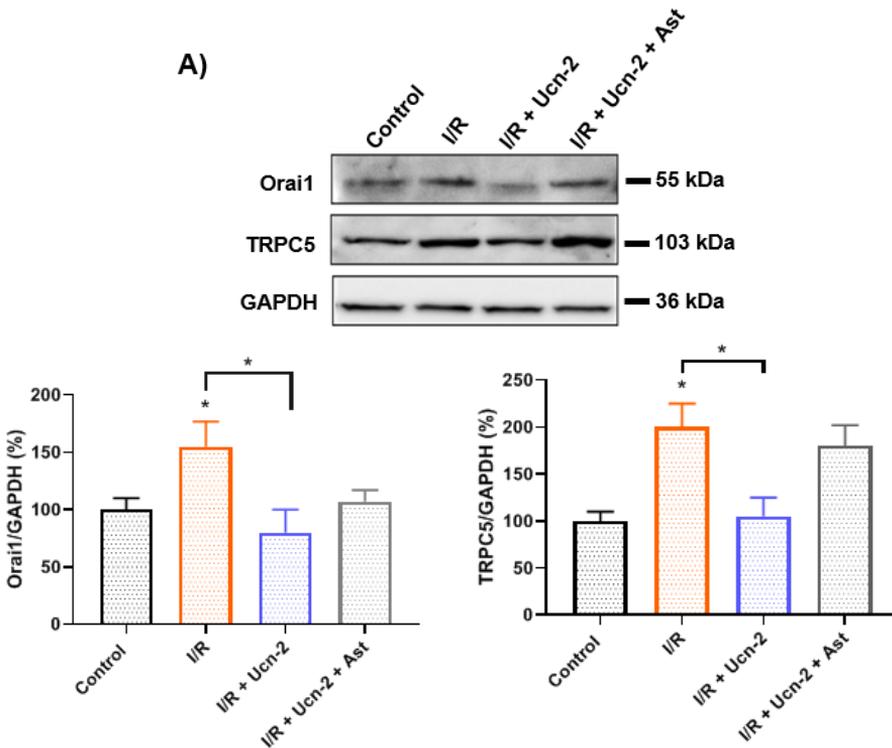
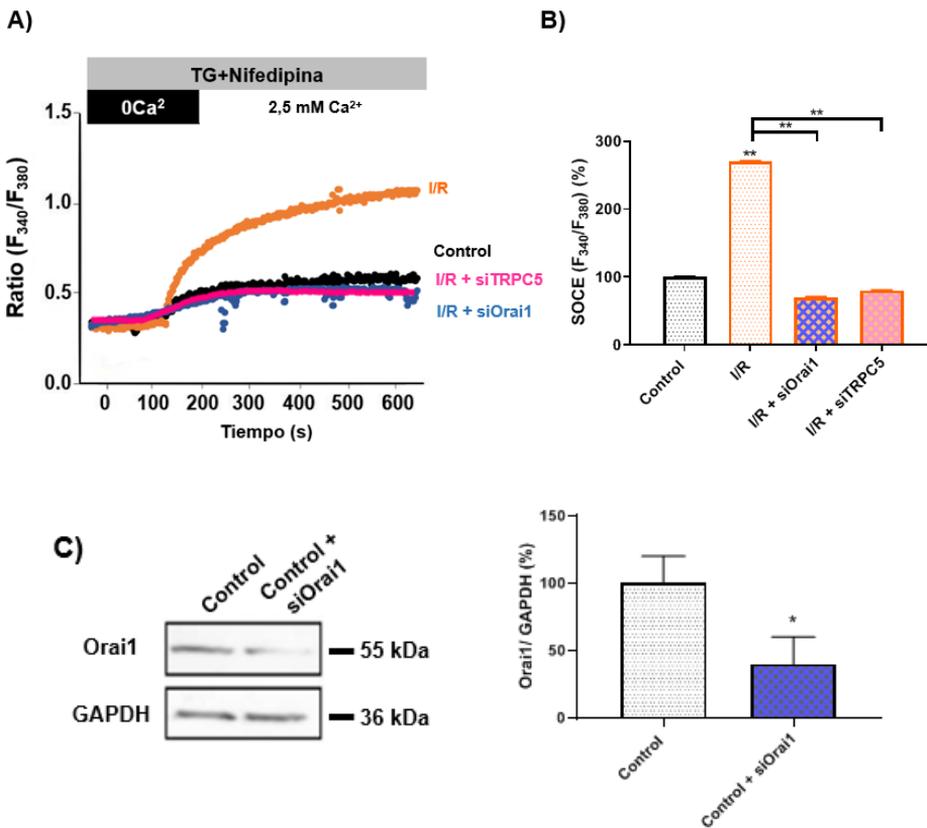


Figura 50. Ucn-2 disminuye la expresión exacerbada de *Orai1* y TRPC5 en I/R en NRVM. Imágenes de WB y gráficos de barras que representan la expresión de *Orai1* y TRPC5 en control, I/R, I/R + Ucn-2 e I/R + Ucn-2 + astresina, en NRVM. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 4-6). “*” indica significancia de $p < 0,05$.

En segundo lugar, se estudió la SOCE en NRVM transfectados con siARNs para *Orai1* y *Trpc5*. Las Figuras 51A-B, muestran que el Ca^{2+} inducido por la I/R se inhibió completamente cuando los genes *Orai1* y *Trpc5* fueron silenciados, lo que confirmaba su posible implicación en la SOCE inducida por I/R. Curiosamente, el efecto de la Ucn-2 observado anteriormente y el silenciamiento de estas proteínas fue muy similar. Las Figuras 51C-D confirmaron que *Orai1* y *Trpc5* estaban silenciados correctamente.



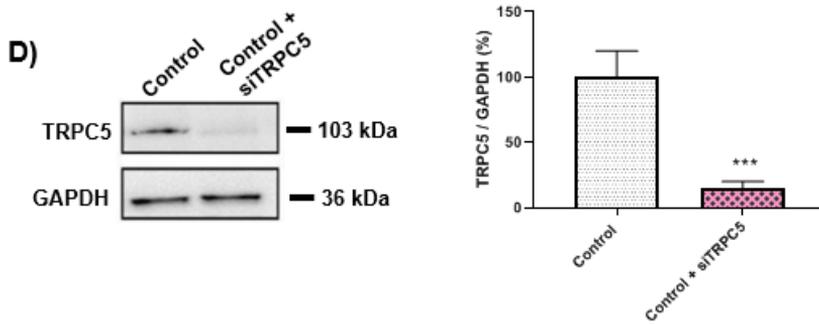
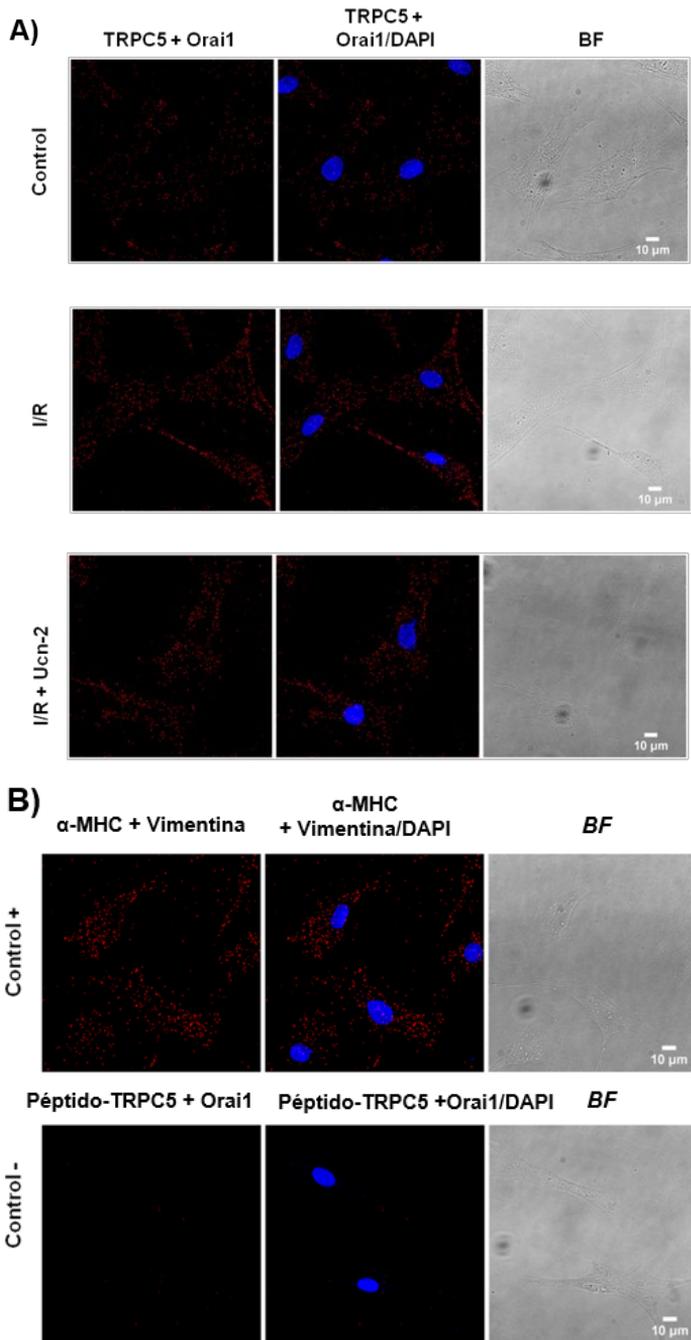


Figura 51. Orai1 y TRPC5 participan en el incremento de SOCE en I/R. **A)** Trazos representativos que muestran los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en los NRVM cargados con FURA-2AM, presentados como relación (F_{340}/F_{380}) en situación control (negro), I/R (naranja), transfectados en I/R con siOrai1 (azul) y siTRPC5 (rosa). **B)** Gráfico de barras de las variaciones del $[Ca^{2+}]_i$. Se aplicó tapsigargina (TG, 2 μ M) y nifedipina (1 μ M) al inicio sin Ca^{2+} extracelular y al final añadiéndoselo (2,5 mM). **C, D)** Imágenes de WB y gráficos de barras muestran el efecto del silenciamiento de *Orai1* y *Trpc5*. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 100-250 células). “*”, “***”, “****” indican significancia de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente.

En consecuencia, se estudió si Orai1 y TRPC5 co-localizaban e interactuaban en el interior celular mediante el uso de la técnica *in situ* PLA. La Figura 52A muestra que en situación control se observó presencia de puntos rojos indicando que Orai1 y TRPC5 estaban próximos. Sin embargo, el número de puntos rojos aumentó significativamente bajo I/R, lo que sugiere un aumento de interacción Orai1-TRPC5. Por el contrario, cuando las células fueron tratadas con Ucn-2 durante I/R esa interacción se vio disminuida de una manera significativa. A continuación, se muestran los controles (Figura 52B). El control positivo utiliza dos proteínas de citoesqueleto, la α cadena pesada de miosina (MHC, *Myosin Heavy Chain*) y la vimentina. Y el control negativo el péptido de TRPC5 + anticuerpo de Orai1.

En conjunto, estos datos sugirieron que Orai1 y TRPC5 interactuaban en condiciones basales pero que aumentaban su interacción bajo el proceso de I/R, que sin duda promoverá la entrada de Ca^{2+} pudiéndose relacionar con la señalización anormal de Ca^{2+} en corazón reperfundido. Además, estos datos muestran que Ucn-2 de manera eficiente inhibió SOCE a través de la regulación a la baja de Orai1 y TRPC5 así como su interacción en situación I/R (Figura 52C).



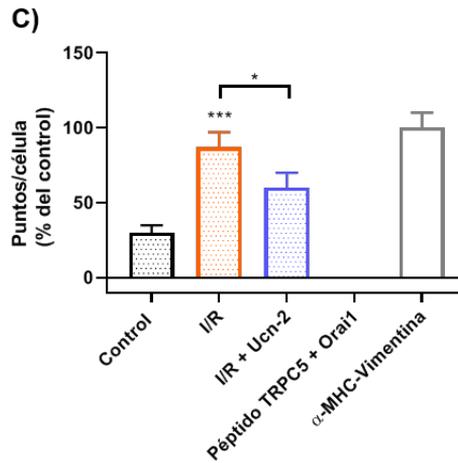


Figura 52. I/R aumenta la co-localización de Orai1 y TRPC5 en NRVM. **A)** Imágenes representativas de NRVM control, I/R e I/R + Ucn-2, incubadas con anticuerpos primarios contra Orai1 y TRPC5 conjugados con las sondas de ensayo de ligadura de proximidad (PLA) apropiadas. Los puntos rojos indican que las proteínas están a menos de 40 nm de distancia. **B)** Imágenes de NRVM incubadas α -cadena pesada de miosina (MHC, *Myosin, High Chain*) y vimentina que co-localizan (control positivo), así como con péptido de TRPC5 y anticuerpo primario de anti-Orai1 (control negativo). **C)** Gráfico de barras que resume el número medio de puntos de PLA en diferentes grupos experimentales. Los datos se presentan como \pm SEM normalizada al control positivo determinado por la co-localización de vimentina y α -MHC ($n = 3$ cultivos). “*” y “***” indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,001$. *BF*, *bright field* (campo claro).

En este tercer apartado, nuestros hallazgos destacaron nuevos aspectos inesperados del papel de Ucn-2 en la protección cardíaca. La Ucn-2 modulaba la $[Ca^{2+}]_i$, inhibía SOCE dependiente de la expresión y co-localización de Orai1 y TRPC5.

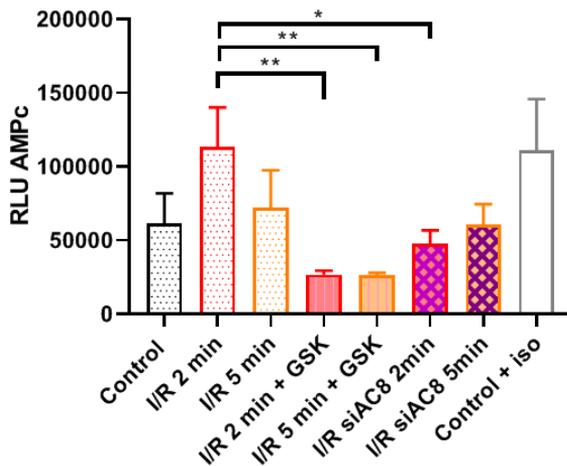
4. ELEMENTOS DE REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Estudiando los canales tipo SOCC y su importancia en la patología de I/R, se quiso investigar sobre los posibles reguladores transcripcionales de estos canales. Clásicamente, NFAT ha sido el factor de transcripción más ampliamente descrito

en la patología cardiovascular. Sin embargo, en esta tesis doctoral se quiso buscar nuevas dianas. Por eso, nos centramos en el factor de transcripción CREB, ya que previamente el grupo había demostrado el papel de SOCC en la activación de CREB en células musculares lisas. CREB (por sus siglas en inglés de *cAMP response element-binding*) es un modulador de la expresión génica, que como su propio nombre indica, se activa en respuesta al AMPc. La cascada de señalización comienza con la activación de las adenilato ciclasas (AC) que pasan el ADP a AMPc y éste activa la Proteína Kinasa A (PKA) que activa pCREB.

Como otros autores ya habían descrito que el Ca^{2+} que permeaba a través de Orai1 podía activar a la adenilato ciclasa 8 (AC8) que estaría implicada en la inactivación de Orai1 (Zhang *et al.*, 2019), nosotros planteábamos la siguiente hipótesis: ¿Puede ser posible que la entrada de Ca^{2+} dependiente de Orai1 sea la responsable de activar CREB a través de AC8 en I/R?

Lo primero que se hizo fue determinar los niveles de AMPc en NRVM tras I/R a 2 min, 5 min con o sin tratamiento con GSK (inhibidor de Orai1) y silenciamiento de la AC8. En la Figura 53A vemos cómo los niveles de AMPc estaban elevados a 2 min post-I/R y que disminuyen cuando se utiliza GSK o se silencia AC8. El silenciamiento de la AC8 se llevó a cabo correctamente (Figura 53B). Como control positivo se usó isoproterenol que activa el AMPc a través de receptores β -adrenérgicos. A los 5 min no observamos incremento significativo de los niveles de AMPc tras I/R. Por otra parte, observamos que la AC8 estaba sobrepresada 1 semana después de I/R (Figura 53C).



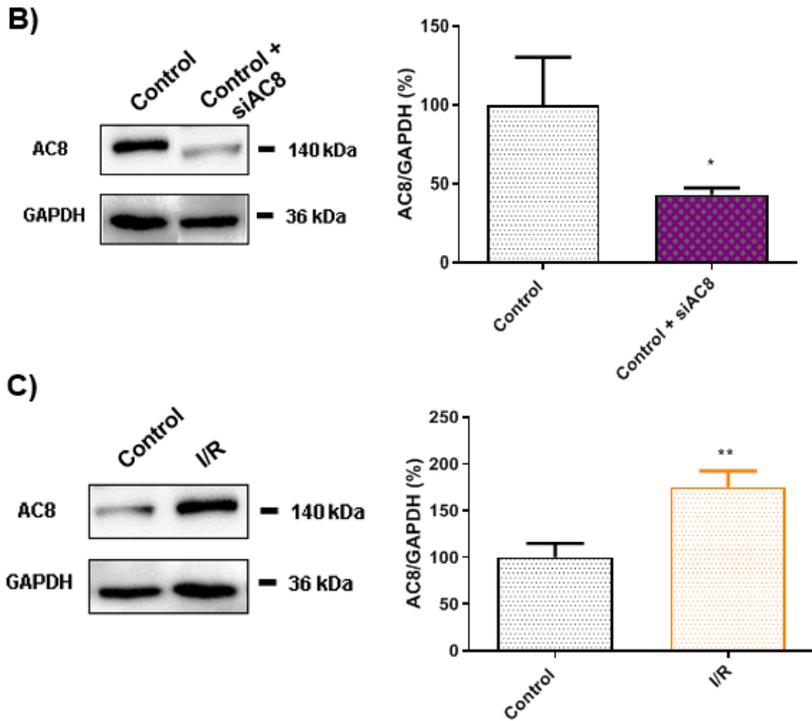


Figura 53. La AC8 eleva los niveles de AMPc tras la reperusión y aparece aumentada en NRVM tras I/R. **A)** Estudio por ELISA *cAMP-Glo™* a 2 y 5 min post-IR, I/R + GSK e I/R + siAC8, así como con isoproterenol de control positivo. **B)** Imágenes de WB y gráfico de barras que representan el efecto del silenciamiento de la *Ac8* en NRVM. **C)** Imágenes de WB y gráfico de barras que representan la expresión de AC8 en control e I/R en NRVM. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 4-6$). “*” y “**” indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente.

A continuación, estudiamos la activación de CREB en NRVM en condiciones de I/R. En la Figura 54A observamos una fosforilación significativa de CREB 5 min después de I/R, y cómo decrecía con el tiempo. Además, y muy importante, observamos que el silenciamiento de *Ac8* previene la activación de CREB por I/R (Figura 54B).

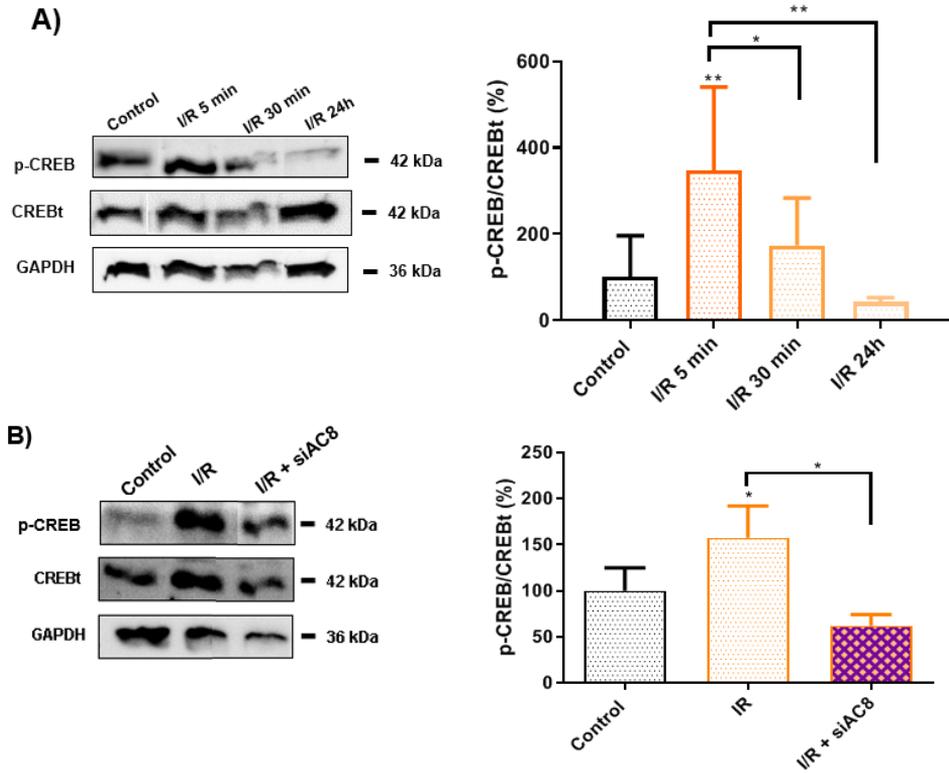


Figura 54. pCREB es activado por I/R y dependiente de AC8 en NRVM. **A)** Imágenes de WB y gráfico de barras que representan la activación de CREB a los 5 min, 30 min y 24 h después de I/R en NRVM. **B)** Imágenes de WB y gráfico de barras que representan la expresión de p-CREB en control, I/R, I/R + siAC8 en NRVM. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 4-6). “*” y “**” indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Posteriormente, se estudió la SOCE en NRVM transfectados con siARNs para *Ac8* y *Creb*. Las Figuras 55A-B, muestran que el Ca^{2+} inducido por la taspigargina en situación de I/R disminuyó cuando ambas proteínas fueron silenciadas. La Figura 55C confirma el silenciamiento de *Creb*.

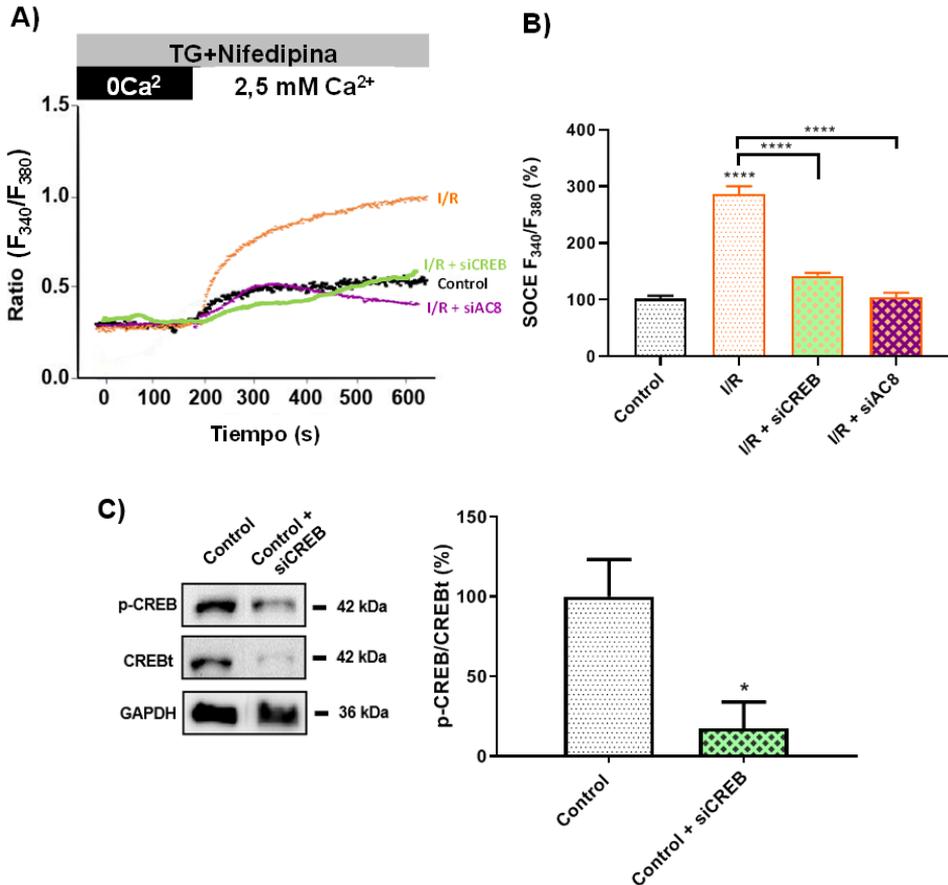


Figura 55. El silenciamiento de *Ac8* y *Creb* disminuye la SOCE exacerbada de I/R en NRVM. **A)** Trazos representativos que muestran los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en los NRVM cargados con FURA-2AM, presentados como relación (F_{340}/F_{380}) en situación control (negro), I/R (naranja), transfectedos en I/R con siAC8 (morado) y siCREB (verde). **B)** Gráfico de barras de las variaciones del $[Ca^{2+}]_i$. Se aplicó tapsigargina (TG, 2 μM) y nifedipina (1 μM) al inicio sin Ca^{2+} extracelular y al final añadiéndoselo (2,5 mM). **C)** Imágenes de WB y gráfico de barras que representan el silenciamiento de *Creb*. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 100-250$ células, $n = 4-6$). "*" y "****" indican significancia de $p < 0,05$, y $p < 0,0001$ respectivamente.

Al ver que la $[Ca^{2+}]_i$ en I/R se veía afectada con el silenciamiento de *Creb* se planteó la hipótesis de que CREB podría regular la expresión de los SOCC. Se comprobó que siCREB disminuyó la expresión de Orai1 y de TRPC5 (Figura 56), indicando que la activación de CREB podría participar en la transcripción de los genes *Orai1* y *Trpc5* y por ende en la SOCE.

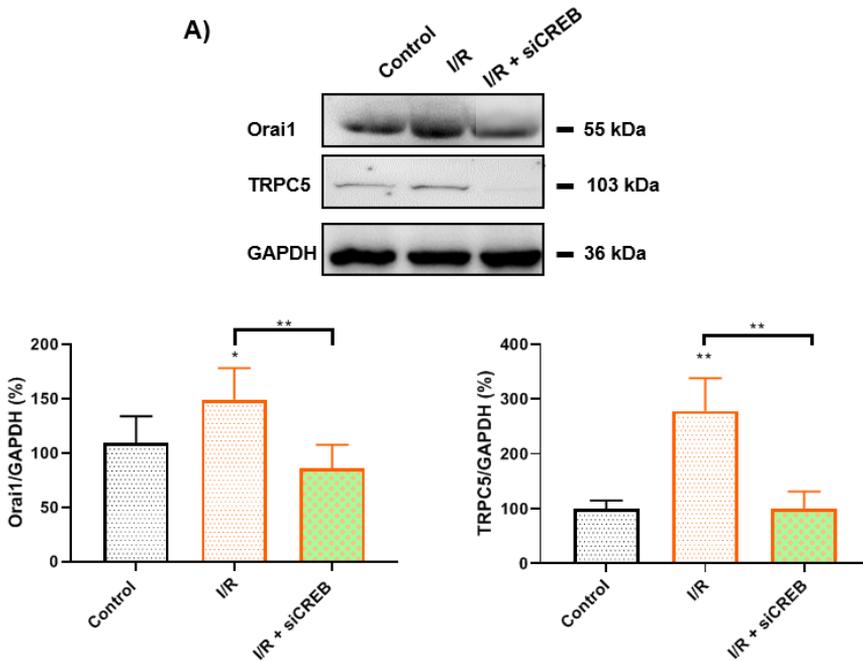


Figura 56. Orai1 y TRPC5 ven afectada su expresión cuando se silencia *Creb* en I/R en NRVM. A) Imágenes de WB y gráficos de barras que representan la expresión de Orai1 y TRPC5 en control, I/R e I/R + siCREB. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 4-6). “*”, “**” indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Como la activación de CREB era dependiente de Ca^{2+} , se decidió comprobar si silenciando *Orai1* y *Trpc5*, su activación se veía afectada. Como se muestra en la Figura 57 la inhibición de Orai1 y TRPC5 frenó la activación de CREB por I/R.

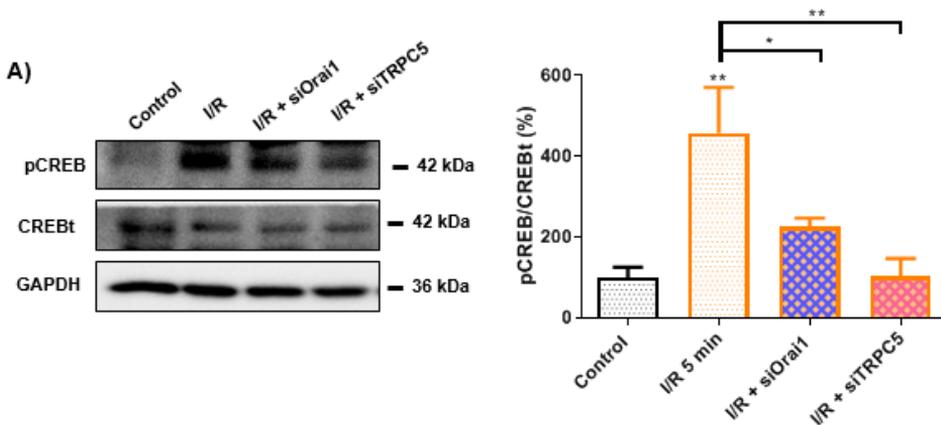


Figura 57. El silenciamiento de *Orai1* y *Trpc5* afecta a la activación de pCREB 5 min post-I/R en NRVM. A) Imágenes de WB y gráfico de barras que representan la expresión de pCREB normalizado a CREBt en control, I/R 5 min, I/R + siOrai1 e I/R + siTRPC5. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 4) “*”, “***” indican significancia de $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente.

Por último, se miró la expresión de AC8 y Orai1 en muestras de ventrículo de pacientes con IC de origen isquémico y se observó que existía un aumento de expresión con respecto a una muestra control de ventrículo sano (Figura 58).

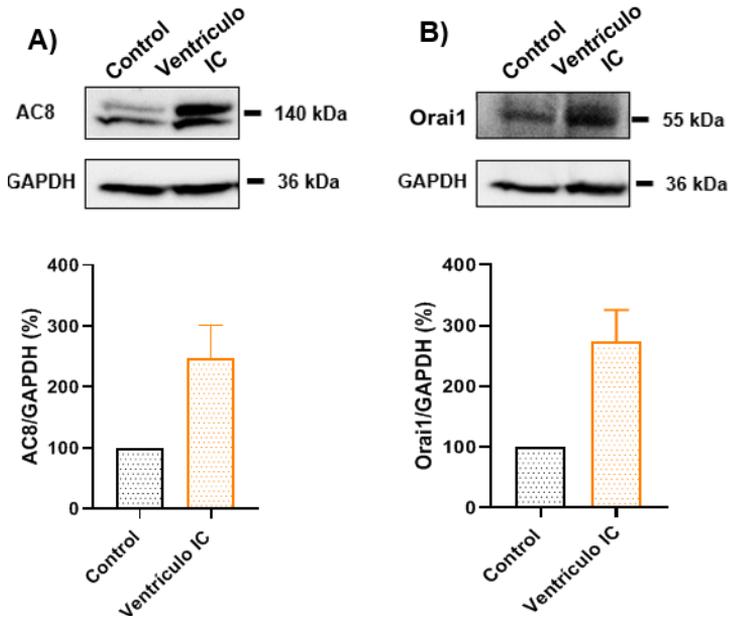


Figura 58. Sobreexpresión de AC8 y Orai1 en muestras de ventrículo de pacientes con IC de origen isquémico. Imágenes de WB y gráfico de barras que representan la expresión de AC8 (A) y Orai1 (B) en muestras de ventrículo de pacientes con IC comparadas con una muestra control de ventrículo sano. Los datos se representan como media \pm SEM (n = 7).

Tomando en consideración los resultados encontrados, nuestros datos indican que la entrada de Ca^{2+} exagerada que ocurre a través de la subunidad de Orai1 durante I/R desencadena la activación aguas abajo de la proteína AC8 y del factor de transcripción CREB, el cual podría estar participando a su vez en la expresión de los canales SOCC, Orai1 y TRPC5. Todo ello estaría estableciendo un lazo de retroalimentación positiva. Estos datos fueron confirmados en muestras de ventrículo de pacientes isquémicos con IC quedando pendiente estudiar el papel regulador que podría tener la Ucn-2 sobre CREB.



DISCUSIÓN

1. ESTRATEGIAS DE CARDIOPROTECCIÓN: LA UCN-2 COMO PÉPTIDO PROTECTOR

En los últimos 20 años, la cardiopatía isquémica ha sido responsable del 16 % de las muertes a nivel mundial, cuadruplicando su cifra de 2 millones de defunciones a casi 9 millones según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Virani *et al.*, 2020).

A lo largo de los años el avance en la medicina y en la ciencia ha hecho que el número de muertes por IAM en nuestro país descendiera de casi 22 mil personas al año a cerca de 14 mil (Díaz, 2020). Existe una estrecha relación entre la eficacia clínica de la reperfusión y el tiempo transcurrido desde la oclusión coronaria. Durante las primeras 12 h de un IAM el porcentaje de miocardio isquémico recuperable se reduce de forma progresiva (Arós, 2000). La rápida restauración del flujo sanguíneo reduce el tamaño del infarto y a día de hoy es la única alternativa posible para rescatar las células isquémicas de una muerte segura. Sin embargo, paradójicamente esa restauración del flujo puede dañar a aquellos cardiomiocitos más vulnerables desencadenando procesos celulares adversos y la muerte celular. Por ello y a pesar del avance de los tratamientos para el IAM, como la revascularización o tratamientos fibrinolíticos, sigue siendo un reto la búsqueda de nuevos fármacos cardioprotectores. Gracias a las clásicas estrategias de pre- y post-condicionamiento descritas por Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M, que habían demostrado proteger al corazón del daño, diferentes autores comenzaron a estudiar cómo inhibir moléculas perjudiciales liberadas o potenciar mecanismos beneficiosos que sucedían en el condicionamiento isquémico (Heusch, 2015; Hausenloy and Yellon, 2016). Algunos ejemplos son el uso de la adenosina, péptido natriurético, ciclosporina A o la inhibición de la NO sintetasa (Minamino, 2012; Lasukova *et al.*, 2019).

Al final del siglo pasado, varios trabajos se centraron en el papel de las proteínas de estrés asociadas con la familia de corticotropinas en la respuesta del corazón al infarto (Okosi *et al.*, 1998; Brar *et al.*, 1999). A pesar de que en un principio se pensaba que la Ucn-2 era liberada por el sistema nervioso central, en la actualidad se sabe que es liberada directamente por el corazón después de un daño isquémico (Cserepes *et al.*, 2007). Uno de los primeros trabajos que sugirió

la liberación de Ucn-2 tras IAM por el corazón (Knight *et al.*, 2008) fue retirado por manipulación de los datos por los autores.

Nuestros resultados mostraron cómo en el modelo animal de I/R los niveles de Ucn-2 en sangre estaban aumentados significativamente a 1 semana después de la cirugía y cómo esos niveles disminuían a valores cercanos a control a las 6 semanas. Del mismo modo, cuando se analizó la expresión de su receptor, CRF-R2, en tejido miocárdico del mismo modelo, se observó un aumento a la semana después de la intervención quirúrgica, que se revertía a las 6 semanas del proceso isquémico. Nuestros datos sugirieron que frente a un estrés agudo de I/R, sucedía un aumento significativo de Ucn-2 y su diana, posiblemente para aumentar el efecto de su vía de señalización y así potenciar su respuesta a los daños por I/R.

Con el paso de los años han aumentado el número de publicaciones donde se evalúa el efecto de la Ucn-2 estudiando la FE y FA en modelos de animales *in vivo* cuando se trata de patologías cardíacas. Por ejemplo, se ha descrito cómo la Ucn-2 mejora la función cardíaca en modelo de ratón de edad avanzada e incluso en ratones sometidos a una dieta poco cardiosaludable (Kim *et al.*, 2019; Giamouridis *et al.*, 2020). Sin embargo, siguen siendo muy escasos los estudios donde se evalúan la recuperación de la contractilidad cardíaca en el modelo de I/R, posiblemente por la complejidad del modelo. Hay otros autores que han descrito efectos beneficiosos de la Ucn-2 en infarto miocárdico (Topal *et al.*, 2012; Ellmers *et al.*, 2015). Nuestros resultados mostraron la recuperación de la contractilidad a la semana de la I/R cuando las ratas fueron tratadas con Ucn-2 5 min antes de revascularización. Además, observamos que la Ucn-2 disminuía significativamente el tamaño de infarto, resultados que sí comparten más estudios en el modelo de rata de I/R (Scarabelli *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005).

Una gran novedad de este trabajo ha sido el papel que juega la Ucn-2 en la fibrosis cardíaca. La fibrosis cardíaca se caracteriza por la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en el intersticio cardíaco como mecanismo reparativo que acaba contribuyendo a una disfunción sistólica y diastólica. En este trabajo hemos visto por resonancia magnética cómo la Ucn-2 previene la fibrosis del tejido miocárdico una semana después de la I/R. Es más, completamos el estudio valorando proteínas pro-fibróticas clásicas como los Col I, Col III y los Tgf- β s. La expresión de estas 4 proteínas se veía aumentada en cardiomiocitos

del modelo de I/R a la semana y la Ucn-2 lo revertía por completo. Es bien conocido que los miofibroblastos son los principales responsables de la fibrosis cardíaca, sin embargo existe un amplio abanico de células que participan en como los monocitos/macrófagos, linfocitos, mastocitos, células vasculares o cardiomiocitos que también pueden contribuir a la respuesta fibrótica secretando mediadores fibrogénicos clave como los factores de crecimiento Tgf- β s o el PDGF (Kong, Christia and Frangogiannis, 2014).

Conjunto a la fibrosis, otra de las respuestas reparadoras al daño miocárdico es el desarrollo de hipertrofia cardíaca. En el corazón adulto, en lugar de un aumento en el número de cardiomiocitos, se produce un aumento de tamaño y el corazón desarrolla hipertrofia para reducir el estrés de la pared ventricular y mantener la función y la eficiencia en respuesta a una mayor carga de trabajo. Aunque la hipertrofia se desarrolla inicialmente como una respuesta adaptativa generalmente progresa hacia una hipertrofia patológica (Nakamura and Sadoshima, 2018). En contra de lo observado con la fibrosis, la Ucn-2 no inhibió la hipertrofia cardíaca inducida por la I/R. Nuestra observación coincide con otros informes que describieron efectos pro-hipertroficados de los péptidos de Ucn (Chanalaris *et al.*, 2003). De hecho, se ha descrito que las isoformas de Ucn estimulan varios marcadores de hipertrofia como la MHC- β , así como los péptidos natriuréticos auricular y tipo B (Ikeda *et al.*, 1998). Sin embargo, otros datos sugieren una acción antihipertrófica de la infusión crónica de Ucn-2 en modelo de ratas hipertensas (Dieterle *et al.*, 2009) o en modelo de infarto en ratón (Ellmers *et al.*, 2015). Quizás, la Ucn-2 conservó la hipertrofia cardíaca para mantener su efecto compensatorio al menos en la etapa temprana del remodelado cardíaco como se ha descrito previamente (Rubin, Fishbein and Swan, 1983).

Puesto que el IAM promueve muerte celular que afecta directamente a la contractilidad y la respuesta del corazón, nuestros datos confirman que Ucn-2 disminuyó la liberación de la LDH sérica, enzima liberada cuando existe daño. Datos previos del laboratorio ya habían visto que la otra isoforma de la Ucn, la Ucn-1, disminuía los niveles de LDH (Calderon-Sanchez *et al.*, 2016). Incluso, había evidencias de que la Ucn-2 era capaz de reducir esos niveles en otros modelos de estudio (Gao *et al.*, 2015; Zhou, Chen, Lew, A. Mark Richards, *et al.*, 2016).

2. LA UCN-2 Y LA REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL EN I/R

Después de comprobar que la Ucn-2 mejoraba el daño miocárdico a efectos macroscópicos y funcionales, nuestros estudios previos demostraron un papel relevante de la administración de Ucn-2 en la regulación transcripcional y post-transcripcional de genes (Calderon-sanchez et al. 2015; Diaz et al. 2017).

Actualmente, la trascendencia de la regulación post-transcripcional por miRNAs está más que consolidada en patologías cardiovasculares (Wojciechowska, Braniewska and Kozar-Kamińska, 2017; Smani *et al.*, 2020). La compleja red de interrelaciones que existe en la naturaleza intrínseca del miRNA intensificaba el interés de su estudio. Igual que un miRNA puede actuar sobre diferentes dianas génicas, un mismo gen puede ser diana de varios miRNAs, incluso los miRNAs pueden regularse entre sí.

Para alcanzar nuestro objetivo, hicimos un cribado de los miRNAs que aparecían desregulados en suero de pacientes isquémicos y en tejido miocárdico de pacientes con insuficiencia cardiaca. En profundidad se estudiaron 12 miRNAs, 6 de ellos estaban aumentados tanto a las 24h como a 1 semana post-I/R y disminuidos cuando se administraba la Ucn-2. Todos estos miRNAs, miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1*, habían demostrado jugar anteriormente un papel en I/R (Zhang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015; Hendgen-Cotta *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2020). Los otros 6 miRNAs, miR-125, miR-139, miR-320 y miR-324-3p, se afectaban por I/R pero la Ucn-2 no revertía el fenómeno. Ningún otro grupo había pormenorizado en su relación con la Ucn-2 excepto un trabajo previo de nuestro laboratorio (Díaz *et al.*, 2017).

Debido al interés que despierta la muerte celular, la supervivencia y la fibrosis cardiaca nos preguntamos si estos miRNAs que estaban desregulados podían tener relación con alguno de procesos celulares. Gracias al avance de las plataformas *in silico* se pudo predecir qué genes relacionados con la apoptosis y la fibrosis eran diana de los miRNAs de interés. Los miRNAs miR-29a y miR-451_1* eran aquellos que exhibieron mayor número de dianas. No obstante, sobrexpresando con *mimics* en NRVM para estos dos miRNAs sólo el miR-29a reveló un papel clave en la regulación de esos genes. MiR-29a previno de manera

eficiente la deposición de colágeno, lo que indica una inhibición de la fibrosis. Estudios recientes también demostraron que miR-29a también inhibía la fibrosis en ratas con infarto de miocardio (Xiao *et al.*, 2017), en corazones sometidos a estrés por la baja la expresión de la enzima A metiltransferasa (DNMT3A) (Qin *et al.*, 2018), y o en corazones intoxicados por quimioterapia (Jing *et al.*, 2018).

Por otra parte, demostramos que el miR-29a inhibía la sobreexpresión inducida por I/R de genes pro-apoptóticos *Apaf-1*, *Cyts* y genes anti-apoptóticos como *Hmox-1*; si bien aumentaba la expresión del gen apoptótico *Aifm-1*. Este hecho puso en manifiesto lo mencionado anteriormente, pues un mismo miRNA puede actuar sobre varios genes que tienen funciones opuestas. La expresión diferencial de estos genes implicados en la muerte celular fue confirmada en muestras de corazón de I/R, distinguiendo entre eventos de 24 h y 1 semana en la zona infartada.

La muerte celular es un mecanismo muy complejo cuyo principales rutas son necrosis, apoptosis y la autofagia que suelen ocurrir ante esta situación de estrés (Rabinovich-Nikitin *et al.*, 2019). Estudios previos han demostrado que después de la reperfusión, la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial se inicia mediante la liberación de *Cyts* en el citoplasma que estimula a *Apaf-1* y la procaspasa-9 en el apoptosoma, induciendo apoptosis (Sanchis *et al.*, 2003; Shakeri, Kheirollahi and Davoodi, 2017; Wang *et al.*, 2017). En nuestro caso, a las 24h los niveles de *Apaf-1* estaban elevados como cabía esperar, pero los de *Cyts* estaban disminuidos. Otros de los genes apoptóticos que obtuvieron una tendencia positiva a las 24 h corregida a la semana fue *Aifm-1*. Durante la inducción de la apoptosis, *Aifm-1* localizada en la mitocondria es liberada al citoplasma y entra en el núcleo participando en su fragmentación, siendo una vía independiente a la activación de las caspasas. Otros autores ya habían descrito el papel de *Aifm-1* en un modelo de I/R como un mecanismo de protección frente a otros tipos de muerte celular (Kim *et al.*, 2003). Por último, el gen *Hmox-1* es considerado un gen cardioprotector en el infarto de miocardio, por su prevención del remodelado cardíaco y su preservación de la función cardíaca (Bilbija *et al.*, 2012). En nuestros resultados aparecía elevado en las primeras 24 h post-IR y disminuido a la semana. Otros autores han descrito que la sobreexpresión de este gen en células madre mesenquimales implantadas en corazón confería cardioprotección contra la lesión isquémica. Otros demostraron que su sobreexpresión podía ser un

beneficio en músculo esquelético (Bilbija *et al.*, 2012; Preda *et al.*, 2014). Aunque la función protectora de *Hmox-1* parece ser clara en roedores, su rol en humanos no está claro. En este trabajo, descubrimos que los pacientes con IC de origen isquémico sobreexpresaban *Hmox-1*, además su expresión mostraba una correlación negativa con su FEVI. Este hallazgo contradecía lo esperado ya que se sabe que el gen *Hmox-1* ejerce efectos antiinflamatorios y anti-apoptóticos post-IAM (Tomczyk *et al.*, 2019). Quizás, la sobreexpresión de *Hmox-1* en pacientes con FEVI comprometida estaría protegiendo a los corazones altamente afectados por el avance de la patología. Experimentos adicionales en un gran número de pacientes podrían arrojar luz sobre esta hipótesis.

Cuando comprobamos el efecto de la Ucn-2 en aquellos genes que habían mostrado más diferencias en I/R a las 24 h y a la semana, *Apaf-1*, *Hmox-1* y *Aifm-1*, nos dimos cuenta de que la Ucn-2 a las 24 h no tenía efecto o ejercía un papel pro-apoptótico en la zona de riesgo. La apoptosis es una muerte celular programada que causa menos daño en el tejido circundante que otro tipo de muerte como la necrosis (D'Arcy, 2019). Quizás en la zona más cercana al daño ocurriría el mismo fenómeno ya que habíamos visto previamente un efecto similar con la Ucn-1 (Calderon-Sanchez *et al.*, 2016). Se trataría de un mecanismo de defensa en la zona de riesgo. Cuando existía un daño intenso, la Ucn-2 podría favorecer una muerte controlada por apoptosis al mismo tiempo que mejor la supervivencia celular. De hecho, en las zonas remotas, Ucn-2 no regulaba positivamente ninguno de estos genes a las 24 h, lo que apoya nuestra propuesta. Otros fármacos cardioprotectores como el carvedilol parecían tener un efecto protegiendo zonas remotas (Yeh *et al.*, 2013).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que miR-29a, modulado por Ucn-2, podría ser un regulador potencial de un equilibrio entre el proceso apoptótico y anti-apoptótico. Ahora bien, existe consenso en que el cardiomiocito activa tanto vías pro-apoptóticas como anti-apoptóticas durante la transición progresiva del corazón de una situación de adaptación después de I/R (Depre and Taegtmeyer, 2000).

3. LA UCN-2 Y SU REPERCUSIÓN EN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca²⁺

La disfunción cardíaca en corazones reperfundidos ha sido relacionada con la mala regulación de la homeostasis del [Ca²⁺]_i cardíaco (García-Dorado *et al.*, 2012). Se han considerado varios mecanismos para explicar la alteración de [Ca²⁺]_i durante la reperfusión y la mayoría están relacionados con la acidosis, la alteración del acoplamiento excitación-contracción, la depresión de la actividad de SERCA y/o la activación del modo inverso del NCX (Inserte *et al.*, 2002). Sin embargo, al realizar un *microarray* de genes de canales iónicos y otras moléculas involucradas en la homeostasis de [Ca²⁺]_i observamos cambios de expresión significativos para proteínas clave para SOCE, como Orai1, STIM1 o los canales TRPC. La información disponible sobre el papel que juegan estos canales en la patología de I/R cardíaca todavía es escasa (Collins *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2019).

Ya existen evidencias convincentes de que los canales TRPC y SOCC contribuían a diferentes patologías cardíacas (Eder and Molkentin, 2011; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2015; Bartoli and Sabourin, 2017; Petersen, Wolf and Smyth, 2020). Recientemente, se ha descrito que STIM1, TRPC1, TRPC4, TRPC5 y Orai1 estaban aumentados durante la hipertrofia cardíaca inducida por la aldosterona. Este incremento se ha dado lugar al incremento de SOCE (Sabourin *et al.*, 2018; Bartoli *et al.*, 2019). Igualmente, otros autores mostraron la activación de TRPC1 y TRPC4 en la hipertrofia cardíaca (Camacho Londoño *et al.*, 2015). En nuestras condiciones experimentales, no observamos cambios significativos en la expresión de TRPC1 y TRPC4 bajo I/R (datos no mostrados). No obstante, sí demostramos que Orai1 y TRPC5 estaban aumentados tanto en corazones de rata adulta como neonata. Además, mostramos que son necesarios para SOCE ya que el silenciamiento de sus genes inhibió completamente la entrada de Ca²⁺ inducida por I/R. Es más, fue la primera vez que se describió la co-localización de Orai1 y TRPC5 en I/R.

Igualmente, fue la primera vez que se describió que el tratamiento con Ucn-2 inhibía la regulación positiva inducida por I/R de Orai1 y TRPC5 tanto en tejido cardíaco aislado del modelo de I/R como de NRVM sometidos a I/R *in vitro*. De hecho, en NRVM Ucn-2 evitó la exacerbación de SOCE en I/R. Por último, la Ucn-2 fue capaz de disminuir la interacción entre Orai1 y TRPC5. Como los efectos de

la Ucn-2 dependían de la activación de CRF-R2 se administró un bloqueante de los mismos, la astresina, y se comprobó que los resultados revertían. Los resultados obtenidos coincidieron con datos anteriores que revelaban la importancia de Ucn-1 en SOCE para las células del músculo liso (Smani *et al.*, 2007) y músculo esquelético (Reutenauer-Patte *et al.*, 2012). Los efectos cardioprotectores de la Ucn-2 podrían implicar otras dianas aguas debajo de los canales iónicos Orai1 y TRPC5. Por ejemplo, se describió la sensibilidad de TRPC5 a las ROS (Wong *et al.*, 2010; Shimizu, Takahashi and Mori, 2014), las cuales se producen en la I/R. Por ese motivo, la regulación a la baja de TRPC5 por la Ucn-2 podría mitigar el efecto de las ROS y conservar mejor la integridad de las células cardíacas.

Tomando en consideración nuestros hallazgos, la Ucn-2 parece tener nuevos e inesperados roles en la protección cardíaca. Estos efectos protectores, junto con otras acciones de la Ucn-2 como; la vasodilatación de la arteria coronaria humana (Smani *et al.*, 2011), su inotropismo positivo (Smani *et al.*, 2010) o su regulación endocrina y renal (Rademaker *et al.*, 2015), sugirieren que Ucn-2 podría ser un fármaco terapéutico prometedor y valioso para mitigar la disfunción cardíaca en pacientes post-infarto. Concretamente, estudios recientes revelaron que la administración de Ucn-2 mejoró la contractilidad del ventrículo izquierdo en pacientes con descompensación o IC crónica (Chan *et al.*, 2013; Stirrat *et al.*, 2016).

4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca²⁺

Hasta la fecha el factor de transcripción por excelencia descrito en el tejido cardíaco ha sido NFAT (Crabtree, 1999; Tongers *et al.*, 2004; Echtermeyer *et al.*, 2011). NFAT requiere incremento de la [Ca²⁺]; y varios trabajos han relacionado su activación con SOCE (Braun, 2014; Park *et al.*, 2020). Algunos otros factores como MEF-2 también se han descrito cuando el tejido sufre algún tipo de estrés o en etapas tempranas de desarrollo (Zhou *et al.*, 1993; Estrada-Avilés, Rodríguez and Zarain-Herzberg, 2017). Sin embargo, el factor de transcripción CREB ha sido ampliamente descrito en cerebro, en concreto en los campos de memoria y aprendizaje (Silva *et al.*, 1998; Carlezon, Duman and Nestler, 2005). Así mismo, el

rol de CREB en el síndrome de I/R sí había sido descrito previamente en cerebro (Huang *et al.*, 2015; Teng *et al.*, 2019).

Con anterioridad, nuestro grupo demostró que el influjo de Ca^{2+} a través de Orai1 activaba CREB en músculo liso. Además, se demostró que esta activación estaba implicada en la proliferación de las células de músculo liso (Rodríguez-Moyano *et al.* 2013). En aquel trabajo se demostró que CREB se regulaba por I/R tanto a nivel de activación aguda como a nivel de expresión. Dicha activación dependía de la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1, ya que la inhibición del canal impedía el incremento del AMPc esencial para la activación de CREB.

La AC es la enzima responsable de la producción del AMPc y hay descritas hasta 12 isoformas. Una de ellas, la AC8, es sensible a Ca^{2+} y está asociada constitutivamente a Orai1, esta interacción proteína-proteína coordinaba cambios tanto en Ca^{2+} como en el AMPc (Willoughby *et al.*, 2012). Recientemente, Trebak *et al.* (2019) habían descrito un esquema de regulación de la inactivación en el que Orai1 y AC8 estaban vinculados a través de una interacción directa en sus dominios N-terminales para llevar a cabo la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} de Orai1. A este hecho, Zhang *et al.* demostraron que el AMPc producido por la AC8, activaba la PKA, y ésta, además de inactivar Orai1 fosforilando la serina 34 ayudada por AKAP79, activaba aguas abajo al factor de transcripción NFAT (Zhang *et al.*, 2019). Siguiendo esa línea, nuestros hallazgos demostraron que existe un aumento de AMPc dependiente de AC8, la cual estaba aumentada por I/R. Además, demostramos que el silenciamiento de *Ac8* atenuó la fosforilación y activación de CREB.

Experimentos de SOCE con el FURA-2AM, corroboraron que tanto el silenciamiento de *Creb* como de la *Ac8* en I/R recobraba niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cercanos a los niveles en control frente al Ca^{2+} que estaba aumentado en I/R. Curiosamente, cuando silenciamos *Creb* observamos que la expresión de Orai1 y TRPC5 disminuían. Este resultado sugirió que CREB podría estar involucrado en la expresión de estos SOCC, abriendo paso a futuros experimentos de unión al promotor que confirmarían de manera más fehaciente esta hipótesis. Por otra parte, como la activación de CREB es dependiente de la entrada de Ca^{2+} silenciamos *Orai1* y *Trpc5*, y demostramos que la activación de CREB se veía afectada. Estos resultados sugirieron un posible mecanismo de retroalimentación

positiva en el que Orai1 y TRPC5 podrían ser responsables de la activación de CREB, mientras que éste último podría participar en su expresión.

La relación entre Orai1 y CREB únicamente había sido descrita con anterioridad en células de músculo liso, pero no cardíaco (König *et al.*, 2013; Simo-Cheyou *et al.*, 2017). En tejido miocárdico, solamente se había descrito la interrelación entre Orai1-NFAT para IC (Čendula *et al.*, 2019). Con respecto a los TRPC, otros autores sí habían descubierto que TRPC6 participaba en la activación de CREB a través de la entrada de Ca^{2+} en la I/R cerebral (Lin *et al.*, 2013). En corazón, los datos que relacionan canales TRPC con patología cardíaca únicamente señalan NFAT como el principal responsable (Li *et al.*, 2016; Eder, 2017; He *et al.*, 2018).

Con respecto a los datos obtenidos de las muestras de pacientes con IC, nosotros observamos un aumento de expresión tanto de la AC8 como de Orai1. Sin embargo, otros autores describieron que la expresión de Orai1 se reducía en un 30 % en el miocardio defectuoso y que era específica de género estando presente sólo en los hombres y sin cambios en las mujeres (Čendula *et al.*, 2019). Nuestros datos no sólo no coinciden, sino que no muestran ninguna correlación por sexo. Bien es cierto que sería necesario incrementar el número de pacientes para aumentar la rigurosidad de los datos. En el caso de la AC8 no hay estudios en pacientes con IC pero sí se describió recientemente que una sobreexpresión de la AC8 en tejido cardíaco propiciaba la aparición de disfunción cardíaca relacionada con la edad en ratones (Mougenot *et al.*, 2019).

Conocer que la SOCE, con Orai1 como el principal protagonista, activa una cadena de señalización a través de la estimulación de la AC8 y el AMPc aguas abajo activando CREB en tejido cardíaco ha sido un descubrimiento totalmente nuevo en el campo. Además de proponer que el factor de transcripción CREB como responsable de la expresión de Orai1 y TRPC5, mientras que niveles bajos de ambas proteínas afectarían la activación de CREB. Todo ello cierra un lazo de retroalimentación positiva de un eje Orai1-TRPC / AC8 / CREB / Orai1-TRPC5 que mantendría esos niveles altos y deletéreos de la $[Ca^{2+}]$; durante la I/R.



CONCLUSIONES

1. La Ucn-2 mejora las fracciones de eyección y acortamiento, así como la fibrosis en el modelo animal de I/R pero no afecta a la hipertrofia cardiaca.
2. Los miRNAs, miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1*, previamente detectados en pacientes isquémicos sometidos a angioplastia están aumentados en el corazón del modelo animal de I/R.
3. La administración de la Ucn-2 en modelo animal de rata previene el incremento de los niveles de miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 y miR-451_1*, 24 h después de I/R.
4. La sobreexpresión del miR-29a inhibe los cambios de expresión de los genes apoptóticos *Apaf-1*, *Hmox-1* y *Aifm-1*, al igual que de los genes fibróticos *Col-I* y *Col-III*, en condición de I/R en NRVM.
5. En el modelo animal de I/R confirmamos que los genes apoptóticos *Apaf-1*, *Aifm-1* y el gen anti-apoptótico *Hmox-1* se encuentran aumentados a las 24 h post-I/R y disminuidos a la semana.
6. La Ucn-2 aumenta los niveles de estos genes a las 24h en la zona de riesgo, pero no a la semana o en la zona remota al daño, posiblemente como mecanismo de defensa que apuesta por una muerte controlada frente a una muerte más dañina por necrosis.
7. *Hmox-1* presenta una correlación negativa con los pacientes que presentan IC, indicando que a peores FEVI más expresión del gen postulándose como un mecanismo de defensa en pacientes más comprometidos.
8. Los canales Orai1 y TRPC5 participan en SOCE y se encuentran sobreexpresados en el modelo *in vivo* e *in vitro* de rata de I/R. Por primera vez se describe la interacción de estos canales durante I/R.
- 9 La Ucn-2 disminuye la expresión e interacción de Orai1 y TRPC5, bajando la respuesta exacerbada de SOCE durante la I/R.

10. La AC8 está elevada en el modelo de I/R así como los niveles de AMPc 2 min post-I/R. En consecuencia, ese AMPc activa p-CREB, exponiendo una activación de CREB dependiente de AC8.

11. La activación del factor de transcripción CREB podría desencadenar la expresión de los canales *Orai1* y *TRPC5*, quedando pendiente la realización de experimentos de unión a promotor.

12. Por último, se describe un ciclo de retroalimentación positiva donde la disminución de la entrada de Ca^{2+} por el silenciamiento de *Orai1* y *Trpc5* afecta a la activación de CREB.

13. Por primera vez se describe en modelo de I/R cardiaca la vía de señalización: *Orai1*-*TRPC5* / AC8 / AMPc / pCREB / *Orai1*-*TRPC5*. Como perspectivas futuras nos gustaría comprobar el papel que podría desempeñar la Ucn-2 en esta ruta.

La urocortina podría ser utilizada en clínica humana como tratamiento cardioprotector para prevenir el remodelado ventricular adverso en el síndrome de isquemia por reperfusión inducido por la angioplastia tras el infarto agudo de miocardio. Para ello proponemos el diseño de un ensayo clínico.



CONCLUSIONS

1. Ucn-2 improves ejection and shortening fractions, as well as fibrosis without affecting cardiac hypertrophy in I/R animal model.
2. The miRNAs, miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 and miR-451_1 *, previously detected in ischemic patients who undergoing angioplasty are increased in the heart of I/R animal model.
3. The administration of Ucn-2 in I/R animal model prevents the increase of miR-29a, miR-103, miR-133, miR-339-5p, miR-423_1 and miR-451_1 * after 24 h.
4. The overexpression of miR-29a inhibits changes of apoptotic genes as *Apaf-1*, *Hmox-1* and *Aifm-1*, as well as fibrotic genes as *Col-I* and *Col-III*, in NRVM submitted to I/R.
5. We confirm that the pro-apoptotic genes *Apaf-1*, *Aifm-1* and the anti-apoptotic gene *Hmox-1* are increased at 24 h post-I/R and decreased at 1 week in I/R animal model.
6. On the one hand Ucn-2 increases the levels of these genes 24 h post-I/R in the risk zone, but in the other it does not affect these genes at 1 week in the risk zone or the remote zone at any time. This fact could be a response to damage, which pretends to control the cell death with apoptosis avoiding necrosis.
7. *Hmox-1* presents a negative correlation between left ventricle ejection fraction and its expression. As *Hmox-1* seems to be a protective gene, this discovery could offered a defense mechanism in compromised heart failure patients.
7. Orai1 and TRPC5 channels participate in SOCE and are overexpressed in the *in vivo* and *in vitro* model of I/R. For the first time, we describe the interaction of these channels in I/R pathology.
8. Ucn-2 decreases the expression and interaction of Orai1 and TRPC5, attenuating the exacerbated response of SOCE during I/R.

9. AC8 is overexpressed in I/R animal model as well as cAMP levels 2 min after reperfusion. As consequence, the cAMP activates CREB, showing an AC8-dependent activation.

10. The activation of the transcription factor, CREB, could trigger the expression of the Orai1 and TRPC5 channels. Promotor-binding experiments are needed to further information.

12. Finally, a positive feedback loop is described where the decrease in Ca^{2+} due to the silencing of Orai1 and Trpc5, could affect CREB's activation.

13. For the first time, we describe: Orai1-TRPC5 / AC8 / cAMP / pCREB / Orai1-TRPC5 signaling pathway in I/R syndrome. As future perspectives, we would like to see the role that could play here the Ucn-2.

Urocortin could be used in human clinics as a cardioprotective treatment to prevent adverse ventricular remodeling in ischemic reperfusion syndrome induced by angioplasty after acute myocardial infarction. Taking everything into account, we propose the design of a clinical trial.



REFERENCIAS

- Aghaee-Bakhtiari, S. H. (2019) 'miRandb: A Metadatabase of Online Resources of miRNA and miRNA Targets', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 15–30. doi: 10.1007/978-1-4939-9207-2_2.
- Anversa, P. *et al.* (1998) 'Apoptosis and myocardial infarction', *Basic Research in Cardiology, Supplement*. Basic Res Cardiol, 93(3), pp. 8–12. doi: 10.1007/s003950050195.
- Arroyave C Dr., J. A. and Cepeda G, M. C. (2012) 'caracterización de la restenosis de stents coronarios convencionales y liberadores de medicamentos en pacientes incluidos en el registro drug eluting stent (DREST)', *Revista Colombiana de Cardiología*. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 19(3), pp. 121–131. doi: 10.1016/S0120-5633(12)70118-3.
- Avila-Medina, J. *et al.* (2018) 'The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells', *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fphys.2018.00257.
- Baines, C. P. (2011) 'How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: The late phase', in *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, pp. 239–243. doi: 10.1177/1074248411407769.
- Barry, S. P. *et al.* (2010) 'New targets of urocortin-mediated cardioprotection', *Journal of Molecular Endocrinology*. BioScientifica Ltd., 45(2), pp. 69–85. doi: 10.1677/JME-09-0148.
- Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function', *Cell*. Cell Press, pp. 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Bartoli, F. *et al.* (2019) 'Specific Upregulation of TRPC1 and TRPC5 Channels by Mineralocorticoid Pathway in Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes', *Cells*. NLM (Medline), 9(1). doi: 10.3390/cells9010047.
- Bartoli, F. and Sabourin, J. (2017) 'Cardiac remodeling and disease: Current understanding of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca²⁺ entry in cardiac function and pathology', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 523–534. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6_26.
- Bartolotti, N. and Lazarov, O. (2019) 'CREB signals as PBMC-based biomarkers of cognitive dysfunction: A novel perspective of the brain-immune axis', *Brain, Behavior, and Immunity*. Academic Press Inc., pp. 9–20. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.004.
- Basaiyye, S. S. *et al.* (2018) 'Molecular mechanism of apoptosis induction in Jurkat E6-1 cells by Tribulus terrestris alkaloids extract', *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. National Taiwan University, 8(3), pp. 410–419. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.08.014.

- Bers, D. M. (2000) 'Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 275–281. doi: 10.1161/01.RES.87.4.275.
- Bhatt, A. S., Ambrosy, A. P. and Velazquez, E. J. (2017) 'Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction', *Current Cardiology Reports*. Current Medicine Group LLC 1. doi: 10.1007/s11886-017-0876-4.
- Bilbija, D. *et al.* (2012) 'Protecting the heart through delivering DNA encoding for heme oxygenase-1 into skeletal muscle', *Life Sciences*. Life Sci, 91(17–18), pp. 828–836. doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.014.
- Bittencourt, J. C. (2013) 'The tale of a person and a peptide: Wylie W. Vale Jr. and the role of corticotropin-releasing factor in the stress response.', *Journal of chemical neuroanatomy*. Elsevier, 54, pp. 1–4. doi: 10.1016/j.jchemneu.2013.04.005.
- Bootman, M. D. and Rietdorf, K. (2017) 'Tissue specificity: Store-operated Ca²⁺ entry in cardiac myocytes', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 363–387. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6_19.
- Brar, B. K. *et al.* (1999) 'CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Mol Cell Endocrinol, 158(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/S0303-7207(99)00183-5.
- Brar, B. K. *et al.* (2004) 'Urocortin-II and Urocortin-III Are Cardioprotective against Ischemia Reperfusion Injury: An Essential Endogenous Cardioprotective Role for Corticotropin Releasing Factor Receptor Type 2 in the Murine Heart', *Endocrinology*, 145(1), pp. 24–35. doi: 10.1210/en.2003-0689.
- Braun, A. P. (2014) 'Some assembly required: SOCE and Orai1 channels couple to NFAT transcriptional activity via calmodulin and calcineurin', *Channels*. Landes Bioscience, pp. 383–384. doi: 10.4161/19336950.2014.951250.
- Brooks, W. W. *et al.* (1994) 'Effects of treppe and calcium on intracellular calcium and function in the failing heart from the spontaneously hypertensive rat', *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 24(3), pp. 347–356. doi: 10.1161/01.HYP.24.3.347.
- Buja, L. M., Hagler, H. K. and Willerson, J. T. (1988) 'Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury', *Cell Calcium*, 9(5–6), pp. 205–217. doi: 10.1016/0143-4160(88)90002-4.
- Calderon-Sanchez, E. *et al.* (2016) 'Urocortin-1 Mediated Cardioprotection Involves XIAP and CD40-Ligand Recovery: Role of EPAC2 and ERK1/2', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(2). doi: 10.1371/journal.pone.0147375.

- Calderón-Sánchez, E. *et al.* (2009) 'Urocortin induces positive inotropic effect in rat heart.', *Cardiovascular research*, 83(4), pp. 717–25. doi: 10.1093/cvr/cvp161.
- Calderón-Sánchez, E. *et al.* (2016) 'Urocortin-1 Mediated Cardioprotection Involves XIAP and CD40-Ligand Recovery: Role of EPAC2 and ERK1/2', *PLOS ONE*. Edited by J. Calvert. Public Library of Science, 11(2), p. e0147375. doi: 10.1371/journal.pone.0147375.
- Camacho Londoño, J. E. *et al.* (2015) 'A background Ca²⁺ entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling', *European Heart Journal*. Oxford University Press, 36(33), pp. 2257–2266. doi: 10.1093/eurheartj/ehv250.
- Carlezon, W. A., Duman, R. S. and Nestler, E. J. (2005) 'The many faces of CREB', *Trends in Neurosciences*. Trends Neurosci, pp. 436–445. doi: 10.1016/j.tins.2005.06.005.
- Carlson, R. V., Boyd, K. M. and Webb, D. J. (2004) 'The revision of the Declaration of Helsinki: Past, present and future', *British Journal of Clinical Pharmacology*. Wiley-Blackwell, pp. 695–713. doi: 10.1111/j.1365-2125.2004.02103.x.
- Čendula, R. *et al.* (2019) 'Changes in STIM Isoforms expression and gender-specific alterations in Orai expression in human heart failure', *Physiological Research*. Czech Academy of Sciences, 68(Suppl 2), pp. S165–S172. doi: 10.33549/PHYSIOLRES.934300.
- Chan, W. Y. W. *et al.* (2013) 'Urocortin-2 infusion in acute decompensated heart failure: Findings from the UNICORN study (urocortin-2 in the treatment of acute heart failure as an adjunct over conventional therapy)', *JACC: Heart Failure*, 1(5), pp. 433–441. doi: 10.1016/j.jchf.2013.07.003.
- Chanalaris, A. *et al.* (2003) 'Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 35(10), pp. 1295–1305. doi: 10.1016/S0022-2828(03)00244-X.
- Chang, K. C. and Trayanova, N. A. (2016) 'Mechanisms of arrhythmogenesis related to calcium-driven alternans in a model of human atrial fibrillation', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep36395.
- Chapman, A. R., Adamson, P. D. and Mills, N. L. (2017) 'Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice', *Heart*, 103, pp. 10–18. doi: 10.1136/heartjnl-2016-309530.
- Charununtakorn, S. T. *et al.* (2016) 'Potential Roles of Humanin on Apoptosis in the Heart', *Cardiovascular Therapeutics*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 107–114. doi: 10.1111/1755-5922.12168.

- Chen, X. *et al.* (2020) 'Increased O-GlcNAcylation induces myocardial hypertrophy', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*. Springer, 56(9), pp. 735–743. doi: 10.1007/s11626-020-00503-z.
- Cheng, Y. *et al.* (2010) 'Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4.', *Cardiovascular research*, 87(3), pp. 431–9. doi: 10.1093/cvr/cvq082.
- Chien, P. T. Y. *et al.* (2015) 'C-Src/Pyk2/EGFR/PI3K/Akt/CREB-activated pathway contributes to human cardiomyocyte hypertrophy: Role of COX-2 induction', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 409, pp. 59–72. doi: 10.1016/j.mce.2015.04.005.
- Chilakamarthi, U. and Giribabu, L. (2017) 'Photodynamic Therapy: Past, Present and Future', *Chemical Record*. John Wiley and Sons Inc., pp. 775–802. doi: 10.1002/tcr.201600121.
- Cleutjens, J. P. M. *et al.* (1995) 'Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(6), pp. 1281–1292. doi: 10.1016/S0022-2828(05)82390-9.
- Collins, H. E. *et al.* (2013) 'STIM1/Orai1-mediated SOCE: Current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.00104.2013.
- Condrat *et al.* (2020) 'miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis', *Cells*, 9(2), p. 276. doi: 10.3390/cells9020276.
- Correll, R. N. *et al.* (2015) 'STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca²⁺ handling and cardiomyopathy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 87, pp. 38–47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.032.
- Crabtree, G. R. (1999) 'Generic signals and specific outcomes: Signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT', *Cell*. Cell Press, pp. 611–614. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80571-1.
- Crabtree, G. R. and Olson, E. N. (2002) 'NFAT signaling: Choreographing the social lives of cells', *Cell*. Cell Press. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00699-2.
- Cseres, B. *et al.* (2007) 'Cardioprotective action of urocortin in early pre- and postconditioning', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., pp. 228–239. doi: 10.1196/annals.1397.027.
- Curley, D. *et al.* (2018) 'Molecular imaging of cardiac remodelling after myocardial infarction', *Basic Research in Cardiology*. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. doi: 10.1007/s00395-018-0668-z.

- Davis, M. E. *et al.* (2005) 'Effect of urocortin 1 infusion in humans with stable congestive cardiac failure.', *Clinical science (London, England : 1979)*, 109(4), pp. 381–8. doi: 10.1042/CS20050079.
- Davis, M. E. *et al.* (2007) 'Urocortin 2 infusion in healthy humans: hemodynamic, neurohormonal, and renal responses.', *Journal of the American College of Cardiology*, 49(4), pp. 461–71. doi: 10.1016/j.jacc.2006.09.035.
- Depre, C. and Taegtmeyer, H. (2000) 'Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart', *Cardiovascular Research*. Oxford Academic, pp. 538–548. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00266-7.
- Desvignes, T. *et al.* (2015) 'MiRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants', *Trends in Genetics*. doi: 10.1016/j.tig.2015.09.002.
- Díaz, A. (2020) 'Infarto de miocardio: defunciones España 2006-2018 | Statista', *Revista Española de Cardiología*. Available at: <https://es.statista.com/estadisticas/591022/numero-de-muertes-por-infarto-de-miocardio-en-espana/> (Accessed: 21 April 2021).
- Díaz, I. *et al.* (2017) 'miR-125a, miR-139 and miR-324 contribute to Urocortin protection against myocardial ischemia-reperfusion injury.', *Scientific reports*, 7(1), p. 8898. doi: 10.1038/s41598-017-09198-x.
- Díaz, I. and Smani, T. (2013) 'New Insights into the Mechanisms Underlying Vascular and Cardiac Effects of Urocortin', *Current Vascular Pharmacology*. Bentham Science Publishers Ltd., 11(4), pp. 457–464. doi: 10.2174/1570161111311040009.
- Dieterle, T. *et al.* (2009) 'Immediate and sustained blood pressure lowering by urocortin 2 a novel approach to antihypertensive therapy?', *Hypertension*. Lippincott Williams and Wilkins, 53(4), pp. 739–744. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.125211.
- Ding, S. *et al.* (2020) 'Inhibiting microrna-29a protects myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting sirt1 and suppressing oxidative stress and nlrp3-mediated pyroptosis pathway', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 372(1), pp. 128–135. doi: 10.1124/JPET.119.256982.
- Domínguez-Rodríguez, A. *et al.* (2015) 'Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 87, pp. 74–78. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.002.
- Dra. Paola Beltrán Troncoso (2018) *Insuficiencia cardiaca - Fundación Española del Corazón*, *Fundación Española del Corazón*. Available at:

- <https://fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/insuficiencia-cardiaca.html> (Accessed: 8 January 2020).
- Du, Q., Zhu, X. and Si, J. (2020) 'Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway.', *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.). SAGE Publications Inc., 245(1), pp. 1–10. doi: 10.1177/1535370219894558.
- Echtermeyer, F. *et al.* (2011) 'Syndecan-4 signalling inhibits apoptosis and controls NFAT activity during myocardial damage and remodelling', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, 92(1), pp. 123–131. doi: 10.1093/cvr/cvr149.
- Eder, P. (2017) 'Cardiac remodeling and disease: SOCE and TRPC signaling in cardiac pathology', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 505–521. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6_25.
- Eder, P. and Molkenkin, J. D. (2011) 'TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy', *Circulation Research*. Circ Res, 108(2), pp. 265–272. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225888.
- Eid, R. A. *et al.* (2020) 'Exendin-4 Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Upregulation of SIRT1 and SIRT3 and Activation of AMPK', *Journal of Cardiovascular Translational Research*. Springer. doi: 10.1007/s12265-020-09984-5.
- Eitel, I. *et al.* (2010) 'Prognostic Significance and Determinants of Myocardial Salvage Assessed by Cardiovascular Magnetic Resonance in Acute Reperfused Myocardial Infarction', *Journal of the American College of Cardiology*, 55(22), pp. 2470–2479. doi: 10.1016/j.jacc.2010.01.049.
- Ellmers, L. J. *et al.* (2015) 'Chronic urocortin 2 administration improves cardiac function and ameliorates cardiac remodeling after experimental myocardial infarction', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Lippincott Williams and Wilkins, 65(3), pp. 269–275. doi: 10.1097/FJC.0000000000000190.
- Eltzschig, H. K. and Eckle, T. (2011) 'Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation', *Nature Medicine*, pp. 1391–1401. doi: 10.1038/nm.2507.
- Estrada-Avilés, R., Rodríguez, G. and Zarain-Herzberg, A. (2017) 'The cardiac calsequestrin gene transcription is modulated at the promoter by NFAT and MEF-2 transcription factors', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 12(9). doi: 10.1371/journal.pone.0184724.
- Fasanaro, P. *et al.* (2008) 'MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3.', *The Journal of biological chemistry*, 283(23), pp. 15878–83. doi: 10.1074/jbc.M800731200.

- Fernando Arós (2000) 'Guías de actuación clínica de la Sociedad Española de Cardiología en el infarto agudo de miocardio', *Revista Española de Cardiología*, 52(11), pp. 919–956. Available at: <https://www.revespcardiol.org/es-pdf-X0300893299002084> (Accessed: 21 April 2021).
- Flockerzi, V. and Nilius, B. (2014) 'TRPs: Truly remarkable proteins', *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC, 222. doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_1.
- Foth, C. and Mountfort, S. (2018) *Acute Myocardial Infarction ST Elevation (STEMI)*, *StatPearls*.
- Frangogiannis, N. G. (2017) 'Fibroblasts and the extracellular matrix in right ventricular disease', *Cardiovascular Research*. Oxford University Press, pp. 1453–1464. doi: 10.1093/cvr/cvx146.
- Freichel, M. *et al.* (2019) 'TRP Channels in the Heart', in *Neurobiology of TRP Channels*. CRC Press, pp. 149–185. doi: 10.4324/9781315152837-9.
- Gao, X. F. *et al.* (2015) 'Urocortin-2 suppression of p38-MAPK signaling as an additional mechanism for ischemic cardioprotection', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers, 398(1–2), pp. 135–146. doi: 10.1007/s11010-014-2213-1.
- Gao, Z., Gao, Q. and Lv, X. (2020) 'MicroRNA-668-3p Protects Against Oxygen-Glucose Deprivation in a Rat H9c2 Cardiomyocyte Model of Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting the Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCR4 Signaling Pathway', *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. NLM (Medline), 26, p. e919601. doi: 10.12659/MSM.919601.
- Garcia-Dorado, D. *et al.* (2012) 'Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, pp. 168–180. doi: 10.1093/cvr/cvs116.
- Gerçek, Mustafa *et al.* (2017) 'Cardiomyocyte Hypertrophy in Arrhythmogenic Cardiomyopathy', *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc., 187(4), pp. 752–766. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.12.018.
- Gersch, C. *et al.* (2002) 'Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice', *Histochemistry and Cell Biology*. Springer Verlag, 118(1), pp. 41–49. doi: 10.1007/s00418-002-0425-z.
- Gheorghiade, M. and Bonow, R. O. (1998) 'Chronic heart failure in the United States: A manifestation of coronary artery disease', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 282–289. doi: 10.1161/01.CIR.97.3.282.

- Giamouridis, D. *et al.* (2020) 'Urocortin 2 Gene Transfer Improves Heart Function in Aged Mice', *Molecular Therapy*. Cell Press, 28(1), pp. 180–188. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.10.003.
- Gómez, A. M. *et al.* (1997) 'Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 276(5313), pp. 800–806. doi: 10.1126/science.276.5313.800.
- Gottlieb, R. A. *et al.* (1994) 'Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 94(4), pp. 1621–1628. doi: 10.1172/JCI117504.
- Gottlieb, R. A. (2011) 'Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury', in *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, pp. 233–238. doi: 10.1177/1074248411409581.
- Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P. (1995) 'Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion', *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, 307(1), pp. 93–98. doi: 10.1042/bj3070093.
- Gruson, D. *et al.* (2012) 'Urocortin-induced cardiomyocytes hypertrophy is associated with regulation of the GSK-3b pathway', *Heart and Vessels*. Springer Tokyo, 27(2), pp. 202–207. doi: 10.1007/s00380-011-0141-5.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2013) 'Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 92–100. doi: 10.1172/JCI62874.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2016) 'Ischaemic conditioning and reperfusion injury', *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group, pp. 193–209. doi: 10.1038/nrcardio.2016.5.
- He, R. L. *et al.* (2018) 'Calcineurin/NFAT Signaling Modulates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration and Apoptosis in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Rats', *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG, 49(1), pp. 172–189. doi: 10.1159/000492852.
- Heidenreich, P. A. *et al.* (2013) 'Forecasting the impact of heart failure in the united states a policy statement from the american heart association', *Circulation: Heart Failure*, 6(3), pp. 606–619. doi: 10.1161/HHF.0b013e318291329a.
- Heineke, J. *et al.* (2005) 'Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(5), pp. 1655–1660. doi: 10.1073/pnas.0405488102.

- Hendgen-Cotta, U. B. *et al.* (2017) 'Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial in vivo ischemia/reperfusion', *Free Radical Research*, 51(1), pp. 91–102. doi: 10.1080/10715762.2017.1282158.
- Heusch, G. (2015) 'Molecular basis of cardioprotection signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 674–699. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.
- Hillhouse, E. W. and Grammatopoulos, D. K. (2006) 'The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology.', *Endocrine reviews*, 27(3), pp. 260–86. doi: 10.1210/er.2005-0034.
- Hofstra, L. *et al.* (2000) 'Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction', *Lancet*. Elsevier Limited, 356(9225), pp. 209–212. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02482-X.
- Huang, W. *et al.* (2015) 'miR-134 Regulates Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Neuronal Cell Death by Regulating CREB Signaling', *Journal of Molecular Neuroscience*. Springer Science and Business Media, LLC, 55(4), pp. 821–829. doi: 10.1007/s12031-014-0434-0.
- Iino, K. *et al.* (1999) 'Urocortin expression in the human central nervous system', *Clinical Endocrinology*, 50(1), pp. 107–114. doi: 10.1046/j.1365-2265.1999.00624.x.
- Ikeda, K. *et al.* (1998) 'Urocortin, a newly identified corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, stimulates atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide secretions from neonatal rat cardiomyocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press Inc., 250(2), pp. 298–304. doi: 10.1006/bbrc.1998.9297.
- Inserte, J. *et al.* (2002) 'Effect of inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, 55(4), pp. 739–748. doi: 10.1016/S0008-6363(02)00461-3.
- Jing, X. *et al.* (2018) 'MicroRNA-29b Regulates the Mitochondria-Dependent Apoptotic Pathway by Targeting Bax in Doxorubicin Cardiotoxicity', *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG, 48(2), pp. 692–704. doi: 10.1159/000491896.
- Kho, C., Lee, A. and Hajjar, R. J. (2012) 'Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling - Targets for heart failure therapy', *Nature Reviews Cardiology*. Nat Rev Cardiol, pp. 717–733. doi: 10.1038/nrcardio.2012.145.
- Kim, G. T. *et al.* (2003) 'Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion', *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

- Academic Press Inc., 309(3), pp. 619–624. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.08.045.
- Kim, Y. C. *et al.* (2019) 'Urocortin 2 Gene Transfer Reduces the Adverse Effects of a Western Diet on Cardiac Function in Mice', *Human Gene Therapy*. Mary Ann Liebert Inc., 30(6), pp. 693–701. doi: 10.1089/hum.2018.150.
- Kimura, Y. *et al.* (2002) 'Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Endocrine Society, 87(1), pp. 340–346. doi: 10.1210/jcem.87.1.8160.
- Knight, R. A. *et al.* (2008) 'Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia/reperfusion injury', *FEBS Letters*. Elsevier, pp. 984–990. doi: 10.1016/j.febslet.2008.02.035.
- Kong, P., Christia, P. and Frangogiannis, N. G. (2014) 'The pathogenesis of cardiac fibrosis', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci, pp. 549–574. doi: 10.1007/s00018-013-1349-6.
- König, S. *et al.* (2013) 'Inhibition of Orai1-mediated Ca²⁺ entry is a key mechanism of the antiproliferative action of sirolimus in human arterial smooth muscle', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 305(11). doi: 10.1152/ajpheart.00365.2013.
- Koshinuma, S. *et al.* (2014) 'Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury', *Journal of Anesthesia*. Springer-Verlag Tokyo, 28(2), pp. 235–241. doi: 10.1007/s00540-013-1716-3.
- Lasukova, T. V. *et al.* (2019) 'The Role of NO Synthase in the Cardioprotective Effect of Substances of Humic Origin on the Model of Ischemia and Reperfusion of Isolated Rat Heart', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. Springer New York LLC, 166(5), pp. 598–601. doi: 10.1007/s10517-019-04399-y.
- Lehnart, S. E., Maier, L. S. and Hasenfuss, G. (2009) 'Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart', *Heart Failure Reviews*. Heart Fail Rev, pp. 213–224. doi: 10.1007/s10741-009-9146-x.
- Lewis, K. *et al.* (2001) 'Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), pp. 7570–5. doi: 10.1073/pnas.121165198.
- Li, N. *et al.* (2016) 'Nicotine Induces Cardiomyocyte Hypertrophy Through TRPC3-Mediated Ca²⁺/NFAT Signalling Pathway', *Canadian Journal of Cardiology*. Pulsus Group Inc., 32(10), pp. 1260.e1-1260.e10. doi: 10.1016/j.cjca.2015.12.015.

- Lim, L. P. *et al.* (2005) 'Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs', *Nature*, 433(7027), pp. 769–773. doi: 10.1038/nature03315.
- Lin, Y. *et al.* (2013) 'Neuroprotective effect of resveratrol on ischemia/reperfusion injury in rats through TRPC6/CREB pathways', *Journal of Molecular Neuroscience*. *J Mol Neurosci*, 50(3), pp. 504–513. doi: 10.1007/s12031-013-9977-8.
- Linglart, A. *et al.* (2011) 'Recurrent PRKAR1A Mutation in Acrodysostosis with Hormone Resistance', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 364(23), pp. 2218–2226. doi: 10.1056/nejmoa1012717.
- Liu, C.-N. *et al.* (2005) 'In vivo protective effects of urocortin on ischemia-reperfusion injury in rat heart via free radical mechanisms.', *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83(6), pp. 459–65. doi: 10.1139/y05-033.
- Liu, X. *et al.* (2016) 'Urocortin attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats via the Akt/GSK-3 β signaling pathway', *Endocrine Research*. Taylor and Francis Ltd, 41(2), pp. 148–157. doi: 10.3109/07435800.2015.1094489.
- Lovenberg, T. W. *et al.* (1995) 'Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 92(3), pp. 836–840. doi: 10.1073/pnas.92.3.836.
- Lucas, T., Bonauer, A. and Dimmeler, S. (2018) 'RNA Therapeutics in Cardiovascular Disease.', *Circulation research*. Lippincott Williams and Wilkins, 123(2), pp. 205–220. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311311.
- Luo, H. *et al.* (2019) 'MicroRNA-423-3p exosomes derived from cardiac fibroblasts mediates the cardioprotective effects of ischaemic post-conditioning', *Cardiovascular Research*. Oxford University Press, 115(7), pp. 1189–1204. doi: 10.1093/cvr/cvy231.
- Lupón, J. and Bayés-Genís, A. (2019) 'Mortality and Heart Failure Hospitalizations. The Need for an Exhaustive, Official, and Standardized Registry', *Revista Espanola de Cardiologia*. Ediciones Doyma, S.L. doi: 10.1016/j.recesp.2019.05.003.
- Ma, G. *et al.* (2017) 'The STIM-orai pathway: Light-operated Ca²⁺ entry through engineered CRAC channels', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 117–138. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6_7.
- Ma, N. *et al.* (2016) 'Trimetazidine protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via effects on cardiac miRNA21 expression, Akt and the Bcl2/Bax pathway', *Molecular Medicine Reports*. Spandidos Publications, 14(5), pp. 4216–4222. doi: 10.3892/mmr.2016.5773.

- Macaya Miguel, C. (2018) *Cardiopatía Isquémica - Fundación Española del Corazón, Fundación Española del Corazón*. Available at: <https://fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/cardiopatia-isquemica.html>.
- Makarewich, C. A. *et al.* (2015) 'Comparative effects of urocortins and stresscopin on cardiac myocyte contractility.', *Journal of molecular and cellular cardiology*. Academic Press, 86, pp. 179–86. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.023.
- Martínez-Pérez, B. *et al.* (2014) 'Comparison of mobile apps for the leading causes of death among different income zones: A review of the literature and app stores', *Journal of Medical Internet Research*. doi: 10.2196/mhealth.2779.
- Matkovich, S. J. *et al.* (2010) 'MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts.', *Circulation research*. NIH Public Access, 106(1), pp. 166–75. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.202176.
- McKay, R. G. *et al.* (1986) 'Left ventricular remodeling after myocardial infarction: A corollary to infarct expansion', *Circulation*, 74(4), pp. 693–702. doi: 10.1161/01.CIR.74.4.693.
- Mewton, N. *et al.* (2011) 'Assessment of myocardial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance', *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA, pp. 891–903. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.013.
- Minamino, T. (2012) 'Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: Basic and translational research', *Circulation Journal*. Circ J, pp. 1074–1082. doi: 10.1253/circj.CJ-12-0132.
- Molkentin, J. D. (2004) 'Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs', *Cardiovascular Research*, pp. 467–475. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.021.
- Monteiro-Pinto, C. *et al.* (2019) 'Cardiovascular Effects of Urocortin-2: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Potential.', *Cardiovascular drugs and therapy*. Springer, 33(5), pp. 599–613. doi: 10.1007/s10557-019-06895-9.
- Montell, C. (2005) 'Drosophila TRP channels', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, pp. 19–28. doi: 10.1007/s00424-005-1426-2.
- Mougenot, N. *et al.* (2019) 'Cardiac adenylyl cyclase overexpression precipitates and aggravates age-related myocardial dysfunction', *Cardiovascular Research*. Oxford University Press, 115(12), pp. 1778–1790. doi: 10.1093/cvr/cvy306.
- Murphy, J. F. A. (2013) 'The global burden of disease', *Irish Medical Journal*, 106(1), p. 1.

doi: 10.1093/med/9780198529880.003.0011.

- Nabeebaccus, A., Zheng, S. and Shah, A. M. (2016) 'Heart failure-potential new targets for therapy.', *British medical bulletin*, 119(1), pp. 99–110. doi: 10.1093/bmb/ldw025.
- Nakamura, M. and Sadoshima, J. (2018) 'Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy', *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group, pp. 387–407. doi: 10.1038/s41569-018-0007-y.
- Neely, J. R. and Grotyohann, L. W. (1984) 'Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts', *Circulation Research*, 55(6), pp. 816–824. doi: 10.1161/01.RES.55.6.816.
- Nie, J. *et al.* (2019) 'Ranolazine prevents pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by restoring aberrant Na⁺ and Ca²⁺ handling', *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc., 234(7), pp. 11587–11601. doi: 10.1002/jcp.27791.
- Oerlemans, M. I. F. J. *et al.* (2013) 'Targeting cell death in the reperfused heart: Pharmacological approaches for cardioprotection', *International Journal of Cardiology*, pp. 410–422. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.03.055.
- Okosi, A. *et al.* (1998) 'Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes', *Neuropeptides*. Churchill Livingstone, 32(2), pp. 167–171. doi: 10.1016/S0143-4179(98)90033-6.
- Orogo, A. M. and Gustafsson, Å. B. (2013) 'Cell death in the myocardium: My heart won't go on', *IUBMB Life*, pp. 651–656. doi: 10.1002/iub.1180.
- Ovize, M. *et al.* (2010) 'Postconditioning and protection from reperfusion injury: Where do we stand: Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology', *Cardiovascular Research*. Oxford University Press, pp. 406–423. doi: 10.1093/cvr/cvq129.
- Palty, R. *et al.* (2012) 'SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling', *Cell*, 149(2), pp. 425–438. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.055.
- Park, Y. J. *et al.* (2020) 'The Role of Calcium–Calcineurin–NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2020.00195.
- Parker, R. and Song, H. (2004) 'The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover', *Nature Structural and Molecular Biology*, pp. 121–127. doi: 10.1038/nsmb724.
- Parker, T. *et al.* (2019) 'Soluble adenylyl cyclase links Ca²⁺ entry to Ca²⁺/cAMP-response

- element binding protein (CREB) activation in vascular smooth muscle', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-43821-3.
- Peana, D. and Domeier, T. L. (2017) 'Cardiomyocyte Ca²⁺ homeostasis as a therapeutic target in heart failure with reduced and preserved ejection fraction', *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.coph.2017.03.005.
- Petersen, C. E., Wolf, M. J. and Smyth, J. T. (2020) 'Suppression of store-operated calcium entry causes dilated cardiomyopathy of the Drosophila heart', *Biology Open*. Company of Biologists Ltd, 9(3). doi: 10.1242/bio.049999.
- Van Pett, K. *et al.* (2000) 'Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse', *Journal of Comparative Neurology*, 428(2), pp. 191–212. doi: 10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U.
- Pfeffer, M. A. and Braunwald, E. (1990) 'Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 81(4), pp. 1161–1172. doi: 10.1161/01.CIR.81.4.1161.
- Pike, M. M. *et al.* (1993) 'NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: Role of Na⁺-H⁺ exchange', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 265(6 34-6). doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.6.h2017.
- Piper, H. (1998) 'A fresh look at reperfusion injury', *Cardiovascular Research*, 38(2), pp. 291–300. doi: 10.1016/S0008-6363(98)00033-9.
- Pons, F. *et al.* (2010) 'Mortalidad y causas de muerte en pacientes con insuficiencia cardiaca: experiencia de una unidad especializada multidisciplinaria', *Revista Espanola de Cardiologia*, 63(3), pp. 303–314. doi: 10.1016/S0300-8932(10)70089-0.
- Prakriya, M. and Lewis, R. S. (2015) 'Store-operated calcium channels', *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 95(4), pp. 1383–1436. doi: 10.1152/physrev.00020.2014.
- Preda, M. B. *et al.* (2014) 'Remote Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Protects the Heart Against Ischemia-Reperfusion Injury', *STEM CELLS*. Wiley-Blackwell, 32(8), pp. 2123–2134. doi: 10.1002/stem.1687.
- Prescimone, T. *et al.* (2013) 'Apoptotic transcriptional profile remains activated in late remodeled left ventricle after myocardial infarction in swine infarcted hearts with preserved ejection fraction', *Pharmacological Research*, 70(1), pp. 41–49. doi: 10.1016/j.phrs.2012.12.007.
- Przyklenk, K. *et al.* (2011) 'Acute induction of autophagy as a novel strategy for cardioprotection: Getting to the heart of the matter', *Autophagy*. Taylor and Francis Inc., pp. 432–433. doi: 10.4161/auto.7.4.14395.

- Pulver, R. A. *et al.* (2004) 'Store-operated Ca²⁺ entry activates the CREB transcription factor in vascular smooth muscle', *Circulation Research*. Circ Res, 94(10), pp. 1351–1358. doi: 10.1161/01.RES.0000127618.34500.FD.
- Putney, J. W. (1986) 'A model for receptor-regulated calcium entry', *Cell Calcium*, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6.
- Qin, R. H. *et al.* (2018) 'microRNA-29a inhibits cardiac fibrosis in Sprague-Dawley rats by downregulating the expression of DNMT3A', *Anatolian journal of cardiology*. NLM (Medline), 20(4), pp. 198–205. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2018.98511.
- Rabinovich-Nikitin, I. *et al.* (2019) 'Circadian-Regulated Cell Death in Cardiovascular Diseases', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 965–980. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036550.
- Rademaker, M. T. *et al.* (2015) 'Urocortin 2 protects heart and kidney structure and function in an ovine model of acute decompensated heart failure: Comparison with dobutamine', *International Journal of Cardiology*. Elsevier Ireland Ltd, 197, pp. 56–65. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.06.011.
- Rademaker, M. T. and Richards, A. M. (2017) 'Urocortins: Actions in health and heart failure.', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Elsevier B.V., 474, pp. 76–87. doi: 10.1016/j.cca.2017.09.003.
- Reddy, K., Khaliq, A. and Henning, R. J. (2015) 'Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction', *World J Cardiol*, 7(5), pp. 243–276. doi: 10.4330/wjc.v7.i5.243.
- Reutenauer-Patte, J. *et al.* (2012) 'Urocortins improve dystrophic skeletal muscle structure and function through both PKA- and epac-dependent pathways', *American Journal of Pathology*. Am J Pathol, 180(2), pp. 749–762. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.10.038.
- Richardson, W. J. *et al.* (2015) 'Physiological implications of myocardial scar structure', *Comprehensive Physiology*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 5(4), pp. 1877–1909. doi: 10.1002/cphy.c140067.
- Rodríguez-Moyano, M. *et al.* (2013) 'Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, 100(2), pp. 297–306. doi: 10.1093/cvr/cvt196.
- Roos, J. *et al.* (2005) 'STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function', *Journal of Cell Biology*, 169(3), pp. 435–445. doi: 10.1083/jcb.200502019.

- Rubin, S. A., Fishbein, M. C. and Swan, H. J. C. (1983) 'Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat', *Journal of the American College of Cardiology*. J Am Coll Cardiol, 1(6), pp. 1435–1441. doi: 10.1016/S0735-1097(83)80046-1.
- Ruiz-Meana, M. and García-Dorado, D. (2009) 'Fisiopatología del daño miocárdico por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio', *Revista Española de Cardiología*. Elsevier, 62(2), pp. 199–209. doi: 10.1016/S0300-8932(09)70162-9.
- Sabourin, J. *et al.* (2018) 'Ca²⁺ handling remodeling and STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 118, pp. 208–224. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.04.003.
- Sanchis, D. *et al.* (2003) 'Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes', *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ, pp. 977–986. doi: 10.1038/sj.cdd.4401267.
- Saraste, A. and Pulkki, K. (2000) 'Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, pp. 528–537. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00384-3.
- Scarabelli, T. M. *et al.* (2002) 'Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion', *Journal of the American College of Cardiology*. J Am Coll Cardiol, 40(1), pp. 155–161. doi: 10.1016/S0735-1097(02)01930-7.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method', *Nature Protocols*. Nat Protoc, 3(6), pp. 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.
- Segovia Cubero, J. *et al.* (2004) 'Etiología y evaluación diagnóstica en la insuficiencia cardíaca', *Revista Espanola de Cardiologia*. Ediciones Doyma, S.L., pp. 250–259. doi: 10.1157/13059107.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A. and Davoodi, J. (2017) 'Apaf-1: Regulation and function in cell death', *Biochimie*. Elsevier B.V., pp. 111–125. doi: 10.1016/j.biochi.2017.02.001.
- Shanmugam, P. *et al.* (2011) 'Angiotensin-II type 1 receptor and NOX2 mediate TCF/LEF and CREB dependent WISP1 induction and cardiomyocyte hypertrophy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. J Mol Cell Cardiol, 50(6), pp. 928–938. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.012.
- Shanmughapriya, S. *et al.* (2015) 'Ca²⁺ signals regulate mitochondrial metabolism by stimulating CREB-mediated expression of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter gene MCU', *Science Signaling*. American Association for the Advancement of Science,

- 8(366), p. ra23. doi: 10.1126/scisignal.2005673.
- Shao, H. *et al.* (2018) 'MicroRNA-34a protects myocardial cells against ischemia-reperfusion injury through inhibiting autophagy via regulating TNF α expression.', *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. Canadian Science Publishing, 96(3), pp. 349–354. doi: 10.1139/bcb-2016-0158.
- Shimizu, S., Takahashi, N. and Mori, Y. (2014) 'TRPs as Chemosensors (ROS, RNS, RCS, Gasotransmitters)', in *Handbook of experimental pharmacology*, pp. 767–794. doi: 10.1007/978-3-319-05161-1_3.
- Silva, A. J. *et al.* (1998) 'CREB and memory', *Annual Review of Neuroscience*. Annu Rev Neurosci, pp. 127–148. doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.127.
- Simo-Cheyou, E. R. *et al.* (2017) 'STIM-1 and ORAI-1 channel mediate angiotensin-II-induced expression of Egr-1 in vascular smooth muscle cells', *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc., 232(12), pp. 3496–3509. doi: 10.1002/jcp.25810.
- Singh, K. K. *et al.* (2014) 'Autophagy gene fingerprint in human ischemia and reperfusion', *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Mosby Inc., 147(3). doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.04.042.
- Smani, T. *et al.* (2007) 'Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 and store-operated pathway in urocortin-induced vasodilatation of rat coronary artery', *Circulation Research*, 101(11), pp. 1194–1203. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159053.
- Smani, T. *et al.* (2010) 'Mechanisms underlying the activation of L-type calcium channels by urocortin in rat ventricular myocytes', *Cardiovascular Research*. Oxford University Press, 87(3), pp. 459–466. doi: 10.1093/cvr/cvq063.
- Smani, T. *et al.* (2011) 'Urocortin-2 induces vasorelaxation of coronary arteries isolated from patients with heart failure', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 38(1), pp. 71–76. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05466.x.
- Smani, T. *et al.* (2015) 'Functional and physiopathological implications of TRP channels', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., pp. 1772–1782. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.04.016.
- Smani, T. *et al.* (2016) 'Phospholipase A2 as a molecular determinant of store-operated calcium entry', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 111–131. doi: 10.1007/978-3-319-26974-0_6.
- Smani, T. *et al.* (2020) 'Non-coding RNAs and Ischemic Cardiovascular Diseases', *Advances in experimental medicine and biology*. NLM (Medline), 1229, pp. 259–271. doi: 10.1007/978-981-15-1671-9_15.

- Stathopoulos, P. B. *et al.* (2008) 'Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry', *Cell*. Elsevier, 135(1), pp. 110–122. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.006.
- Steenbergen, C. *et al.* (1987) 'Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart', *Circulation Research*, 60(5), pp. 700–707. doi: 10.1161/01.RES.60.5.700.
- Stirrat, C. G. *et al.* (2016) 'Cardiovascular effects of urocortin 2 and urocortin 3 in patients with chronic heart failure', *British Journal of Clinical Pharmacology*. Blackwell Publishing Ltd, 82(4), pp. 974–982. doi: 10.1111/bcp.13033.
- Su, Q. *et al.* (2018) 'Relationship between circulating miRNA-30e and no-reflow phenomenon in STEMI patients undergoing primary coronary intervention', *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. Taylor & Francis, 78(4), pp. 318–324. doi: 10.1080/00365513.2018.1467571.
- Takefuji, M. and Murohara, T. (2019) 'Corticotropin-releasing hormone family and their receptors in the cardiovascular system', *Circulation Journal*. Japanese Circulation Society, pp. 261–266. doi: 10.1253/circj.CJ-18-0428.
- Tan, H. *et al.* (2018) 'MicroRNA-24-3p Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressing RIPK1 Expression in Mice.', *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 51(1), pp. 46–62. doi: 10.1159/000495161.
- Teng, L. *et al.* (2019) 'Dexmedetomidine Improves Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats via Extracellular Signal-Regulated Kinase/Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein Signaling Pathway', *World Neurosurgery*. Elsevier Inc., 127, pp. e624–e630. doi: 10.1016/j.wneu.2019.03.232.
- Tomczyk, M. *et al.* (2019) 'Modulation of the monocyte/macrophage system in heart failure by targeting heme oxygenase-1', *Vascular Pharmacology*. Elsevier Inc., pp. 79–90. doi: 10.1016/j.vph.2018.08.011.
- Tongers, J. *et al.* (2004) 'Heme oxygenase-1 inhibition of MAP kinases, calcineurin/NFAT signaling, and hypertrophy in cardiac myocytes', *Cardiovascular Research*. Cardiovasc Res, 63(3), pp. 545–552. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.04.015.
- Topal, E. *et al.* (2012) 'Relationship of urocortin-2 with systolic and diastolic functions and coronary artery disease: An observational study', *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*. AVES, 12(2), pp. 115–120. doi: 10.5152/akd.2012.036.
- Tu, Y. *et al.* (2013) 'Ischemic Postconditioning-Mediated miRNA-21 Protects against Cardiac ischemia/reperfusion Injury via PTEN/Akt Pathway', *PLoS ONE*. Public Library

- of Science, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0075872.
- Varela, N. *et al.* (2020) 'The Current State of MicroRNAs as Restenosis Biomarkers', *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fgene.2019.01247.
- Vig, M. *et al.* (2006) 'CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry', *Science*, 312(5777), pp. 1220–1223. doi: 10.1126/science.1127883.
- Virani, S. S. *et al.* (2020) 'Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association', *Circulation*. NLM (Medline), 141(9), pp. e139–e596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.
- Wang, H. *et al.* (2018) 'cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A., p. 255. doi: 10.3389/fnmol.2018.00255.
- Wang, J. *et al.* (2016) 'Overview of microRNAs in cardiac hypertrophy, fibrosis, and apoptosis', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms17050749.
- Wang, J. X. *et al.* (2015) 'MicroRNA-103/107 regulate programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury through targeting FADD', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 117(4), pp. 352–363. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305781.
- Wang, Y. *et al.* (2016) 'The discovery of a novel inhibitor of apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) for ischemic heart: Synthesis, activity and target identification', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6. doi: 10.1038/srep29820.
- Wang, Y. *et al.* (2017) 'Apoptotic Protease Activating Factor-1 Inhibitor Mitigates Myocardial Ischemia Injury via Disturbing Procaspase-9 Recruitment by Apaf-1', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited, 2017. doi: 10.1155/2017/9747296.
- Weiss, J. B. *et al.* (2012) 'MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury.', *American journal of cardiovascular disease*, 2(3), pp. 237–47.
- Wenk, J. F. *et al.* (2012) 'First evidence of depressed contractility in the border zone of a human myocardial infarction', *Annals of Thoracic Surgery*, 93(4), pp. 1188–1193. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.12.066.
- Williams, T. A. *et al.* (2017) 'CRF and urocortin 3 protect the heart from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in zebrafish', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. American Physiological Society, 313(2), pp. R91–R100. doi: 10.1152/ajpregu.00045.2017.

- Willoughby, D. *et al.* (2012) 'Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling', *Science Signaling*. Sci Signal, 5(219). doi: 10.1126/scisignal.2002299.
- Winslow, R. L., Walker, M. A. and Greenstein, J. L. (2016) 'Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(1), pp. 37–67. doi: 10.1002/wsbm.1322.
- Wojciechowska, A., Braniewska, A. and Kozar-Kamińska, K. (2017) 'MicroRNA in cardiovascular biology and disease', *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. Wrocław University of Medicine, pp. 865–874. doi: 10.17219/acem/62915.
- Wong, C.-O. *et al.* (2010) 'Nitric oxide lacks direct effect on TRPC5 channels but suppresses endogenous TRPC5-containing channels in endothelial cells.', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 460(1), pp. 121–30. doi: 10.1007/s00424-010-0823-3.
- Wu, L. J., Sweet, T. B. and Clapham, D. E. (2010) 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the Mammalian TRP ion channel family', *Pharmacological Reviews*, pp. 381–404. doi: 10.1124/pr.110.002725.
- Xiao, L. *et al.* (2017) 'Effects of miR-29a and miR-101a Expression on Myocardial Interstitial Collagen Generation After Aerobic Exercise in Myocardial-infarcted Rats', *Archives of Medical Research*. Elsevier Inc., 48(1), pp. 27–34. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.01.006.
- Xu, H. *et al.* (2019) 'Resveratrol pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting STIM1-mediated intracellular calcium accumulation', *Journal of Physiology and Biochemistry*. Springer, 75(4), pp. 607–618. doi: 10.1007/s13105-019-00704-5.
- Yang, L. Z. *et al.* (2006) 'Urocortin II enhances contractility in rabbit ventricular myocytes via CRF2 receptor-mediated stimulation of protein kinase a', *Cardiovascular Research*. Oxford Academic, 69(2), pp. 402–411. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.10.015.
- Yano, Y. *et al.* (2006) 'Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice', *Genes to Cells*, 11(7), pp. 791–803. doi: 10.1111/j.1365-2443.2006.00979.x.
- Yellon, D. M. and Hausenloy, D. J. (2007) 'Myocardial Reperfusion Injury', *N Engl J Med*, 357, pp. 1121–35. Available at: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMra071667> (Accessed: 10 May 2018).
- Yuan, J. *et al.* (2017) 'Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via

- Targeting Smad7', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(6), pp. 2207–2219. doi: 10.1159/000479995.
- Zhai, C.-L. *et al.* (2019) 'MicroRNA-98 attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury through inhibiting DAPK1 expression.', *IUBMB life*, 71(2), pp. 166–176. doi: 10.1002/iub.1879.
- Zhang, X. *et al.* (2010) 'Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(5), pp. 841–850. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.08.007.
- Zhang, X. *et al.* (2019) 'A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-09593-0.
- Zhou, M. D. *et al.* (1993) 'A new serum-responsive, cardiac tissue-specific transcription factor that recognizes the MEF-2 site in the myosin light chain-2 promoter.', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 13(2), pp. 1222–1231. doi: 10.1128/mcb.13.2.1222.
- Zhou, W. and Yuan, J. (2014) 'SnapShot: Necroptosis', *Cell*. Cell Press, pp. 464-464.e1. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.041.
- Zhou, Y., Chen, Q., Lew, K. S., Richards, A Mark, *et al.* (2016) 'Discovery of Potential Therapeutic miRNA Targets in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury.', *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. SAGE Publications Ltd, 21(3), pp. 296–309. doi: 10.1177/1074248415604463.
- Zhou, Y., Chen, Q., Lew, K. S., Richards, A. Mark, *et al.* (2016) 'Discovery of Potential Therapeutic miRNA Targets in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury', *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. SAGE Publications Ltd, 21(3), pp. 296–309. doi: 10.1177/1074248415604463.
- Zweier, J. L., Flaherty, J. T. and Weisfeldt, M. L. (1987) 'Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), pp. 1404–1407. doi: 10.1073/pnas.84.5.1404.

