



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS LOSARTÁN Y
NINTEDANIB SOBRE LA FIBROSIS CARDÍACA**

TESIS DOCTORAL

RAQUEL ORTEGA LUNA

DIRECTORAS

ÁNGELES ÁLVAREZ RIBELLES

M^a ÁNGELES MARTÍNEZ CUESTA

Valencia, 2025

Dña. **ÁNGELES ÁLVAREZ RIBELLES**, Catedrática del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Dña. **M^a ÁNGELES MARTÍNEZ CUESTA**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que el trabajo titulado **“ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS LOSARTÁN Y NINTEDANIB SOBRE LA FIBROSIS CARDÍACA”**, presentado por la Graduada en Farmacia Raquel Ortega Luna, ha sido realizado bajo nuestra supervisión en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de la presente Tesis Doctoral para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, firmamos en Valencia, en **FEBRERO** del año **2025**.

Dra. Ángeles Álvarez Ribelles

Dra. M^a Ángeles Martínez Cuesta

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la financiación de los siguientes proyectos y becas:

PROYECTOS:

- **RT2018-094436-B-I00.** Receptores P2X7 y respuesta inflamatoria vascular: desde la evidencia obtenida con abacavir hasta la caracterización de nuevos mediadores protrombóticos. Ministerio de Economía y Competitividad. Investigadores principales: Juan V. Esplugues Mota y Ángeles Álvarez Ribelles.
- **PID2022-1376780B-I00.** Efecto de los nuevos fármacos incluidos en la terapia antirretroviral sobre los procesos de trombosis y fibrosis cardíaca. Ministerio de Economía y Competitividad. Investigadores principales: Ángeles Álvarez Ribelles y Víctor Collado Díaz.
- **CIPROM/2021/044.** Pharmacology of the hepato-gastrointestinal tract: analysis of cellular and molecular targets for the treatment of fibrosis. Investigadores principales: Juan V. Esplugues Mota y M^a Dolores Barrachina Sancho.
- **PROMETEO/2018/141.** Farmacología experimental del tracto digestivo. Generalitat Valenciana/Conselleria de Educación. Investigador principal: Juan V. Esplugues Mota.

BECAS:

- **FPU19/00013.** Ayudas para la formación de profesorado universitario. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Fecha de concesión: 01/11/2020 – Fecha finalización: 31/10/2024.

“Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido ni fácil”

Marie Curie

Llegados a este punto, tras un largo camino de 4 años, llega la parte más complicada e importante para mí, la de dar las gracias a todas y cada una de las personas que se han ido cruzando en mi camino y que han hecho posible que yo hoy esté aquí. Quiero empezar agradeciendo a mis directoras de tesis la oportunidad que me han dado de construir esta historia y formar parte de esta pequeña gran familia. **Ángeles y M^a Ángeles**, gracias por confiar en mí desde el primer momento, por acompañarme y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

También quiero agradecer al resto de integrantes del departamento: **Loles, Jesús, Nade, Dolo, Ana Blas, Sara, Dora y Juan Vicente**, por haber contribuido directa o indirectamente en esta tesis e interesarse por mí durante todo este tiempo. Gracias. A **Carmen**, porque no solo nos has ayudado como *lab manager*, sino que has sido una más del grupo. Gracias por hacernos el trabajo más fácil, por preocuparte por nosotros y por alegrarnos las mañanas, porque las risas no han faltado y el apoyo por tu parte ha sido inmenso. Gracias. A **Silvia y Mari**, que, a pesar de que están detrás de la escalera de caracol no hay que olvidarlas, gran parte del trabajo lo llevan ellas, entre tanto albarán, pedidos y presupuestos, siempre han estado ahí para ayudar en todo y es de agradecer. Gracias. Como no, agradecerle a **Mamen** su infinita paciencia, porque no sé cuántas veces le habré preguntado lo mismo, pero ella está ahí, contestándote una y otra vez y, ayudándote a que la tesis se entregue a tiempo. Gracias.

Pero sobre todo agradecer a los que han compartido bancada, aquellas personas que han estado codo con codo trabajando en el *lab*. A todos y cada uno de ellos que en su día me acogisteis como una ‘pollito’ más, a los que se fueron y a los que, hoy en día, siguen aquí viéndome cerrar esta etapa. Porque son ellos los que te ven en tus peores días, cuando el estrés te tiene al borde del colapso (que han sido muchos), pero también celebran contigo cada pequeño logro (que te salga bien un WB, o que hayan sobrevivido tus ratones un día más...). Son los que

AGRADECIMIENTOS

entienden tus chistes malos sobre experimentos y cosas científicas varias, porque han estado ahí contigo, sobreviviendo a lo mismo. Por aquellos amigos que se convierten en esas personas que no solo entienden tu vida profesional, sino que también forman parte de tu vida personal. Son esos vínculos que, aunque cambies de trabajo o de rumbo, se quedan contigo para siempre, recordándote que hasta en los espacios más cotidianos pueden surgir conexiones que valen la pena. Y esta es mi gente, mis chicas, mis 'nenis', mi *lab* 01, a los que agradezco que me hayan acompañado en esta etapa y me hayan soportado durante todo este tiempo.

A **Víctor**, porque contigo empezó y terminó todo. Quien me iba a decir a mí que un correo fuera el inicio de todo. Gracias por tu ayuda infinita y por tu santa paciencia (porque soy tela), por todos los consejos y charlas, por todos los cafés (que creo que aún te debo) y por las famosas *Ovomaltine* que nos han amenizado tantas tardes en el *lab* y han encarecido tu bolsillo jaja. Gracias por dejarme formar parte de la familia de los 'San Jacobos' y por dejar que aprenda de ti (tanto en las cosas buenas como en las malas). Porque al final tu 'doctoranda favorita' te ha cogido cariño. Gracias. A **Mariam**, por ser mi +1 y mi acompañante de aventuras. Gracias por tu ayuda, por tu apoyo y por tus consejos, por ese increíble viaje a Suiza y por el inolvidable concierto en Madrid de nuestro queridísimo Dani Fernández, al que todo el mundo pensaba que no iría jeje. Por todas las tardes improvisadas acompañadas de confesiones inconfesables, por las charlas, pero, sobre todo, gracias por las risas. Todavía nos quedan muchas 'locuritas' por cumplir, como ese viaje 'post-tesis' el cual todavía no tenemos ni idea a donde iremos, pero que en nuestra cabeza suena perfecto. Gracias. A **Patri**, por hacer de hermana mayor tanto dentro como fuera del *lab*, por entenderme como la que más y posiblemente la que más me conoce. Gracias por ayudarme en todo, tanto en lo profesional como en lo personal, por dejarme momentos únicos e irrepetibles (recordando la caída épica en cultivos donde casi te pierdo y nunca pasará al olvido), por ser mi 'cita' favorita para descubrir sitios

nuevos, incluso para ir a la máquina a ver si han puesto algo interesante, por ser mi segunda casa (incluso, cuando me quedo sin agua), por responderme a todos mis: '¿Una preguntita?', y por haberme acompañado todos estos años para escribir esta historia. Porque como 'hermana mayor' sé que vas a seguir ahí, Gracias. A **Laura**, por hacer de mami ('mami joven' por supuesto) tanto para mimarme como para reñirme, por soportar mis nervios y mis agobios y, por ser también una víctima más de mis '¿Una preguntita?'. Gracias por estar día tras día, por enseñarme en todo lo que te he pedido (que no ha sido poco), por ser mi maestra en los ratones (contigo aprendí a hacer 'orales'), por mimarme con tus famosas bolitas de chocolate que un día convertiré en tarta, por cuidarme cuando he ocupado tu casa para ver nuestras series (de ya tú sabes qué jaja). Por formar parte de esta aventura y por seguir compartiendo momentos, porque este 2025 se avecina grande y me alegra poder seguir estando a tu lado, Gracias. A **Pedro**, que a pesar de no haber coincidido en el *lab* también forma parte de este gran grupo, creando momentos fuera de la investigación y al que tengo que agradecer que me haya dejado invadir su casa en su ausencia, Gracias. A **Sandra**, mi rubia, gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado, por nuestras charlas y cafés en el 'Pepes' que nunca fallaron y que he echado de menos en esta última etapa. Por grandes momentos, como el del 'dátil' en el pomo de tu puerta, que siempre quedará en el recuerdo. Gracias por dejarme aprender de ti y demostrarme que eres una valiente. Por los ánimos y por las alegrías, porque Itziar tiene la suerte de tener una mami como tú. Gracias. A **Sandra F.**, la nueva incorporación, la que al principio 'me caía mal' (eso cuentan las malas lenguas), pero que al final ha acabado siendo una más del grupo, imprescindible. Porque me has visto en mis años de agobio máximo, pero que has estado ahí para ayudarme y para reírte también (hay *stickers* que lo demuestran). Gracias por acompañarme hasta el final, por formar parte del '*team café*' que tantas alegrías nos ha dado, por el inolvidable viaje a Nápoles planificado por la mejor organizadora de viajes (con *Power Point* incluido) y por el próximo viaje a

AGRADECIMIENTOS

Londres post-defensa que nos espera. Porque todavía nos queda mucho por vivir y compartir juntas, sea aquí en Valencia o en Buñol. Gracias. Y también agradecer a **Pasquale** su paso por el *lab*, que nos dejó momentos de risa y una experiencia 'napolitana' inolvidable enseñándonos cada uno de sus rincones intentando no morir en la carretera.

También agradecer a mis chicas de arriba: a **Ani**, contigo empecé y terminé esta aventura. Quien nos iba a decir a nosotras que acabaríamos aquí. Gracias por compartir este largo camino conmigo, por todos los agobios y dramas compartidos. ¡Lo conseguimos neni! A **Cris**, por animarme siempre que me veía en la cocina, porque algún que otro cotilleo siempre ha caído. Te deseo lo mejor. A **Isabel**, por las charlas científicas y no tan científicas en el cuarto del micro que nos ha sacado una que otra sonrisa. A **Marta Seco**, gracias por aparecer en los momentos críticos y por descubrirme el mundo de las PCR con 384 pocillos. A **Ángela y Aleks**, que a pesar de no haber coincidido mucho, ahí estuvieron cuando lo necesité. Por supuesto también agradecer y a animar a las nuevas incorporaciones del *lab*: Ana Crespo, Cris Benavides, Andrea Cejudo, Fernando y **Marta Lafarga**. Os deseo todo lo mejor en este nuevo camino. Marta, nuestra nueva predoc, ánimo en esa etapa, porque al final todo sale y tú vales. Me hubiese encantado haber podido compartir más tiempo contigo. Sabes que para lo que necesites estoy aquí.

Mi etapa en el *lab* tampoco hubiera sido posible sin mis 'pollitos', los que me han hecho crecer en lo profesional y, sobre todo, en lo personal. A **Sara**, mi primera 'pollito' italiana. A pesar de ser yo todavía una novata en este mundo, me demostró las ganas de aprender y conocer este mundillo de la investigación, Gracias. A **Esther**, por su implicación en el trabajo, por su apoyo y ayuda. Gracias por todos los bizcochos de café que nos han amenizado los días y las largas tardes de trabajo. ¡El FIR es todo tuyo! Y, sobre todo, dar las gracias a **Irene**, a mi mano derecha durante el último año de doctorado. Entre agobios y prisas, ahí estaba

ella para ayudarme a sacar mi trabajo adelante. Orgullosa estoy de todo lo que has aprendido y te deseo lo mejor, porque sé que vas a conseguir todo lo que te propongas. Tampoco quiero olvidar a mi chico despistado, a **Guillermo**. Por todos los días que me sacabas de quicio con tu desorden que al final acabé acostumbrándome, por conocer Torrent contigo, cuya misión era recuperar el ordenador del citómetro que tantos dolores de cabeza nos dio, por tus olvidos constantes, pero, sobre todo, gracias por compartir esta experiencia conmigo. Me hubiera encantado compartir bancada contigo mucho más tiempo, pero cada uno con su caja de puntas jaja, Gracias.

Agradecer también a todo equipo del animalario de la UCIM por su trabajo infinito, paciencia e implicación y por cuidar de mis ratones en mi ausencia. Sobre todo, a **Ana Díaz**, porque sin ella esto no podría haber sido posible. Gracias por acompañarme y hacer más amenas las complicadas cirugías que tantos dolores de cabeza nos han dado. Dar las gracias también al equipo de enfermeras del centro de Transfusiones por su colaboración en la recogida de muestras de sangre y a todos los donantes que han participado a que todo esto sea posible. Gracias.

Y, por último, y los más importantes, a mi familia. Gracias por apoyarme siempre y animarme a seguir en todas las decisiones que he tomado. Sobre todo, a **mis padres** por todo el esfuerzo que han hecho para que yo hoy esté aquí, por educarme y apoyarme siempre en todo lo que he hecho y, sobre todo, por soportarme todo este tiempo. Sin vosotros no hubiese sido posible. A mi **hermano**, mi otra mitad, que por mucho que crezca siempre será mi *Carlitos*, por hacer de hermano mayor muchas veces y por sacarme una sonrisa siempre, porque te quiero infinito y estoy orgullosa de ti. A mis **abuelos**, porque tengo la suerte de poder tenerlos conmigo y me alegra saber que han podido verme llegar hasta el final. A mi padrino **Julián** por su aportación en esta tesis la cual me ha

AGRADECIMIENTOS

hecho mucha ilusión. Y a todos los demás miembros de mi familia, tíos, primos grandes y pequeños, **GRACIAS**.



SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
Ang.I	Angiotensina I
Ang.II	Angiotensina II
ARA -	Antagonista del receptor de angiotensina
ARM	Antagonista del receptor mineralocorticoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNI	Antagonistas del receptor de angiotensina y de la neprilisina
α-SMA	Alfa actina del músculo liso
AT -	Receptor de angiotensina
AV	Auriculo-ventricular
BCA	Ácido bicinconínico
BNP	Péptido natriurético cerebral
CAM	Concentración alveolar mínima
MCP-1	Quimiocina quimioatrayente de monocitos 1
CDH2	cadherina 2 o N-cadherina
CE(s)	Célula endotelial/es
CF(s)	Cardiofibroblasto/s
CIL	Cilengitide
CIV	Comunicación interventricular
CM(s)	Cardiomiocito/s
COL1A1	Colágeno de tipo I
COL3A1	Colágeno de tipo III
C_T	Ciclo umbral
CT-1	Cardiotrofina-1
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo

SIGLAS Y ABREVIATURAS

CV	Cardiovascular
CXCL10/IP-10	Proteína 10 inducida por interferón gamma
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DDR2	Receptor de discoidina 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS⁻	Solución Salina de Fosfato de Dulbecco sin Ca ⁺² ni Mg ⁺²
E.E.M	Error estándar de la media
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	<i>"European Medicines Agency"</i> / Agencia Europea del Medicamento
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
EndMT	Transición endotelial-mesenquimal
Erk	Quinasa regulada por señales extracelulares
ET-1	Endotelina-1
ETFE	Etileno-Tetrafluoretileno
FAP	Proteína activadora de fibroblastos
FC	Frecuencia cardíaca
FDA	<i>"Food and Drug Administration"</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FGS-2	<i>"Fibroblast Growth Factor-2"</i>
FITC	Fluoresceína de isotiocianato
FM-2	<i>"Fibroblast-Medium 2"</i> / Medio para fibroblastos
FN	Fibronectina

FSC	<i>"Forward Scatter"</i> / Tamaño
FSP1	Proteína específica de fibroblastos 1
FVC	Fracción volumétrica de colágeno
FVCI	Fracción volumétrica de colágeno intersticial
GAL-3	Galectina-3
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
H₂O	Agua
HFA	<i>"Heart Failure Association"</i>
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HTA	Hipertensión arterial
i.p	Intraperitoneal (administración)
IAP-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
IC	Insuficiencia cardíaca
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
ICFEp	Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada
ICFEr	Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IL -	Interleucina-
IM	Infarto de miocardio
iSGLT2	Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2
LAD	Ligadura de la arteria coronaria descendente
LOS	Losartán
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MioFB(s)	Miofibroblasto/s

SIGLAS Y ABREVIATURAS

MMP	Metaloproteinasa
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio
no-CMs	no-cardiomiocitos
NTB	Nintedanib
NT-proBNP	Propéptido natriurético cerebral N-terminal
ON	Óxido nítrico
OPN	Osteopontina
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR -α, β	Receptor α , β del factor PDGF
PE	ficoeritrina
PFD	Pirfenidona
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfoinositide-3-quinasa
PICP	Propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I
PIIINP	Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III
PKC	Proteína quinasa C
PM	Peso molecular
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RCV	Riesgo cardiovascular
ROCK	Proteína quinasa asociada a Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s.c	Subcutánea (administración)
SBA	Suero bovino de albúmina
SFB	Suero fetal bovino
SEC	Sociedad Europea de Cardiología
SHAM	ratón operado de manera simulada (no ligadura)

SDS	Dodecil sulfato sódico
SNS	Sistema nervioso simpático
SPARC	Proteína secretada ácida rica en cisteína
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SSC	<i>"Side Scatter"</i> / complejidad y granulosidad
sST2	Isoforma soluble de supresión de tumorigenicidad 2
TAC	Constricción transversal de la aorta
TAK-1	Quinasa 1 activada por TGF- β_1
TBS-T	Solución salina tamponada con Tris y Tween
TCF21	Factor de transcripción 21
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa
TLR	<i>"toll-like receptors"</i> / Receptores tipo Toll
TNC	Tenascina-C
TNFR-1, 2	Receptor del factor de necrosis tumoral 1, 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSP	Trombospondina
TGF-βRI, II	Receptor tipo 1, 2 del factor TGF- β
UCIM	Unidad Central de Investigación de Medicina
v.o	Vía oral (administración)
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VD	Ventrículo derecho
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
VI	Ventrículo izquierdo
Ø	diámetro



RESUMEN-*ABSTRACT*

La fibrosis cardíaca es un proceso patológico asociado a la insuficiencia cardíaca (IC), caracterizado por la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) en el miocardio, producida principalmente por los cardiofibroblastos (CFs) activados a través del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β_1). Aunque no existen terapias farmacológicas específicamente dirigidas a la fibrosis cardíaca, y hay escasos estudios en células humanas, existen algunos fármacos aprobados para la fibrosis pulmonar [pirfenidona (PFD) – inhibidor de TGF- β_1 , y nintedanib (NTB) – inhibidor del receptor tirosina quinasa], mientras que otros se encuentran en fases preclínicas tempranas [cilengitide (CIL) – inhibidor de integrinas].

El objetivo fue analizar el efecto del NTB, CIL y PFD en la fibrosis cardíaca, comparado con losartán (LOS), inhibidor del receptor de la angiotensina II y parte de la terapia actual de la IC. En el cultivo primario de CFs humanos, solo el NTB mostró efectos reduciendo la expresión de genes profibróticos (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *CDH2*, TGF- β_1 y *PDGFR α*) y aumentando sorprendentemente la expresión de *ACTA2*, *S100A4* y *PDGFR β* . NTB no modificó la expresión de genes reguladores como, *MMP9* y *TIMP1*. El efecto *per se* del NTB normalizó a niveles basales la expresión de genes profibróticos incrementados por el TGF- β_1 (*COL1A1*, *ACTA2*, *CDH2*) y fue capaz de revertir la sorprendente disminución de la expresión de *S100A4*, y el esperado aumento de la *MMP9* inducido por el TGF- β_1 . Adicionalmente, el NTB disminuyó la migración de los CFs. La mayoría de estas acciones *per se* y de reversión del TGF- β_1 provocados por el NTB sugieren un efecto antifibrótico, pero la capacidad de incrementar el *ACTA2*, e incluso exacerbar el efecto del TGF- β_1 sobre este gen, sugiere un comportamiento muy singular en los CFs humanos. NTB se comportó de forma dual sobre la inflamación a nivel tisular y sistémica. En los CFs, NTB aumentó la expresión génica de *IL-6* y de las moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1. En cambio, a nivel sistémico, revirtió el aumento de la expresión de la molécula de adhesión (Mac-1) inducido por TNF- α en monocitos.

RESUMEN

El modelo *in vivo* de infarto de miocardio (IM) inducido por la ligadura de la arteria coronaria (LAD), a los 14 días de la cirugía aumentó significativamente la infiltración leucocitaria, el depósito de colágeno y la expresión de genes profibróticos (*col1a1*, *col3a1*, *fn1*, *timp1* y *tgf-β₁*) en el tejido cardíaco. Aunque la proliferación celular disminuyó, hubo una ligera tendencia al alza del proceso de angiogénesis. El tratamiento con NTB (LAD+NTB) aumentó significativamente los niveles plasmáticos de troponina I, la expresión génica de *il-6* y los genes *col1a1*, *fn1* y *timp1*, respecto al grupo LAD+vehículo, sugiriendo una respuesta de daño inflamatoria y fibrótica *per se* del NTB.

La particularidad del tejido cardíaco, variabilidad de especie y la génesis del daño pueden influir en la ineficacia del fármaco en el tratamiento de la fibrosis cardíaca.

Cardiac fibrosis is a pathological process associated with heart failure (HF), characterized by the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) in the myocardium, primarily produced by cardiac fibroblasts (CFs) activated through transforming growth factor beta 1 ($\text{TGF-}\beta_1$). Although there are no pharmacological therapies specifically targeting cardiac fibrosis and only limited studies on human cells, some drugs approved for pulmonary fibrosis are available [pirfenidone (PFD) – a $\text{TGF-}\beta_1$ inhibitor, and nintedanib (NTB) – a tyrosine kinase receptor inhibitor], while others are in early preclinical stages [cilengitide (CIL) – an integrin inhibitor].

The objective was to analyze the effects of NTB, CIL, and PFD on cardiac fibrosis, compared to losartan (LOS), an angiotensin II receptor inhibitor included in current HF therapy. In primary cultures of human CFs, only NTB showed effects by reducing the expression of profibrotic genes (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *CDH2*, $\text{TGF-}\beta_1$, and *PDGFR* α) while surprisingly increasing the expression of *ACTA2*, *S100A4*, and *PDGFR* β . NTB did not modify the expression of regulatory genes such as *MMP9* and *TIMP1*. The intrinsic effect of NTB normalized the basal levels of profibrotic genes elevated by $\text{TGF-}\beta_1$ (*COL1A1*, *ACTA2* and *CDH2*) and was able to reverse the surprising decrease in *S100A4* expression and the expected increase in *MMP9* induced by $\text{TGF-}\beta_1$. Additionally, NTB reduced CFs migration. Most of these intrinsic and $\text{TGF-}\beta_1$ -reversal effects of NTB suggest an antifibrotic effect; however, its ability to increase *ACTA2* and even exacerbate the $\text{TGF-}\beta_1$ effect on this gene suggests a highly unique behavior in human CFs.

NTB exhibited dual behavior regarding inflammation at both tissue and systemic levels. In CFs, NTB increased the gene expression of *IL-6* and adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1. Conversely, at the systemic level, it reversed the increase in the expression of the adhesion molecule (Mac-1) induced by $\text{TNF-}\alpha$ in monocytes.

ABSTRACT

In the *in vivo* myocardial infarction (MI) model induced by coronary artery ligation (*LAD*), after 14 days of surgery, there was a significant increase in leukocyte infiltration, collagen deposition, and the expression of profibrotic genes (*col1a1*, *col3a1*, *fn1*, *timp1*, and *tgf-β₁*) in cardiac tissue. Although cell proliferation decreased, there was a slight upward trend in the angiogenesis process. NTB treatment (*LAD*+NTB) resulted in significant increases in plasma troponin I levels, *il-6* gene expression, and profibrotic genes *col1a1*, *fn1*, and *timp1* in cardiac tissue, compared to the *LAD*+vehicle group, suggesting an inflammatory and fibrotic damage response intrinsic to NTB.

The particular characteristics of cardiac tissue, species variability, and damage genesis may influence the drug's inefficacy in treating cardiac fibrosis.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de mortalidad por cardiopatías isquémicas en el año 2021	3
Figura 2. Carga global de la insuficiencia cardíaca	4
Figura 3. Representación gráfica de los mecanismos fisiopatológicos del infarto de miocardio	5
Figura 4. Representación gráfica de la generación de fibrosis tras un estímulo patológico en el tejido cardíaco	8
Figura 5. Diversas vías moleculares implicadas en el proceso de fibrosis cardíaca	10
Figura 6. Regulación de la señalización del TGF- β_1 en la fibrosis cardíaca	13
Figura 7. Efectos fibrogénicos de péptido activo angiotensina II	15
Figura 8. Subtipos de receptores de angiotensina y sus diferentes funciones implicadas en el proceso fibrótico	16
Figura 9. Efectos de la aldosterona en la enfermedad cardiovascular	18
Figura 10. Componentes celulares de un corazón humano adulto	22
Figura 11. Cultivo de CFs humanos primarios	23
Figura 12. Funciones de los CFs e implicaciones en el proceso fibrótico	26
Figura 13. Origen de los CFs durante el desarrollo embrionario o durante un proceso patológico	27
Figura 14. Representación general de la estructura de la matriz extracelular sana presente en el tejido cardíaco	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 15. Representación general de la estructura de la matriz extracelular cardíaca tras sufrir un daño	41
Figura 16. Representación histológica de la fibrosis reparativa o de reemplazo generada en el tejido cardíaco tras una lesión	42
Figura 17. Representación histológica de la fibrosis reactiva o intersticial generada en el tejido cardíaco tras una lesión	42
Figura 18. Representación histológica de la fibrosis perivascular generada en el tejido cardíaco tras una lesión	43
Figura 19. Agentes farmacológicos en fase de investigación clínica dirigidas contra las vías centrales de la fibrosis en diferentes órganos	49
Figura 20. Protocolo experimental de tratamiento para inducir fibrosis en el cultivo primario de CFs humanos mediante estímulos profibróticos	58
Figura 21. Protocolo experimental de tratamiento de los CFs humanos primarios con los fármacos experimentales	59
Figura 22. Metabolización de la sal de MTT a formazán	60
Figura 23. Histograma representativo de los cambios morfológicos observados en los CFs humanos primarios tras el tratamiento farmacológico	62
Figura 24. Histograma representativo del proceso celular de apoptosis-necrosis en los CFs humanos primarios tras el tratamiento farmacológico	63
Figura 25. Representación gráfica del ensayo de migración celular en los CFs humanos primarios	65
Figura 26. Identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias obtenidas en el citómetro de flujo	74

Figura 27. Mesa de operaciones, junto con el instrumental quirúrgico necesario, para llevar a cabo la cirugía en ratones	77
Figura 28. Procedimiento quirúrgico llevado a cabo para inducir infarto de miocardio en ratones (modelo <i>LAD</i>)	79
Figura 29. Protocolo experimental llevado a cabo en el procedimiento <i>in vivo</i>	81
Figura 30. Equipo de HPLC de la Sección de imagen Biomédica y Metabolómica de la UCIM para las determinaciones de las concentraciones plasmáticas del fármaco Nintedanib	83
Figura 31. Imagen representativa de los cortes transversales realizados en los corazones murinos	85
Figura 32. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la viabilidad de los CFs humanos primarios	103
Figura 33. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión génica de marcadores que constituyen y regulan la matriz extracelular en los CFs humanos primarios	105
Figura 34. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión génica de marcadores implicados en diversos procesos celulares tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	106
Figura 35. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión de proteínas que conforman la matriz extracelular tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	107
Figura 36. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión de la proteína α -SMA tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	109
Figura 37. Efecto de los potenciales fármacos antifibróticos sobre la viabilidad de los CFs humanos primarios	110

Figura 38. Efecto del fármaco Nintedanib sobre el proceso celular de apoptosis-necrosis en los CFs humanos primarios	111
Figura 39. Efecto del fármaco Losartán sobre el proceso celular de apoptosis-necrosis en los CFs humanos primarios	112
Figura 40. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la morfología de los CFs humanos primarios	113
Figura 41. Efecto del fármaco LOS sobre la morfología de los CFs humanos primarios	114
Figura 42. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de componentes y reguladores de la matriz extracelular tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	119
Figura 43. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de marcadores involucrados en diversos procesos celulares tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	120
Figura 44. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	121
Figura 45. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión génica de componentes y reguladores de la matriz extracelular tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	122
Figura 46. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión génica de marcadores involucrados en diversos procesos celulares tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	123
Figura 47. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	124

Figura 48. Efecto del fármaco Pirfenidona sobre la expresión génica de diversos marcadores involucrados en el proceso fibrótico tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	125
Figura 49. Efecto del fármaco Cilengitide sobre la expresión génica de diversos marcadores involucrados en el proceso fibrótico tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	127
Figura 50. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión de diversas proteínas implicadas en el proceso fibrótico tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	131
Figura 51. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 tras el tratamiento de los CFs humanos primarios	132
Figura 52. Efecto del fármaco Nintedanib sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios	134
Figura 53. Efecto del fármaco Losartán sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios	135
Figura 54. Efecto del fármaco Pirfenidona sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios	136
Figura 55. Efecto del fármaco Cilengitide sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios	137
Figura 56. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión de las moléculas de adhesión CD11b y CD18 tras el tratamiento de la sangre entera	139
Figura 57. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión de las moléculas de adhesión CD11b y CD18 tras el tratamiento de la sangre entera	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 58. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la supervivencia de los animales de experimentación durante 14 días de procedimiento	141
Figura 59. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre el peso corporal y el peso del corazón durante los 14 días de procedimiento	143
Figura 60. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre el grado de infiltración leucocitaria en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	145
Figura 61. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre el grado de fibrosis generado en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	148
Figura 62. Análisis de correlación entre el grado de infiltración leucocitaria y el grado de fibrosis generado en los cortes de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales tras 14 días de procedimiento	150
Figura 63. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la proliferación celular en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	152
Figura 64. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión de CD31 en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	154
Figura 65. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre los biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco tras 14 días de procedimiento	156
Figura 66. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	158

Figura 67. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión génica de marcadores que constituyen y regulan la matriz extracelular en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	160
---	------------

Figura 68. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión génica de marcadores involucrados en diversos procesos celulares en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento	161
--	------------



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Complicaciones funcionales postinfarto	6
Tabla 2. Efectos del infarto de miocardio sobre la matriz extracelular en las etapas tempranas y tardías de la fibrosis	9
Tabla 3. Marcadores de CFs y MioFBs presentes en el corazón	29
Tabla 4. Biomarcadores cardíacos empleados para el diagnóstico de la fibrosis/insuficiencia cardíaca	44
Tabla 5. Estrategias farmacológicas actuales para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca	46
Tabla 6. Fases de desarrollo de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas implicadas en la fibrosis	48
Tabla 7. Estímulos profibróticos seleccionados para inducir fibrosis en un cultivo primario de CFs humanos	58
Tabla 8. Tratamiento de los CFs humanos primarios con los fármacos experimentales	59
Tabla 9. Moléculas de adhesión analizadas en los CFs humanos primarios mediante citometría de flujo	64
Tabla 10. Pares de cebadores humanos empleados para el análisis génico mediante qPCR	68
Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para el análisis proteico mediante <i>Western Blot</i>	72
Tabla 12. Reveladores empleados para la detección proteica mediante la técnica de quimioluminiscencia	72
Tabla 13. Moléculas de adhesión leucocitarias medidas en sangre procedente de donantes sanos mediante citometría de flujo	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 14. Grupos experimentales de tratamiento en el modelo <i>in vivo</i>	80
Tabla 15. Biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco detectados mediante <i>ELISA</i>	84
Tabla 16. Clasificación del grado de inflamación en función del área lesionada en el tejido cardíaco	87
Tabla 17. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de Ki67 y CD31 en el tejido cardíaco mediante la técnica de inmunohistoquímica	90
Tabla 18. Pares de cebadores murinos empleados para el análisis génico mediante qPCR	93
Tabla 19. Reactivos generales empleados	94
Tabla 20. Fármacos y estímulos empleados en el modelo <i>in vitro</i> para el tratamiento de los CFs humanos primarios	95
Tabla 21. Kits y <i>ELISAs</i> empleados	95
Tabla 22. Anticuerpos empleados para la técnica <i>Western Blot</i>	96
Tabla 23. Anticuerpos empleados para citometría de flujo	96
Tabla 24. Fármacos empleados en el modelo <i>in vivo</i>	96
Tabla 25. Anticuerpos empleados para la inmunohistoquímica del tejido cardíaco	97
Tabla 26. Tabla resumen del efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de marcadores profibróticos en los CFs humanos primarios	129

Tabla 27. Correlaciones significativas obtenidas entre los distintos biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco con los distintos genes profibróticos analizados en los distintos grupos experimentales de ratones	162
Tabla 28. Valores de <i>SCORE</i> asignados de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental	245
Tabla 29. Valores asignados tras la cuantificación de los depósitos de colágeno (% fibrosis) de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental	246
Tabla 30. Valores asignados tras la cuantificación del índice de Ki67 de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental	247
Tabla 31. Valores asignados tras la cuantificación del número de vasos positivos para CD31 de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental	248



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: CARDIOPATÍAS ISQUÉMICAS E INSUFICIENCIA CARDÍACA	1
2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS CARDIOPATÍAS ISQUÉMICAS E INSUFICIENCIA CARDÍACA	4
3. RELEVANCIA DE LA FIBROSIS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA	7
3.1. CONCEPTO DE FIBROSIS	7
3.2. VÍAS Y MEDIADORES DE SEÑALIZACIÓN DE LA FIBROSIS CARDÍACA..	10
3.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-β).....	11
3.2.1.1. Isoforma TGF-β	11
3.2.1.2. Vías de señalización del TGF-β.....	11
3.2.1.3. Implicación del TGF-β en la fibrosis cardíaca.....	13
3.2.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA).....	14
3.2.3. OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL PROCESO FIBRÓTICO	18
3.2.3.1. Quimiocinas y citocinas	18
3.2.3.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	19
3.2.3.3. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).....	19
3.2.3.4. Endotelina-1 (ET-1)	20
3.2.3.5. Moléculas de superficie: Integrinas	20
3.3. CÉLULAS EFECTORAS DE LA FIBROSIS CARDÍACA	21
3.3.1. CARDIOFIBROBLASTOS	22
3.3.1.1. Origen de los cardiofibroblastos	23
3.3.1.2. Funciones cardíacas de los cardiofibroblastos.....	24
3.3.1.3. Activación de los cardiofibroblastos: miofibroblastos	26
3.3.1.4. Marcadores de cardiofibroblastos y miofibroblastos	28
3.3.2. CARDIOMIOCITOS.....	30
3.3.3. CÉLULAS ENDOTELIALES	30
3.3.4. CÉLULAS INMUNITARIAS.....	31
3.4. MATRIZ EXTRACELULAR Y COLÁGENO.....	33
3.4.1. MORFOLOGÍA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	33
3.4.2. COMPOSICIÓN Y REGULACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR .	35
3.4.3. IMPLICACIONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA FIBROSIS CARDÍACA.....	37
3.5. REMODELADO CARDÍACO	38
3.5.1. TIPOS DE LESIONES FIBRÓTICAS	41

ÍNDICE

3.6.	DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS CARDÍACA: BIOMARCADORES	43
4.	ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS ACTUALES EN EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDÍACA.....	45
5.	PERSPECTIVAS DE FUTURO EN EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS CARDÍACA	47
II.	OBJETIVOS.....	53
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	57
BLOQUE I: EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>		57
1.	CULTIVO DE CARDIOFIBROBLASTOS HUMANOS PRIMARIOS	57
1.1.	MUESTRA EXPERIMENTAL	57
1.2.	PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	57
1.2.1.	EFECTO DE ESTÍMULOS PROFIBRÓTICOS	57
1.2.2.	EFECTO DE POTENCIALES FÁRMACOS ANTIFIBRÓTICOS	58
1.3.	ENSAYOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS.....	60
1.3.1.	ENSAYOS FUNCIONALES.....	60
1.3.1.1.	Ensayo de viabilidad celular.....	60
1.3.1.2.	Citometría de flujo. Cambios morfológicos, apoptosis celular y moléculas de adhesión.....	61
1.3.1.3.	Ensayo de migración celular	64
1.3.2.	ENSAYOS DE EXPRESIÓN	65
1.3.2.1.	PCR cuantitativa en tiempo real. Expresión génica	65
1.3.2.2.	Western Blot. Expresión proteica.....	68
2.	SANGRE ENTERA DE DONANTES SANOS	73
2.1.	MUESTRA EXPERIMENTAL	73
2.2.	PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	73
2.3.	CITOMETRÍA DE FLUJO. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ..	73
BLOQUE II: EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>. MODELO MURINO DE FIBROSIS CARDÍACA		75
1.	MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	75
1.1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	75

1.2.	ETAPA PREQUIRÚRGICA.....	75
1.3.	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	77
2.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	80
2.1.	TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	80
2.2.	SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES. ETAPA POSTQUIRÚRGICA	81
2.3.	SACRIFICIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS	82
2.3.1.	RECOLECCIÓN DE LA SANGRE.....	82
2.3.2.	RECOLECCIÓN DEL CORAZÓN	82
3.	ENSAYOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS	83
3.1.	MUESTRAS DE SANGRE	83
3.1.1.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). NIVELES PLASMÁTICOS DE FÁRMACO	83
3.1.2.	INMUNOENSAYOS ABSORBENTES A ENZIMAS (ELISA). DETECCIÓN DE BIOMARCADORES CARDÍACOS.....	84
3.2.	MUESTRAS DE CORAZÓN	84
3.2.1.	CORTES HISTOLÓGICOS.....	84
3.2.1.1.	Tinciones histológicas	85
3.2.1.1.1.	Tinción eosina-hematoxilina. Determinación de la infiltración leucocitaria.....	85
3.2.1.1.2.	Tinción Sirius Red. Determinación del depósito de colágeno.....	87
3.2.1.2.	Inmunohistoquímica. Detección de Ki67 y CD31.....	88
3.2.2.	PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL. EXPRESIÓN GÉNICA	92
4.	REACTIVOS.....	94
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	97
IV.	RESULTADOS	103
BLOQUE I:	RESULTADOS EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	103
1.	CULTIVO DE CARDIOFIBROBLASTOS HUMANOS PRIMARIOS	103
1.1.	SELECCIÓN DE LOS ESTÍMULOS PROFIBRÓTICOS	103
1.1.1.	ESTUDIOS SOBRE LA TOXICIDAD CELULAR.....	103
1.1.2.	EFFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE MARCADORES PROFIBRÓTICOS.....	104

ÍNDICE

1.1.2.1.	Efectos sobre la expresión génica	104
1.1.2.2.	Efectos sobre la expresión proteica.....	106
1.2.	EFFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIFIBRÓTICOS	110
1.2.1.	ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CELULAR DE LOS FÁRMACOS.....	110
1.2.1.1.	Efecto sobre la viabilidad celular	110
1.2.1.2.	Efecto sobre el proceso de apoptosis-necrosis.....	111
1.2.1.3.	Efecto sobre la morfología.....	112
1.2.2.	EFFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES FIBRÓTICOS	114
1.2.2.1.	Componentes y reguladores de la matriz extracelular	115
1.2.2.2.	Marcadores de señalización, regulación y contracción celular.....	116
1.2.2.3.	Reguladores del crecimiento y proliferación celular	117
1.2.2.4.	Marcadores proinflamatorios.....	117
1.2.3.	EFFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL PROCESO FIBRÓTICO.....	130
1.2.3.1.	Análisis de la expresión de las moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1.....	132
1.2.4.	EFFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR..	133
2.	SANGRE DE DONANTES SANOS	138
2.1.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS: CD11b y CD18.....	138
 <u>BLOQUE II: RESULTADOS EXPERIMENTACIÓN IN VIVO. MODELO MURINO DE LIGADURA TRANSITORIA DE LA ARTERIA CORONARIA</u>		
141		
1.	EFFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA SUPERVIVENCIA, PESO CORPORAL Y PESO DEL CORAZÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	141
2.	EFFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA EN EL TEJIDO CARDÍACO.....	144
3.	EFFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA FIBROSIS GENERADA EN EL TEJIDO CARDÍACO.....	147
4.	EFFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS.....	151
5.	EFFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE DAÑO CARDÍACO	155

6.	EFFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GÉNICA DE MARCADORES PROFIBRÓTICOS Y PROINFLAMATORIOS ...	157
7.	NIVELES PLASMÁTICOS DE FÁRMACO	163
V.	DISCUSIÓN.....	167
VI.	CONCLUSIONES	193
VII.	BIBLIOGRAFÍA	199
VIII.	ANEXOS	245
IX.	CERTIFICADOS	253



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: CARDIOPATÍAS ISQUÉMICAS E INSUFICIENCIA CARDÍACA

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen un grupo heterogéneo de patologías crónicas entre las que se encuentran: la cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca (IC). Actualmente, este grupo de enfermedades ocupan el primer lugar de las causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, seguido por los tumores (cáncer) y las enfermedades respiratorias. Datos recogidos en el año 2019, estiman que aproximadamente 18 millones de personas fallecieron a causa de una ECV, principalmente como consecuencia de un infarto de miocardio (IM) y por accidentes cerebrovasculares, representando el 32% de las muertes en todo el mundo. En 2021, Europa se situó dentro de los territorios donde la tasa de mortalidad debido a las ECV era más baja (178.1 muertes por cada 100.000 habitantes), situándose España en el grupo de países con una de las tasas de mortalidad más bajas (77.1 muertes por cada 100.000 habitantes) **(1,2)**. Estas tasas de mortalidad son dependientes tanto de los factores de riesgo (edad avanzada, sexo, antecedentes familiares de enfermedad coronaria temprana, dislipidemia, diabetes mellitus (particularmente de tipo 2), tabaquismo, obesidad, inactividad física, etc.), así como de la atención sociosanitaria de cada país **(3)**.

No obstante, en España, el grupo de ECV se mantuvo como primera causa de muerte en el año 2022 (cardiopatías isquémicas y accidentes cerebrovasculares, entre los más frecuentes), representando el 26% de las defunciones totales (252.2 muertes por cada 100.000 habitantes).

INTRODUCCIÓN

Cardiopatías isquémicas

Las cardiopatías isquémicas, también conocidas como enfermedades de las arterias coronarias, ocupan el primer puesto de mortalidad dentro de las ECV a nivel mundial, siendo responsables de aproximadamente 9 millones de muertes (101.7 muertes por cada 100.000 habitantes, dato del año 2019), y suponiendo un 12.6% de la mortalidad a nivel mundial, seguida de los ataques al corazón y las enfermedades cardíacas hipertensivas (1,4).

En nuestro país, las cardiopatías isquémicas han ido en aumento en los últimos años, siendo tres veces mayor en hombres que en mujeres. Según el último Informe Anual del Sistema Nacional de Salud del 2022 publicado por el Ministerio de Sanidad (5), el 2.3% de la población padece una cardiopatía isquémica.

La cardiopatía isquémica puede acabar dando lugar a un IM, una angina de pecho o lo que se conoce como 'isquemia silenciosa', viéndose exacerbadas por diversos factores de riesgo (1,2,6). Tal y como se puede observar en la **Figura 1**, la tasa de mortalidad debido a las cardiopatías isquémicas tiende a ser más alta en territorios como África y Asia que en Europa y América del Norte, situándose el continente europeo en el grupo de territorios con la tasa de mortalidad más baja (95.6 muertes por cada 100.000 habitantes, dato del año 2021).

Después de un evento isquémico de naturaleza aguda o crónica, así como a la presencia de otras cardiopatías congénitas, puede desencadenarse en el paciente una IC. Esta condición se caracteriza por una disminución en la capacidad funcional del corazón, lo que dificulta una perfusión sanguínea adecuada hacia los órganos y tejidos del organismo.

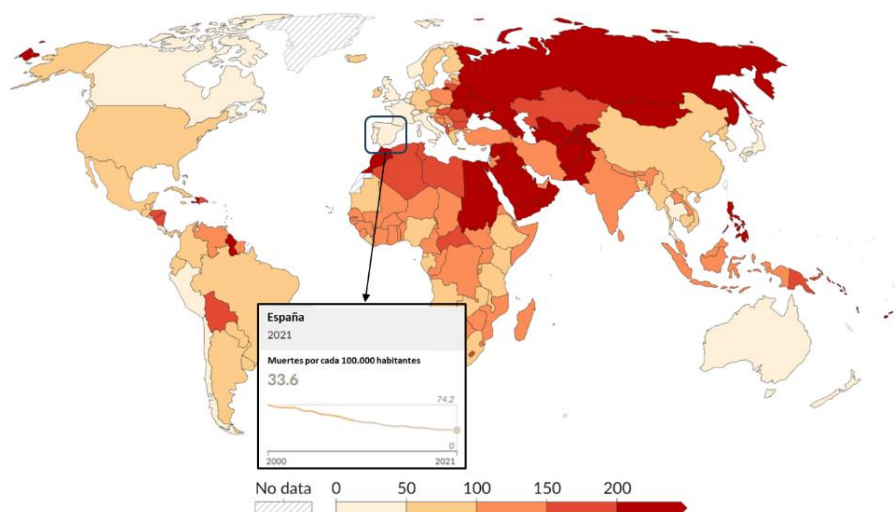


Figura 1. Tasa de mortalidad por cardiopatías isquémicas en el año 2021. En la figura se muestran las tasas estimadas de mortalidad, ajustadas por edad, de las cardiopatías isquémicas por cada 100.000 habitantes. La alta tasa de mortalidad viene representada por la intensidad de color, siendo la de mayor tasa la del color rojo. En concreto, se especifica la tasa de mortalidad en España por cada 100.000 habitantes, situándose dentro de los países con una tasa baja de mortalidad. Figura extraída y adaptada de (2).

Insuficiencia cardíaca

La IC es considerada una ‘pandemia mundial’ debido a su alta morbilidad y mortalidad, afectando a aproximadamente 64.3 millones de personas globalmente. En países desarrollados, la prevalencia de la IC en la población adulta varía entre el 1-3%, siendo la principal causa de hospitalización en pacientes mayores de 65 años en el mundo occidental. En el año 2017, las tasas más altas de prevalencia, ajustadas por edad, se encontraron en Europa central, en el norte de África y en Oriente Medio, mientras que las más bajas en Europa oriental y en el sudeste asiático (7). En 2019, se alcanzó una prevalencia de 56.2 millones de casos notificados a nivel mundial (8). Según las estadísticas de 2018 de enfermedades cardíacas y accidentes cerebrovasculares, entre el 17% y el 21% de las personas mayores de 45 años que habían tenido el primer IM, presentaron IC después de un seguimiento de 5 años (9). En el proyecto ATLAS

INTRODUCCIÓN

realizado en Europa por la “Heart Failure Association” (HFA) y la Sociedad Europea de Cardiología (SEC) en el año 2019, estimó una prevalencia media de 17 por cada 1.000 habitantes y, en concreto, en España oscilaba entre ≤ 12 (10). El envejecimiento poblacional y los avances en el tratamiento han incrementado el número de personas que padecen una IC. La mortalidad sigue siendo alta, con tasas de supervivencia de 87% al primer año y 35% a los 10 años (11). Este crecimiento supone un importante coste económico para los sistemas de salud, estimada en 31.000 millones de dólares a nivel mundial y se estima que para el 2030 alcance los 70.000 millones de dólares. En concreto, en España, el coste por paciente varía entre 12.000 y 20.000€ anuales (**Figura 2**) (12).

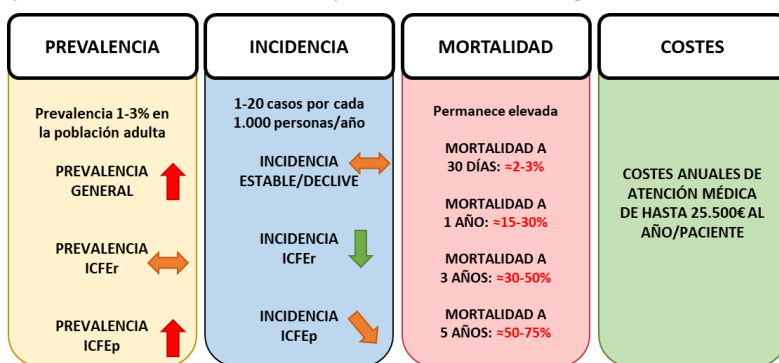


Figura 2. Carga global de la insuficiencia cardíaca. En la figura se muestra un cuadro resumen de la prevalencia, incidencia, mortalidad y costes económicos que supone la IC a nivel mundial. Figura extraída y adaptada de (12). **ICFeR**: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida; **ICFeP**: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada.

2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS CARDIOPATÍAS ISQUÉMICAS E INSUFICIENCIA CARDÍACA

Cardiopatías isquémicas

El IM es una de las manifestaciones clínicas más graves y agudas de las cardiopatías isquémicas. La falta total o parcial de oxígeno de manera prolongada, inicialmente conlleva a una respuesta inflamatoria, seguida de un daño tisular (muerte de los cardiomiocitos) que se traduce en una disfunción

contráctil y eléctrica del corazón. El IM afecta sobre todo al ventrículo izquierdo, pero dependiendo de la extensión de la lesión también pueden verse afectados el ventrículo derecho y las aurículas (**13,14**). Existen diversos factores de riesgo cardiovascular (RCV) que contribuyen al desarrollo del IM. Los mecanismos fisiopatológicos por los que se produce el IM se pueden dividir en causas ateroscleróticas o causas no ateroscleróticas. En el primer caso, la placa de ateroma se forma como consecuencia de la acumulación de grasa en la pared de las arterias (**aterosclerosis**) y su rotura provoca coágulos que pueden obstruir el flujo de sangre hacia las arterias coronarias. Otras causas **no ateroscleróticas** responsables del IM pueden ser: vasoespasmos de las arterias coronarias, disfunción de la microvasculatura coronaria, trombosis coronaria y en menor medida, disección espontánea de la arteria coronaria (**Figura 3**) (**15**).

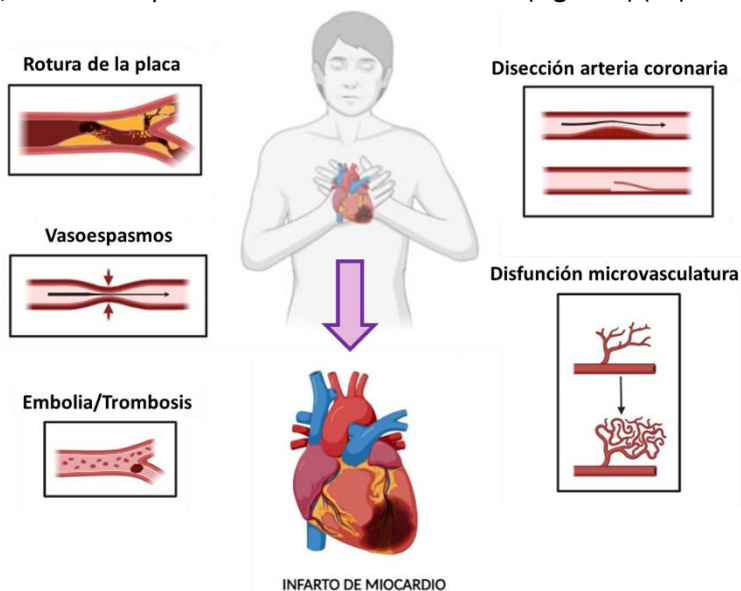


Figura 3. Representación gráfica de los mecanismos fisiopatológicos del infarto de miocardio. El IM puede originarse por causas ateroscleróticas (rotura de la placa de ateroma) o por causas no ateroscleróticas (vasoespasmos, embolia/trombo, disección espontánea de la arteria coronaria y disfunción de la microvasculatura). Figura creada con BioRender.com.

Las consecuencias postinfarto dependerán del tamaño del área infartada, del aumento en la presión de llenado del ventrículo izquierdo y del grado de

INTRODUCCIÓN

disminución del gasto cardíaco y, pueden ser tanto mecánicas como eléctricas (Tabla 1).

Tabla 1. *Complicaciones funcionales postinfarto.*

COMPLICACIONES POSTINFARTO	
COMPLICACIONES MECÁNICAS	COMPLICACIONES ELÉCTRICAS
Rotura del tabique interventricular postinfarto (CIV) (16)	Arritmias (17): - Bradicardias (↓FC) - Taquicardias (↑FC)
Rotura cardíaca (16)	
Insuficiencia mitral isquémica aguda (16)	
Shock cardiogénico (18)	Defectos en la conducción eléctrica (19): - Bloqueo del nodo AV - Bloqueo de la rama izquierda del fascículo de His

Las complicaciones mecánicas son aquellas debidas al daño físico producido en el tejido cardíaco como resultado de la necrosis del miocardio, mientras que las complicaciones eléctricas son aquellas provocadas por alteraciones en el sistema de conducción eléctrica del corazón. **CIV**: comunicación interventricular; **FC**: frecuencia cardíaca; **AV**: auriculo-ventricular.

A pesar de que todas estas complicaciones presentan una baja incidencia (ej.: la rotura del tabique interventricular o la rotura cardíaca), todas ellas son graves y presentan una elevada tasa de mortalidad entre los pacientes que han sufrido un IM. Las consecuencias en los pacientes que sobreviven pueden desembocar en una fibrosis en el tejido miocárdico, que conduce a una IC.

Insuficiencia cardíaca

La IC es un síndrome clínico causado por diversas enfermedades cardíacas que afectan a la estructura y función del miocardio, alterando el llenado o la eyección del ventrículo y reduciendo el gasto cardíaco, lo que provoca una sobrecarga de líquidos en el corazón (20). La IC puede clasificarse como aguda o crónica y funcionalmente en dos tipos: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada (ICFEp), donde el ventrículo izquierdo no se relaja adecuadamente,

dificultando su llenado; e insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida (ICFEr), donde el ventrículo no se contrae con suficiente fuerza, limitando la cantidad de sangre que el corazón bombea (21).

La cardiopatía isquémica es el principal factor de riesgo para el desarrollo de IC (65% para hombres y el 48% para las mujeres) (22), y existen otras cardiopatías no estrictamente isquémicas que afectan a las válvulas cardíacas, los vasos y al propio músculo cardíaco que son también causa de IC. Independientemente del mecanismo fisiopatológico que genere la IC (sobrecarga hemodinámica, disfunción isquémica, sobreestimulación neurohumoral, etc.), a nivel tisular, la IC puede venir asociada a un remodelado ventricular (alteración del tamaño, forma y función del corazón) y a una fibrosis reactiva en respuesta al daño o a cualquiera de los estímulos mencionados (20).

3. RELEVANCIA DE LA FIBROSIS EN LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

3.1. CONCEPTO DE FIBROSIS

La fibrosis cardíaca es una de las consecuencias patológicas asociadas a las ECV. Esta condición patológica se manifiesta tras un daño en el tejido cardíaco [isquemia, elevación persistente de la presión arterial, niveles altos de glucosa, cardiopatías congénitas, etc.,] que conduce a un depósito excesivo de fibras de colágeno y proteínas de la matriz extracelular (MEC) por parte de las células cardíacas, acompañado de una hipertrofia de los cardiomiocitos. Este exceso en la MEC contribuye a la distorsión de la arquitectura cardíaca, promoviendo la disfunción del corazón e IC (23,24). Tras el daño, el corazón sufre un proceso de remodelado estructural y funcional en el que participan diferentes células cardíacas, entre las cuales se incluyen los cardiomiocitos, las células endoteliales, las células del sistema inmunitario y los cardiofibroblastos (CFs) (Figura 4). El proceso de fibrosis cardíaca está mediado principalmente por los CFs que, una

INTRODUCCIÓN

vez activados, se diferencian a CFs activados o, también denominados miofibroblastos cardíacos (MioFBs) (25–29).

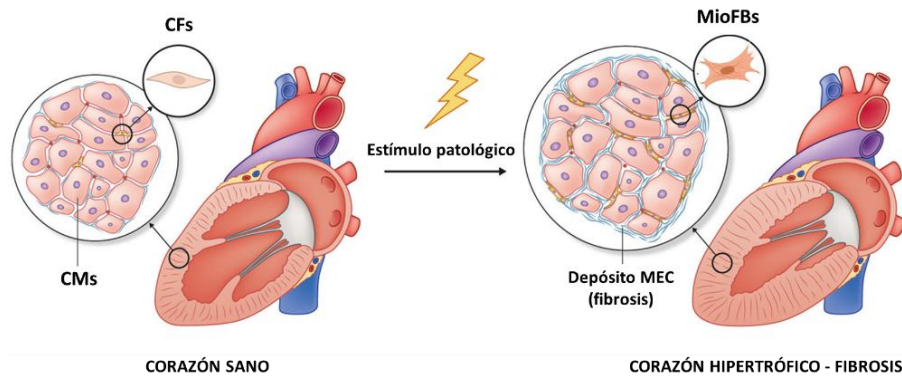


Figura 4. Representación gráfica de la generación de fibrosis tras un estímulo patológico en el tejido cardíaco. Tras un daño, se produce un exceso de depósito de la MEC y la diferenciación de los CFs a MioFBs. Todo ello provoca un engrosamiento y rigidez de la pared del ventrículo izquierdo, que conduce a una IC. Figura creada con BioRender.com. **CFs**: cardiofibroblastos; **CMs**: cardiomiocitos; **MioFBs**: miofibroblastos; **MEC**: matriz extracelular.

La fibrosis cardíaca inducida por un IM sigue una secuencia de tres fases programadas: **I. Fase inflamatoria**, **II. Fase proliferativa** y **III. Fase de maduración** (30).

I. Fase inflamatoria: la muerte de los cardiomiocitos provoca la activación de la respuesta inmunitaria innata en la que los CFs, en la zona isquémica, adoptan un fenotipo inflamatorio provocando la liberación de mediadores inflamatorios y atrayendo a células inmunitarias, como los leucocitos (neutrófilos), a la zona dañada que degradan la MEC para facilitar la migración celular (31).

II. Fase proliferativa: tras la resolución de la fase inflamatoria, se activan las células mononucleares y los macrófagos que secretan factores de crecimiento. Estos factores reclutan CFs y MioFBs que depositan proteínas de la MEC en el tejido de granulación [$\uparrow$ colágeno, $\uparrow$ alfa actina del músculo liso (α -SMA)], formando la base de la cicatriz y manteniendo la estructura del tejido (31).

III. Fase de maduración: las células reparadoras mueren por apoptosis y el tejido granular es reemplazado por una cicatriz de colágeno. A medida que la cicatriz madura, se produce una reticulación del colágeno, incrementando la resistencia de la cicatriz que afecta a la función cardíaca (32). Esto conduce a un remodelado ventricular, IC y posibles alteraciones eléctricas en el corazón (arritmias) (33).

Además, en función de la etapa en la que se encuentra el proceso fibrótico en un órgano o tejido, podemos diferenciar la fibrosis en fase temprana (comienza inmediatamente después de la lesión) o fase tardía (comienza semanas después de la lesión y puede alargarse años) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del infarto de miocardio sobre la matriz extracelular en las etapas tempranas y tardías de la fibrosis.

FASE TEMPRANA DE LA FIBROSIS	FASE TARDÍA DE LA FIBROSIS
- Migración de células inmunitarias a la zona del infarto. - ↑ quimiotaxis de CFs estimulados por TGF-β. - Proliferación de CFs y diferenciación a MioFBs. - Inflamación celular y necrosis de los CMs. - ↑ actividad MMPs. - Expresión TIMPs en la zona del infarto. - ↑ colágeno tipo III/colágeno tipo I. - ↑ estrés sistólico y diastólico. - Deformación del tejido. - ↑ acortamiento del miocardio, ↑ FC.	- Dilatación continua del VI. - Remodelado del VI. - Hipertrofia de los CMs. - Necrosis continua de los CMs → fibrosis reparativa o de reemplazo. - Hipertrofia mural de la pared del VI. - ↓ colágeno tipo III/colágeno tipo I. - Acumulación de colágeno en la zona infartada. - Formación de cicatrices. - Hipertrofia del VI.

CFs: cardiofibroblastos; **CMs:** cardiomiocitos; **MioFBs:** miofibroblastos; **TGF-β:** factor de crecimiento transformante beta; **MMPs:** metaloproteinasas de la matriz; **TIMPs:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas; **FC:** frecuencia cardíaca; **VI:** ventrículo izquierdo.

Además, cabe destacar que, si la fibrosis tardía perdura en el tiempo, se establece una ‘fibrosis reactiva o patológica’ que acaba alterando la función normal del corazón.

INTRODUCCIÓN

3.2. VÍAS Y MEDIADORES DE SEÑALIZACIÓN DE LA FIBROSIS CARDÍACA

Se han descrito varias vías moleculares implicada en el proceso de fibrosis cardíaca dependiendo de la causa subyacente que desencadene la reacción fibrótica. Las señales inflamatorias parecen ser más importantes en la fibrosis reparativa e isquémica y se asocian con una intensa activación de las vías de señalización de citocinas y quimiocinas. Por otro lado, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y los factores de crecimiento fibrótico, como la señalización del factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$) y la señalización del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), parecen estar implicados en la mayoría de las afecciones cardíacas fibróticas independientemente de la causa que lo desencadene (**Figura 5**) (23).

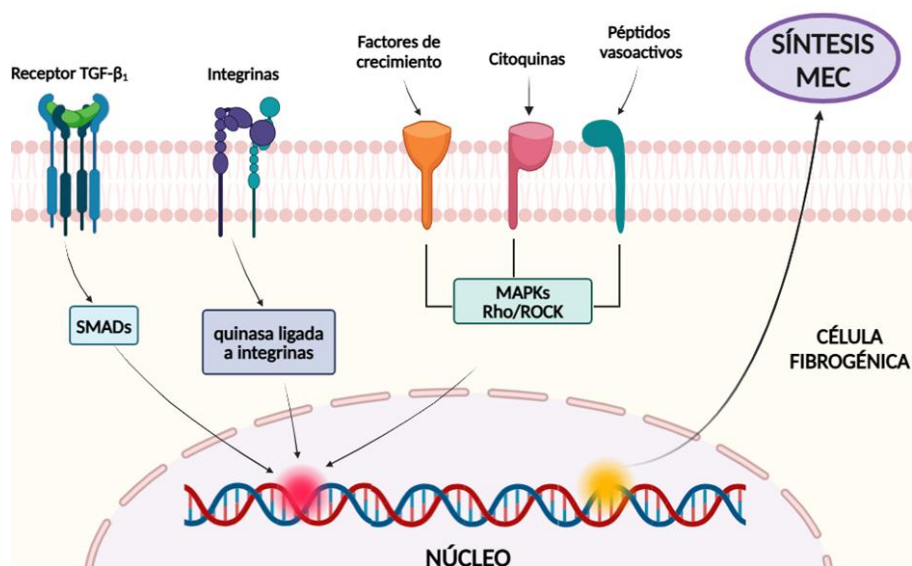


Figura 5. Diversas vías moleculares implicadas en el proceso de fibrosis cardíaca. Diversos receptores de membrana, como el receptor del $\text{TGF-}\beta_1$, integrinas, receptores para factores de crecimiento, citocinas y péptidos vasoactivos, activan rutas intracelulares específicas. Estas incluyen SMADs, quinasas ligadas a integrinas, MAPKs, y las vías Rho/ROCK, que conducen a la modulación de la expresión génica en el núcleo. El resultado es el aumento en la síntesis de proteínas de la MEC, característica del proceso fibrogénico en condiciones de daño tisular o remodelado patológico. **$\text{TGF-}\beta_1$** : factor de crecimiento transformante beta 1; **MAPKs**: proteína quinasa activadas por mitógenos; **ROCK**: proteína quinasa asociada a Rho; **MEC**: matriz extracelular. Figura creada con BioRender.com

3.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

3.2.1.1. Isoforma TGF- β

El TGF- β es un importante regulador de la fibrosis cardíaca, siendo el factor fibrogénico más estudiado (34). Este factor de crecimiento se presenta en tres isoformas distintas, codificadas por genes distintos: TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 . Aunque las tres isoformas utilizan los mismos receptores en la superficie celular [principalmente los receptores TGF- β tipo I (TGF- β RI) y tipo II (TGF- β RII)] y comparten objetivos comunes, tienen patrones de regulación diferentes y desempeñan funciones distintas en condiciones fibróticas (35). El TGF- β_1 es la isoforma predominante en el sistema cardiovascular (CV), siendo la más relevante en el proceso de fibrosis, y se expresa de manera ubicua; mientras que las otras dos isoformas se encuentran en un rango más limitado de tejidos y células. La isoforma TGF- β_2 , a pesar de estar menos estudiada en la fibrosis cardíaca, puede participar en procesos similares, pero destacan su papel en el desarrollo embrionario cardíaco. Sin embargo, la isoforma TGF- β_3 se ha asociado a la resolución de la fibrosis y al proceso de remodelado, pero su relevancia en la fibrosis cardíaca es menor (36).

3.2.1.2. Vías de señalización del TGF- β

En un corazón normal, el TGF- β_1 en condiciones basales está presente en una forma latente (inactiva) impidiendo que pueda interactuar con sus receptores. Sin embargo, tras una lesión cardíaca, la forma latente se convierte en su forma activa. Esta activación puede ser desencadenada por varios mediadores, incluyendo proteasas como la plasmina, las metaloproteinasas, MMP2 y MMP9 (37), así como por condiciones como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (38) y un entorno ligeramente ácido (39). La activación de una pequeña cantidad de TGF- β_1 es suficiente para desencadenar una respuesta celular significativa.

INTRODUCCIÓN

El TGF- β_1 se une al receptor TGF- β RII presente en la superficie celular, formando un complejo que transfiere la señal al receptor TGF- β RI, ubicado también en la membrana. Esta señalización se lleva a cabo a través de la vía de las SMADs, especialmente SMAD3, que es crucial en la activación de los CFs después de un IM y, por tanto, es esencial para el remodelado fibrótico del ventrículo infartado. La señalización de SMAD3 promueve la síntesis de proteínas de la MEC, la transcripción de integrinas y la expresión de la proteína α -SMA (**Figura 6**). Además, la activación de esta vía regula la proliferación de MioFBs, ayudando a formar cicatrices organizadas y preservando la integridad del corazón infartado a través de una vía reparadora de integrinas y ROS (**40–42**). La ausencia de SMAD3 en modelos experimentales resulta en una fibrosis reducida, a pesar de una mayor densidad de MioFBs, sugiriendo que la disminución del remodelado fibrótico se debe a la reducción de las respuestas profibróticas mediadas por el TGF- β . Sin embargo, SMAD2 no tiene un papel importante en la activación de los CFs presentes en corazones fibróticos, posiblemente debido a diferencias en su proceso de activación y translocación al núcleo. Aunque las vías independientes de SMAD también podrían contribuir al proceso fibrótico, estudios sugieren que la señalización TGF- β /quinasa 1 activada por TGF- β_1 (TAK1) tiene un papel significativo en la hipertrofia cardíaca y la fibrosis intersticial (**Figura 6**). Para evitar respuestas fibrogénicas excesivas, el organismo cuenta con mecanismos de regulación negativa de las cascadas de TGF- β . Los SMADs inhibidores (SMAD6/7), el pseudorreceptor BAMBI y la endoglin soluble actúan como inhibidores endógenos de la señalización del TGF- β , limitando así las respuestas profibróticas (**Figura 6**) (**43–45**). En resumen, el TGF- β_1 desempeña un papel central en la fibrosis cardíaca mediante la activación de CFs y la regulación de proteínas de la MEC. Las vías de señalización del TGF- β , incluyendo las dependientes de SMAD y las independientes, contribuyen a la activación de los CFs y, por tanto, influyen en la respuesta fibrogénica del corazón. La regulación

negativa de esta señalización es fundamental para prevenir una fibrosis descontrolada y mantener la integridad estructural y funcional del corazón.

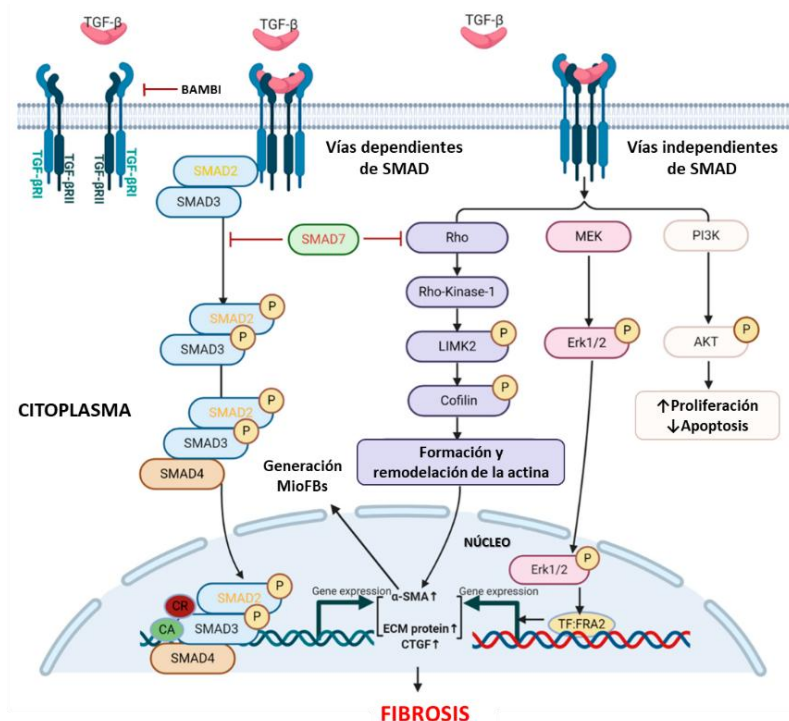


Figura 6. Regulación de la señalización del TGF-β₁ en la fibrosis cardíaca. El TGF-β₁ activo se une a los receptores TGF-βRI/II, activando tanto las vías de señalización dependientes de SMAD (principalmente SMAD3) como las independientes de SMAD. Para evitar respuestas fibrogénicas excesivas, existen mecanismos de regulación negativa de las cascadas del TGF-β. Los SMADs inhibidores (SMAD6/7) y el pseudorreceptor BAMBI actúan como inhibidores endógenos de la señalización del TGF-β, limitando así las respuestas profibróticas. Figura extraída y adaptada de (35).

3.2.1.3. Implicación del TGF-β en la fibrosis cardíaca

La activación del TGF-β₁ tiene un rol fundamental en la fibrosis cardíaca, ya que regula tanto el proceso inflamatorio como el depósito de proteínas de la MEC. Los estudios en modelos experimentales de ratones con sobreexpresión de TGF-β₁ en el miocardio han demostrado que induce fibrosis ventricular, con depósito de proteínas de la MEC (fundamentalmente, colágeno) y una inhibición de las colagenasas intersticiales (46). Por otro lado, ratones transgénicos que expresan

INTRODUCCIÓN

de manera constitutiva TGF- β_1 en el corazón (debido a una mutación que evita la unión del complejo latente del TGF- β_1 a la MEC) desarrollan fibrosis únicamente en las aurículas y no en los ventrículos, debido a una respuesta exagerada por parte de los CFs auriculares (47). Además, en modelos experimentales murinos “*knock-out*” de esta citocina, también se ha confirmado el papel del TGF- β_1 en la fibrosis cardíaca. Por ejemplo, ratones deficientes en TGF- β_1 muestran una fibrosis atenuada con la edad y una mejor distensibilidad del ventrículo izquierdo en comparación con los ratones controles (48). La inhibición del TGF- β en ratas con sobrecarga de presión cardíaca previene la fibrosis miocárdica, subrayando su importancia en la respuesta fibrogénica (49). El TGF- β_1 ejerce efectos profibróticos principalmente a través de la activación de los CFs, que se diferencian en MioFBs, y la inducción de proteínas de la MEC, como el colágeno (50). El TGF- β_1 también promueve la producción de inhibidores de proteasas como el inhibidor tisular del plasminógeno 1 (IAP-1) y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), e inhibe la síntesis de MMPs, que ayudan a mantener la MEC. La acción de TGF- β_1 en combinación con la proteína matricelular, CCN2 (también conocida como CTGF, factor de crecimiento del tejido conectivo), puede contribuir a una respuesta fibrosa prolongada (51).

3.2.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)

El SRAA es crucial para mantener la presión arterial, la perfusión de los tejidos y el volumen extracelular. El SRAA contribuye a la homeostasis celular modulando la función CV y renal, y su desregulación participa en procesos inflamatorios, ateroscleróticos y fibróticos (52). Este sistema se activa principalmente cuando las células yuxtaglomerulares del riñón secretan una enzima denominada renina en respuesta a determinados estímulos como la hipovolemia, hipoosmolaridad o altos niveles de catecolaminas. La renina secretada convierte el angiotensinógeno hepático en angiotensina I (Ang.I) (péptido inactivo), que por

acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se convierte en el péptido activo denominado angiotensina II (Ang.II), principal agente del SRAA (**Figura 7**). La Ang.II ejerce actividades biológicas al unirse a los diferentes subtipos de receptores (**Figura 8**) (53). La mayoría de los efectos de la Ang.II están mediados por la unión al receptor de Ang.I (AT-1), que está ampliamente presente en muchos tejidos y órganos, incluidos la piel, los pulmones, los riñones y el corazón. A través de estos receptores, la Ang.II produce vasoconstricción, activación del sistema nervioso simpático (SNS), retención de líquidos por secreción de aldosterona, y cabe destacar sus efectos hipertróficos cardíacos y vasculares (54). De hecho, hay evidencias científicas que vinculan esta vía neurohumoral con la patogénesis de la fibrosis cardíaca. Dicho efecto fibrogénico de la Ang.II se traduce a nivel tisular en estimular la proliferación de los CFs, la migración de los CFs induciendo la síntesis de integrinas, la conversión a MioFBs y aumentar significativamente la síntesis de proteínas de la MEC [colágeno y fibronectina (FN)], e inhibir la apoptosis (**Figura 7**) (55).

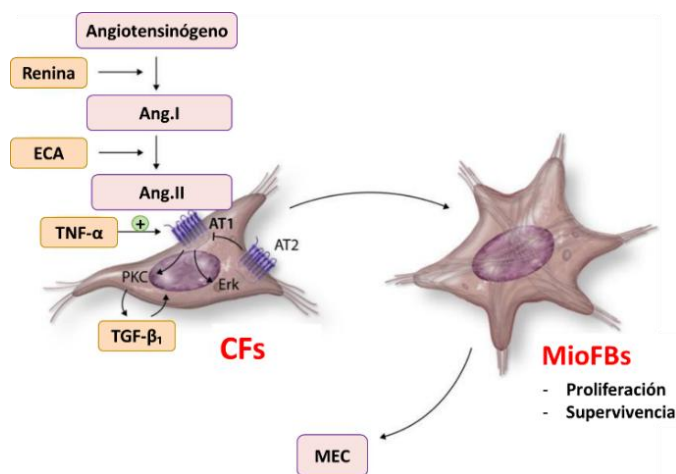


Figura 7. Efectos fibrogénicos del péptido activo angiotensina II. La Ang.II generada por acción de la ECA, ejerce sus efectos fibrogénicos a través del receptor AT-1, lo que conduce a la proliferación, la supervivencia, la conversión a MioFBs y la estimulación de la síntesis de la MEC. Figura extraída y adaptada de (25). **CFs**: cardiofibroblastos; **Ang.:** angiotensina; **ECA**: enzima convertidora de angiotensina; **AT-** receptor de angiotensina; **Erk**: proteína quinasa regulada por señales extracelulares; **TNF-α**: factor de necrosis tumoral alfa; **PKC**: proteína quinasa C; **TGF-β1**: factor de crecimiento transformante beta 1; **MEC**: matriz extracelular; **MioFBs**: miofibroblastos.

INTRODUCCIÓN

A nivel cardíaco, la Ang.II no solamente actúa a través del receptor AT-1, sino que puede actuar sobre distintos receptores generando diferentes efectos (**Figura 8**) (56). El receptor AT-2 inhibe las acciones del receptor AT-1, suprimiendo la proliferación de los CFs y reduciendo la síntesis de proteínas de la MEC, contrarrestando así los efectos profibróticos de la Ang.II (57,58). En modelos experimentales de IM y sobrecarga de presión cardíaca, respalda el papel profibrótico de la señalización AT-1 ya que el bloqueo de este receptor reduce significativamente la fibrosis (59,60). En estudios *in vitro* realizados en CFs de ratas se ha demostrado que tanto la Ang.II como la aldosterona estimulan la síntesis de colágeno. Además, la Ang.II es capaz de inhibir la actividad de la MMP1 contribuyendo a la acumulación progresiva del colágeno en el miocardio (61). En relación directa con el proceso fibrótico, la Ang.II induce la expresión del TGF- β_1 en los CFs a través del receptor AT-1 (**Figura 8**) (62).

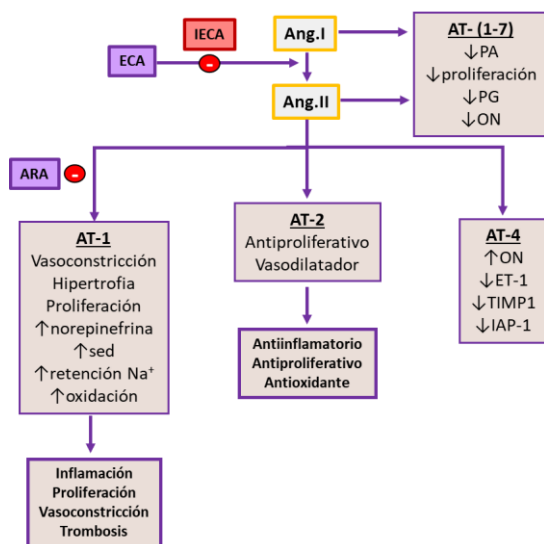


Figura 8. Subtipos de receptores de angiotensina y sus diferentes funciones implicadas en el proceso fibrótico. La Ang.II ejerce sus efectos mediante los receptores AT-1/-2, pero también puede actuar sobre otros receptores, como AT-(1-7) ejerciendo efectos protectores, y AT-4, regulando factores fibróticos. Los IECAs y ARA actúan bloqueando estas vías, reduciendo la inflamación, la hipertrofia y la fibrosis. **Ang.:** angiotensina; **IECA:** inhibidor de la enzima convertidora de Ang.; **ECA:** enzima convertidora de Ang.; **AT-:** receptor de Ang.; **PA:** presión arterial; **ARA-:** antagonista del receptor de Ang; **PG:** prostanglandinas; **ON:** óxido nítrico; **ET-1:** endotelina-1; **TIMP1:** inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1; **IAP-1:** inhibidor del activador del plasminógeno 1. Figura extraída y adaptada de (56).

En pacientes con ECV asociadas con la fibrosis miocárdica [hipertensión arterial (HTA), hipertrofia cardíaca, aterosclerosis e IC], se ha observado un aumento de los niveles séricos de Ang.II. Después de sufrir un IM, se activa el SRAA como respuesta al aumento del estrés de la pared ventricular debido a la presión telediastólica aumentada. El aumento consecuente de los niveles de Ang.II, promueven el proceso inflamatorio y la secreción de TGF- β , IL-1 β y TNF- α , favoreciendo la formación de MioFBs (63). En modelos experimentales de cardiopatía hipertensiva e insuficiencia cardíaca crónica, los niveles elevados de mediadores de la vía del SRAA, tanto circulantes como locales, contribuyen al desarrollo de fibrosis miocárdica y a la disfunción diastólica (64). De hecho, en los CFs la activación de varias cascadas de señalización intracelular, como la MAPK, la proteína quinasa C (PKC) y la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (Erk), activan la vía Ang.II/AT-1. Además, algunas de las acciones fibrogénicas de la Ang.II requiere de la activación del TGF- β_1 (52). Por otro lado, los beneficios del bloqueo de la ECA y AT-1 en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica o IM pueden estar relacionados con la inhibición de la fibrosis inducida por la angiotensina. Adicionalmente, la aldosterona, desempeña un papel significativo en la activación de los CFs tras una lesión en el miocardio. En CFs murinos aislados, la aldosterona es capaz de desencadenar una respuesta proliferativa, estimular la migración y promover un fenotipo que sintetiza MEC. Además de sus acciones sobre los CFs, la aldosterona es capaz de promover la activación de señales fibrogénicas en los cardiomiocitos, macrófagos, linfocitos y células vasculares (Figura 9) (65,66).

En conjunto, la acción coordinada de la Ang.II y la aldosterona en diferentes órganos asegura el mantenimiento de la presión arterial y la restauración de la perfusión renal. Sin embargo, cuando el SRAA se activa de forma continua o inapropiada, puede contribuir a la aparición de enfermedades como la HTA y la IC.

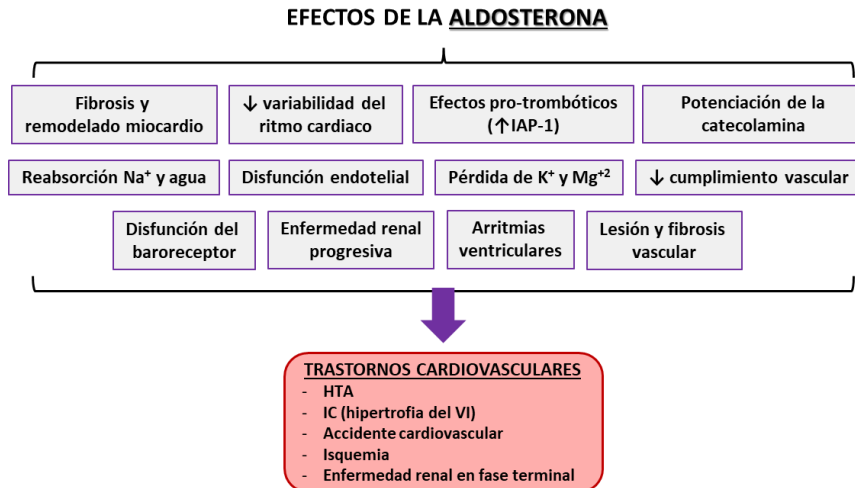


Figura 9. Efectos de la aldosterona en la enfermedad cardiovascular. La figura muestra los efectos de la aldosterona en el sistema CV y sus consecuencias. **IAP-1:** inhibidor del activador del plasminógeno 1; **HTA:** hipertensión arterial; **IC:** insuficiencia cardíaca; **VI:** ventrículo izquierdo. Figura adaptada de (56).

3.2.3. OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL PROCESO FIBRÓTICO

3.2.3.1. Quimiocinas y citocinas

Son proteínas involucradas fundamentalmente en el sistema inmunitario que regulan el proceso inflamatorio y desempeñan roles fundamentales en la fibrosis cardíaca (67). La quimiocina quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) es clave en las enfermedades cardíacas, ya que actúa atrayendo monocitos y macrófagos fibrogénicos a la zona dañada, favoreciendo la proliferación de CFs y la síntesis de colágeno (68). Por otro lado, la quimiocina 10 inducida por interferón gamma (CXCL10/IP-10) tienen efectos antifibróticos actuando como regulador negativo de la fibrosis (69). Las citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 contribuyen al proceso de remodelado de la MEC, reduciendo la síntesis de colágeno y favoreciendo su degradación, lo que puede conducir a una dilatación del ventrículo (70). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es especialmente importante en dicho remodelado ya que posee efectos profibróticos y antifibróticos dependiendo del receptor involucrado [receptor 1, 2 del factor de

necrosis tumoral alfa (TNFR-1,-2)] (71). Además, citocinas como la IL-4, la IL-10 y la IL-13 tienen efectos antiinflamatorios o fibrogénicos según el contexto fisiopatológico. En conjunto, estas proteínas regulan la activación de los CFs, el reclutamiento de células inmunitarias y las respuestas fibrogénicas del corazón (72–75).

3.2.3.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El estrés oxidativo juega un papel crucial en la patogénesis de la fibrosis cardíaca (28). La isquemia y la disminución del metabolismo aeróbico generan una disfunción mitocondrial y una acumulación de ROS. Adicionalmente, tras la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) se potencia la formación de ROS que activan las vías inflamatorias y apoptóticas que amplifican el daño tisular (apoptosis y necrosis de los cardiomiocitos, activación de neutrófilos, etc.,). Respecto a la fibrosis, las ROS regulan la homeostasis de la MEC a través de la activación de la vía de señalización del TGF- β_1 (76). Además, un aumento en el estrés oxidativo activa a las MMPs que degradan los colágeno tipo I y tipo III que dan soporte a los cardiomiocitos, contribuyendo a la dilatación ventricular y a una disfunción mecánica, como ocurre en la IC (77). También son mediadores clave de los efectos de citocinas y de la Ang.II en los CFs, influyendo en el remodelado fibrótico del corazón.

3.2.3.3. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

La familia PDGF está compuesta por factores de crecimiento homo- o heterodiméricos (incluyendo PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD) que señalizan a través de dos receptores diferentes: PDGFR α y PDGFR β , cuya expresión aumenta en condiciones de fibrosis cardíaca. PDGF-A, PDGF-C y PDGF-D promueven la proliferación de los CFs y la síntesis de la MEC, además de estimular la producción de TGF- β (78). En modelos animales, la sobreexpresión de estos factores induce fibrosis miocárdica y es capaz de activar a los CFs (79,80). El

INTRODUCCIÓN

receptor PDGFR α , expresado en los CFs, es clave en la activación de estas células y la acumulación de la MEC; mientras que el PDGFR β tiene un impacto menor en la fibrosis directa, aunque cabe señalar que es importante en la maduración vascular. El bloqueo del receptor PDGFR α reduce la fibrosis, mientras que la inhibición del PDGFR β también afecta al proceso de angiogénesis (78,81).

3.2.3.4. Endotelina-1 (ET-1)

La ET-1 (péptido) es un mediador potente de la fibrosis cardíaca que actúa tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. La ET-1 puede funcionar como un intermediario entre la inflamación y la fibrosis, interaccionando con el TGF- β y la Ang.II, que inducen su producción en diversos tipos celulares (82). En pacientes con afectación cardíaca y en modelos de fibrosis cardíaca hipertensiva, la ET-1 se secreta activamente y se encuentra regulada positivamente (83). En estudios *in vitro*, la ET-1 favorece la proliferación de los CFs, la síntesis de proteínas de la MEC, reduce la actividad de las colagenasas y promueve un fenotipo de CFs resistente al proceso de apoptosis (84). La sobreexpresión en modelos experimentales de ET-1 en el corazón conduce a una fibrosis miocárdica y a una disfunción ventricular (85). Se ha demostrado que los antagonistas de la ET-1 reducen la fibrosis en modelos de HTA e IM (86).

3.2.3.5. Moléculas de superficie: Integrinas

Tras una lesión miocárdica, las células detectan cambios en el microambiente a través de moléculas presentes en la superficie celular que activan cascadas intracelulares. Las integrinas son receptores transmembrana clave en la interacción célula-MEC y están involucradas en el proceso fibrótico (87). La integrina $\beta 1$ se sobreexpresa en los CFs activados en el miocardio infartado y en corazones sobrecargados por presión, estimulado por el TGF- β a través de la vía de señalización SMAD3 (42). Asimismo, las integrinas también afectan a las células inmunes y vasculares. La integrina $\alpha v \beta 3$, activada por la tenascina-C

(TNC), está relacionada con la fibrosis en modelos de infusión de Ang.II (88), mientras que la integrina α_v , presente en las células perivasculares, contribuye al desarrollo de fibrosis en el remodelado cardíaco inducido por angiotensina (89). Sin embargo, no está claro si estas integrinas actúan directamente en la conversión celular a CFs o a través de mediadores paracrinós. Además, las integrinas β_2 , expresadas principalmente en leucocitos, también desempeñan un papel central en los procesos inflamatorios y de remodelado de la fibrosis tisular. Estas moléculas median la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular y su migración hacia el tejido miocárdico lesionado, permitiendo así la infiltración inflamatoria y la activación de los macrófagos. Una activación sostenida de integrinas β_2 , puede perpetuar la inflamación crónica, exacerbando el depósito de MEC y conduciendo a un remodelado adverso en el tejido cardíaco. Esto resulta en un incremento de la rigidez miocárdica, pérdida de funcionalidad contráctil y predisposición a una IC (87).

3.3. CÉLULAS EFECTORAS DE LA FIBROSIS CARDÍACA

El corazón humano sano está compuesto por varios tipos de células con funciones específicas que interactúan entre sí para mantener la homeostasis y la función cardíaca. El corazón está constituido principalmente por cardiomiocitos y células no musculares, denominadas no cardiomiocitos (no-CMs), que representa el 30 y el 70% de las células totales del corazón, respectivamente (Figura 10). A pesar de que los cardiomiocitos representan un porcentaje pequeño de las células cardíacas, ocupan el 75% del volumen del miocardio debido a su tamaño. Dentro de los no-CMs, el 45-50% lo constituyen las células endoteliales que se encuentran recubriendo los vasos sanguíneos y capilares del corazón. El resto de los tipos celulares del corazón son células del sistema inmune (≈ 5 -10%) [macrófagos, linfocitos y mastocitos] y CFs (≈ 10 -15%). Los CFs son los responsables de la producción y mantenimiento de la MEC y desempeñan

INTRODUCCIÓN

un papel relevante en la respuesta a la lesión y al proceso de remodelado cardíaco. Cabe destacar la existencia de otros tipos celulares menos abundantes (<10%) como los pericitos y las células musculares lisas, que también forman parte del tejido cardíaco (**Figura 10**) (90,91).

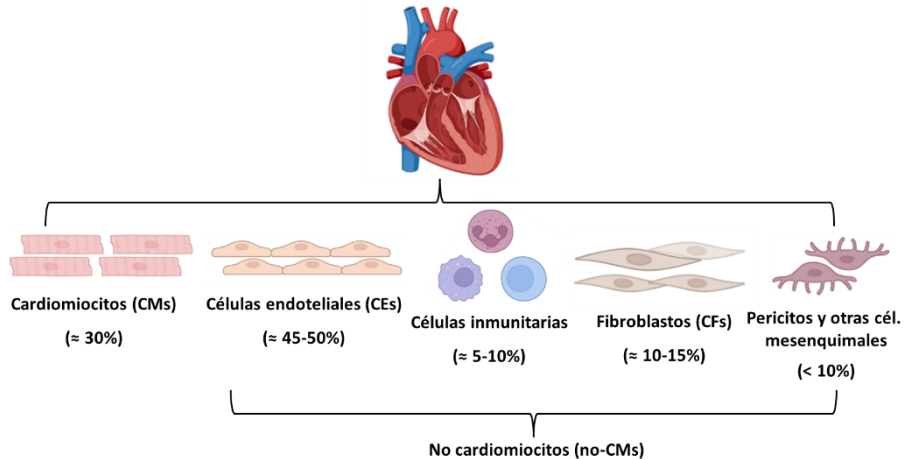


Figura 10. Componentes celulares de un corazón humano adulto. La figura muestra los diferentes tipos celulares que constituye un corazón adulto. Está formado, principalmente, por CMs y no-CMs, siendo estos últimos el 70% de las células que conforman el corazón. Figura adaptada de (91) y creada con Biorender.com. **CMs**: cardiomiocitos; **CEs**: células endoteliales; **CFs**: cardiofibroblastos; **no-CMs**: no cardiomiocitos.

3.3.1. CARDIOFIBROBLASTOS

Los **cardiofibroblastos** (CFs) fueron descritos por primera vez en 1858 por Rudolf Virchow como “*Spindelzelle des Bindegewebes*”, que significa células fusiformes del tejido conectivo (92). El término ‘fibroblasto’ fue introducido por Ernst Ziegler para describir a las células que producen tejido conectivo nuevo durante la cicatrización. Posteriormente, el científico español Santiago Ramón y Cajal replicó esta observación describiendo a las ‘células fusiformes’ o ‘fibrocélulas’ como productoras de tejido de granulación tanto en la curación de heridas como en la formación de cicatrices. Los CFs son células de origen mesenquimal presentes en todos los tejidos del cuerpo (93,94). Morfológicamente, son células planas y fusiformes que presentan extensiones citoplasmáticas para poder

interaccionar con otras células y con la propia MEC. Además, carecen de membrana basal y presentan un núcleo denso y alargado (**Figura 11**) (95).

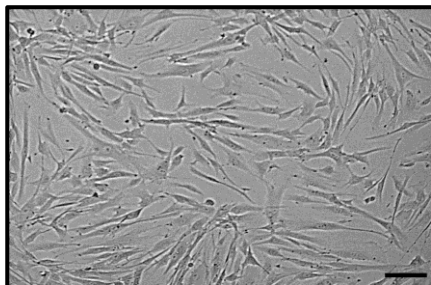


Figura 11. Cultivo de CFs humanos primarios. La figura muestra una foto obtenida en campo claro con un microscopio óptico invertido de luz polarizada (Leica DMI8) de un cultivo de cardiofibroblastos (CFs) humanos primarios (casa comercial Innoprot®) creciendo en pase 6 (Barra = 100 μ m).

3.3.1.1. Origen de los cardiofibroblastos

Durante el desarrollo embrionario cardíaco, los CFs se originan a partir de células mesenquimales. Este proceso se inicia con la migración de las células proepicárdicas hacia el corazón embrionario, donde forman la capa epicárdica. Estas células sufren una transformación epitelial-mesenquimal (EMT) en la que las células epiteliales cambian su fenotipo de células adherentes a células migratorias y con capacidad de diferenciación, a CFs. Este proceso es inducido principalmente por la periostina y el TGF- β (96–98). En modelos experimentales de fibrosis cardíaca, alrededor del 30% de los CFs activados se originan de células endoteliales mediante la transición endotelial-mesenquimal (EndMT), desencadenada por estímulos profibróticos como el TGF- β o la hipoxia, permitiendo que adquieran características de CFs y migren al intersticio para ejercer sus funciones. Ambos procesos (EMT y EndMT) son cruciales para la formación de estructuras cardíacas y se reactivan en procesos patológicos a nivel cardíaco. Permiten el reclutamiento de CFs a áreas lesionadas sin depender del reclutamiento de CFs que se encuentran en áreas alejadas del daño. Sin embargo, no todos los CFs provienen de estas transformaciones. Los CFs

INTRODUCCIÓN

presentes en las válvulas auriculoventriculares se originan del endocardio a través de procesos similares. Tras el desarrollo embrionario, las células derivadas del epicardio y del endocardio pierden su capacidad activa de migración y diferenciación, volviéndose inactivas en la producción de nuevos CFs. En el corazón adulto, los CFs representan la población mayoritaria de células no musculares (no-CMs) y se mantienen principalmente en un estado quiescente, siendo en gran medida residuales del desarrollo embrionario (99,100).

3.3.1.2. Funciones cardíacas de los cardiofibroblastos

Los CFs son esenciales para la regulación de diversas funciones cardíacas. Influyen en la homeostasis de la MEC, la comunicación con los cardiomiocitos, la actividad eléctrica del corazón, y la producción de factores de crecimiento y citocinas. Los CFs no solo interactúan entre sí, sino también con las células endoteliales y células del músculo liso, participando en procesos como la angiogénesis, la proliferación celular, la hipertrofia de los cardiomiocitos y la apoptosis. Además, los CFs pueden reprogramarse en diferentes tipos celulares, incluyendo células madre pluripotentes, mioblastos o neuronas (101,102). En términos de estructura y función cardíaca, los CFs son cruciales para mantener la integridad estructural y la actividad eléctrica del corazón, a pesar de ser células no excitables (103). Son fundamentales en el proceso de remodelado patológico del corazón y forman el anillo fibrótico que separa eléctricamente las aurículas y los ventrículos, para asegurar una contracción y un funcionamiento cardíaco adecuado (104). Los CFs están conectados con los cardiomiocitos a través de uniones “gap”, denominadas conexinas (Cx40, Cx43 y Cx45, relevantes en el corazón), que son vitales para la conducción eléctrica, así como también para permitir el intercambio de nutrientes y regular la actividad celular. Alteraciones en la expresión o función de estas conexinas pueden producir problemas en la comunicación celular, provocando arritmias u otras patologías cardíacas (105–107).

Otra función relevante de los CFs es la síntesis y secreción de moléculas bioactivas, como citocinas (ej.: TNF- α , IL-1 β), péptidos activos (ej.: Ang.II, ET-1) y factores de crecimiento (ej.: TGF- β), que actúan sobre el miocardio de forma autocrina y paracrina (108). Los CFs son esenciales para mantener la homeostasis de la MEC en condiciones normales y su remodelado durante las enfermedades cardíacas (Figura 12). Esta función de regulación de la MEC, los CFs la desarrollan por su capacidad de sintetizar proteínas que son parte de la MEC (colágeno tipo I y tipo III, FN, etc.) y, a su vez, enzimas que degradan dicha MEC, como las MMPs e incluso sintetizan otras enzimas que inhiben la acción de las MMPs (TIMPs) (109). También juegan un papel importante en el proceso de angiogénesis, regulando la formación de los vasos sanguíneos presentes en el corazón a través de factores estimulantes [factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)] e inhibidores (CTGF, PDGF) (Figura 12) (110). Además, los CFs también influyen en el desarrollo y mantenimiento de los cardiomiocitos, secretando factores como FGF y periostina, que inducen su proliferación (111). En resumen, los CFs son células multifuncionales claves en el desarrollo y la función del corazón. No solo proporcionan el andamiaje estructural que sostiene a todos los tipos de células cardíacas, sino que también se encargan de regular el crecimiento de los cardiomiocitos y de la formación de vasos sanguíneos en el corazón. Además, los CFs participan activamente en la electrofisiología cardíaca, contribuyendo al correcto funcionamiento del corazón (Figura 12) (29,112). Por tanto, los CFs desempeñan un papel clave en el mantenimiento de su integridad estructural a través de la proliferación controlada y el recambio de la MEC, por lo que se perciben como el tipo celular primario responsable de la fibrosis cardíaca durante el remodelado miocárdico adverso (29,93,108).

INTRODUCCIÓN

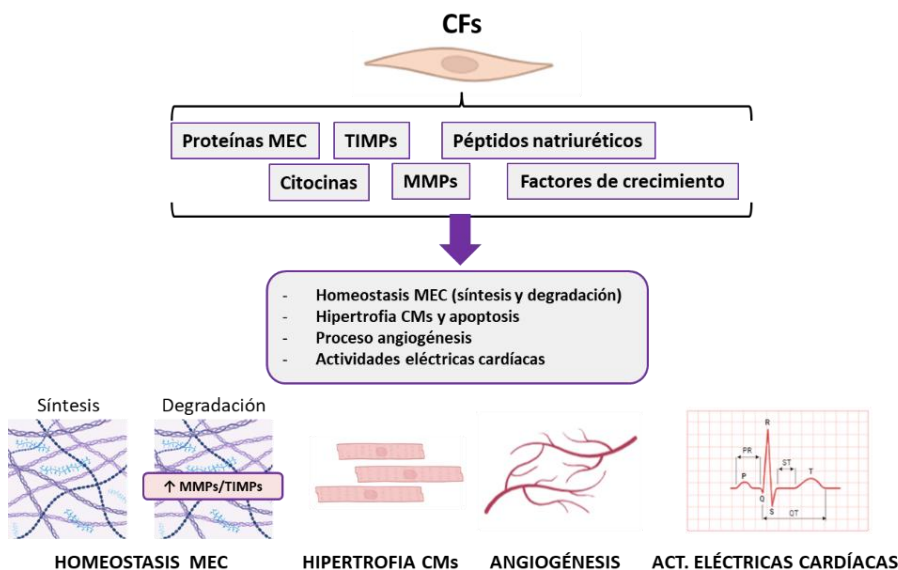


Figura 12. Funciones de los CFs e implicaciones en el proceso fibrótico. Los CFs son capaces de producir y secretar una amplia variedad de moléculas que les permite influir en varios procesos celulares y moleculares que determinan la estructura y función del corazón. Participan en procesos de homeostasis de la MEC, en la hipertrofia y apoptosis de los CMs, en el proceso de angiogénesis y en la electrofisiología del corazón. Figura adaptada de (29) y creada con Biorender.com. **CFs**: cardiofibroblastos; **MEC**: matriz extracelular; **TIMPs**: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas; **MMPs**: metaloproteinasas; **CMs**: cardiomiocitos.

3.3.1.3. Activación de los cardiofibroblastos: miofibroblastos

En respuesta a una situación de estrés o lesión (IM o HTA), los CFs residentes pueden activarse y convertirse en MioFBs (**Figura 13**). Adicionalmente a los CFs residentes, otros tipos celulares como las células endoteliales, las células epiteliales y las células derivadas de la médula ósea, pueden transformarse en CFs en respuesta a determinados estímulos de daño. De hecho, la respuesta inflamatoria consecuente a la lesión favorece el reclutamiento de células hematopoyéticas originadas de la médula ósea (monocitos o células madre mesenquimales) y células sanguíneas circulantes al sitio de la lesión, que pueden diferenciarse a CFs y activarse a MioFBs (**Figura 13**) (29,94).

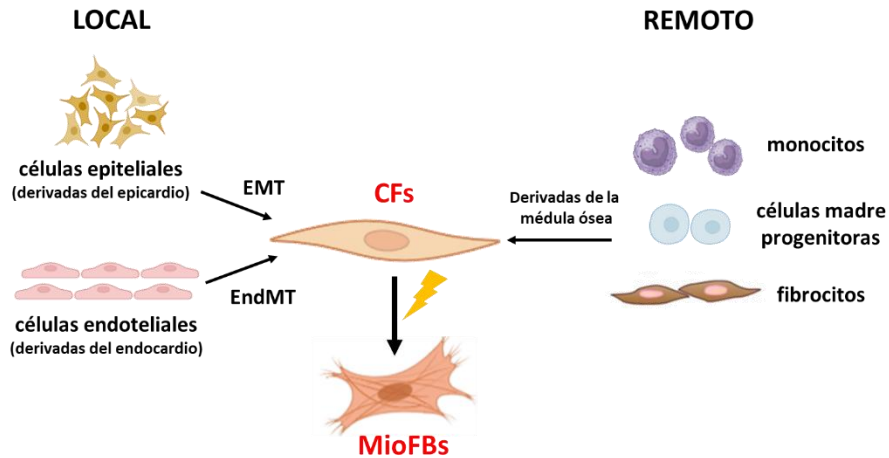


Figura 13. Origen de los CFs durante el desarrollo embrionario o durante un proceso patológico. Durante el desarrollo embrionario cardíaco, las células del epicardio experimentan una transformación EMT, mientras que las células endoteliales pueden someterse al proceso EndMT y convertirse en CFs. Tras una lesión, las células derivadas de la médula ósea pueden ser reclutadas al sitio de la lesión y transformarse en CFs. Si la lesión persiste, estos CFs se diferencian a MioFBs. Figura adaptada de (29) y creada con Biorender.com. **EMT**: transición epitelial-mesénquimal; **EndMT**: transición endotelial-mesénquimal; **CFs**: cardiófibroblastos; **MioFBs**: miofibroblastos.

Tras una lesión, la pérdida de la integridad de la MEC expone a los CFs a un estrés y a diversas vías de señalización: hormonas específicas (ej.: Ang.II, aldosterona), factores de crecimiento (ej.: TGF- β_1) y citocinas (ej.: IL-6, IL-1 β , TNF- α). Estas vías favorecen la proliferación y migración de los CFs y su diferenciación a MioFBs, que incrementan la síntesis de diversas proteínas de la MEC (113,114). Estos MioFBs reemplazan a los cardiomiocitos dañados y forman una cicatriz resistente para prevenir la progresión del IM y la dilatación ventricular. Sin embargo, la producción excesiva de colágeno por los MioFBs en áreas remotas a la zona del infarto contribuye a un remodelado ventricular adverso que conduce a un deterioro de la función cardíaca (108). Los MioFBs fueron identificados por Gabbiani en el año 1971 como células esenciales para el crecimiento, desarrollo y reparación de tejidos. Presentan características tanto de CFs como de células musculares lisas y, aparecen en el tejido de granulación de la zona lesionada,

INTRODUCCIÓN

pero no en el tejido cardíaco sano (108). Se distinguen por presentar un núcleo alargado y en ocasiones ovalado, con un citoplasma más denso y granular, reflejando su elevada capacidad de síntesis de proteínas de la MEC (principalmente colágeno) (115). Además, cuentan con un retículo endoplásmico rugoso con gran actividad celular y un gran aparato de Golgi (112). Adicionalmente, poseen largas prolongaciones citoplasmáticas que facilitan la comunicación célula-MEC. Los MioFBs pueden derivar de múltiples fuentes como se refleja en la **Figura 13 (99,116–118)** y expresan marcadores típicos de células musculares lisas, como α -SMA y la cadena pesada de miosina de músculo liso, y proteínas de adhesión como la vinculina y la paxilina. Además, mediante complejos de adhesión denominados fibronexus, los MioFBs pueden ejercer fuerza sobre la MEC, contribuyendo a la contracción de la cicatriz formada durante el proceso de reparación (118,119). Los MioFBs responden rápidamente a quimiocinas liberadas en áreas lesionadas, facilitando su migración hacia la zona afectada. Allí, secretan citocinas proinflamatorias (ej.: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y contribuyen a mantener la respuesta inflamatoria (120). Estas citocinas son fundamentales en la fibrosis reparadora tras un IM y en la formación de cicatrices fibróticas hipertróficas (121). La transformación de los CFs a MioFBs provoca un desequilibrio en la MEC, acumulando depósitos fibróticos que reemplazan a los cardiomiocitos y deterioran la función cardíaca (120).

3.3.1.4. Marcadores de cardiofibroblastos y miofibroblastos

Actualmente, no existe un marcador específico que diferencie a los CFs de los MioFBs, pero si existen cambios en la expresión de determinados marcadores presentes en ambos tipos celulares. Mayoritariamente, se observa una sobreexpresión de marcadores como el colágeno tipo I y el colágeno tipo III, FN, α -SMA, proteína específica de fibroblastos 1 [FSP1 (S100A4)] y vimentina, para confirmar dicha transición fenotípica. Adicionalmente, en función del contexto patológico en el que se encuentren las células, se sobreexpresan unos

marcadores u otros. Además, muchos de estos marcadores empleados para la identificación de los CFs pueden encontrarse en otros tipos celulares (células endoteliales, pericitos o incluso células inmunes) (122). En la **Tabla 3** se muestran algunos de estos marcadores más ampliamente utilizados para la identificación de los CFs y los MioFBs, junto con la expresión de cada uno de ellos.

Tabla 3. *Marcadores de CFs y MioFBs presentes en el corazón.* Adaptada de (122).

MARCADOR	FUNCIÓN	EXPRESIÓN	
		CFs	MioFBs
Colágeno tipo I y tipo III	Proteína MEC	+++	
FN	Proteína MEC	++	+++
α-SMA (ACTA2)	Isoforma del filamento contráctil de actina	— (dudosa expresión)	+++
FSP1	Proteína de unión al Ca^{+2}	++	
Vimentina	Proteína de filamento intermedio	+++	
PDGFRα	Receptor de tirosina quinasa	+++	—
FAP	Serina proteasa específica de prolina unida a la membrana	—	+
Periostina	Proteína matricelular de MEC	+++	+
DDR2	Receptor tirosina quinasa que se une al colágeno de membrana	+	++
TCF21	Participa en la transición EMT	+	—
CD90	Adhesión celular y comunicación célula-célula	++	
TNC	Proteína MEC	—	+ (más específica)

+++ : expresión alta; ++ : expresión media; + : expresión baja; — : expresión nula o sin expresión (en algunas ocasiones dudosa). **CFs**: cardiofibroblastos; **MioFBs**: miofibroblastos; **FN**: fibronectina; **α -SMA**: alfa actina del músculo liso; **FSP1**: proteína específica de fibroblastos 1; **PDGFR-**: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; **FAP**: proteína activadora de fibroblastos; **DDR2**: receptor de discoidina de tipo 2; **TCF21**: factor de transcripción 21; **TNC**: tenascina-C; **MEC**: matriz extracelular; **EMT**: transición epitelial-mesénquimal.

3.3.2. CARDIOMIOCITOS

Los **cardiomiocitos** son las células musculares responsables de la contracción y relajación del corazón. Presentan un aspecto estriado, debido a sus filamentos paralelos de actina y miosina organizados en sarcómeros. Estos cardiomiocitos contienen numerosas mitocondrias responsables de proporcionar la energía necesaria para la conducción de señales y la contracción de la célula cardíaca (123). Además de su función contráctil, pueden actuar a través de señales químicas secretando una amplia variedad de factores de crecimiento y citocinas (ej.: $\text{TNF-}\alpha$) que pueden afectar negativamente a la contractilidad del corazón tras una lesión (124,125). También son capaces de liberar factores profibróticos como el $\text{TGF-}\beta$ y promover la proliferación de los CFs y el depósito de proteínas de la MEC (126). Asimismo, expresan y secretan el VEGF contribuyendo al proceso de remodelado vascular (127). Ante un proceso fibrótico, se reduce la elasticidad de miocardio debido a la acumulación excesiva de proteínas de la MEC y a la formación del tejido fibroso, afectando a la contractilidad de los cardiomiocitos y provocando una disfunción diastólica. La muerte de los cardiomiocitos suele ser el evento clave en la activación de las señales fibróticas en el miocardio, ya que presentan una escasa capacidad de regeneración tras un daño formándose el tejido cicatricial que compromete a la función cardíaca.

3.3.3. CÉLULAS ENDOTELIALES

Las **células endoteliales** constituyen el $\approx 45\text{-}50\%$ del total de células presentes en el corazón y juegan un papel crucial en la fibrosis cardíaca (91). Tras un daño cardíaco, las células endoteliales contribuyen a la fibrosis de varias maneras: promueven la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), que reclutan macrófagos y linfocitos fibrogénicos a la zona dañada, facilitando el desarrollo de fibrosis (128–131); secretan factores como el $\text{TGF-}\beta_1$, el FGF y la ET-1 relacionados con la fibrosis miocárdica en modelos de

enfermedades cardíacas (**132,133**); generan mediadores proinflamatorios que activan a los leucocitos que contribuyen al proceso de fibrosis; y, además, pueden sufrir el proceso EndMT transformándose en CFs y contribuir a la acumulación de MEC (**99,134,135**). Por tanto, la disfunción endotelial es una vía clave en el desarrollo y la progresión de la IC (**136**). Se ha demostrado que la gravedad de la disfunción endotelial tiene un valor pronóstico para eventos CV. Varios estudios han demostrado que VCAM-1 soluble es un predictor independiente de muerte en pacientes con enfermedad arterial coronaria (**137**), mientras que otros estudios confirmaron que la molécula ICAM-1 soluble es el predictor de la enfermedad arterial periférica e IM (**138**). Además, las células endoteliales también participan en la angiogénesis, un proceso fundamental para la función normal del miocardio, así como para la aparición y progresión de la hipertrofia cardíaca (**139**). Pese a su papel profibrótico, también se ha descrito que pueden actuar como reguladores negativos del proceso de fibrosis, secretando factores como el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) y la quimiocina CXCL10, que inhiben la activación y migración de los CFs, sugiriendo un posible efecto protector contra la fibrosis (**69,140,141**).

3.3.4. CÉLULAS INMUNITARIAS

El proceso inflamatorio es un proceso clave para la curación de tejidos y la formación de cicatrices. Sin embargo, cuando la inflamación persiste puede conducir a la formación de tejido cicatricial extenso, lo que finalmente lleva a un fallo orgánico completo. Las células del sistema inmunitario, junto con el resto de las células cardíacas, desempeñan un papel clave en el proceso de fibrosis al activar y diferenciar células en MioFBs mediante la liberación de factores proinflamatorios y profibróticos.

Los **monocitos** y **macrófagos** juegan un papel crucial en la regulación de las respuestas fibróticas en diversos tejidos (**142,143**). En el corazón sano, los macrófagos residentes ayudan a mantener la homeostasis cardíaca (**144**), pero

INTRODUCCIÓN

tras una lesión, estos macrófagos residentes son reemplazados por macrófagos derivados de monocitos, que participan en procesos como la inflamación, la fibrosis, el remodelado de la MEC, la angiogénesis y la regeneración (145). Los macrófagos en corazones dañados son heterogéneos y versátiles, produciendo citocinas (ej.: IL-10, TNF- α) y factores de crecimiento (ej.: TGF- β , PDGF y FGF) para regular la fibrosis y el remodelado de la MEC (146). Tradicionalmente, los macrófagos se dividen en dos tipos: macrófagos M1 (proinflamatorios) y macrófagos M2 (reparadores) (147). En corazones infartados, señales como los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y los receptores “*toll-like receptors*” (TLR) desencadenan respuestas inflamatorias que activan a los CFs (148). Un aspecto crucial en este proceso es el papel de las moléculas de adhesión CD11b y CD18, que conforman el complejo Mac-1, también conocido como integrina $\alpha_M\beta_2$. Mac-1 es fundamental para la adhesión, migración y fagocitosis de monocitos y macrófagos durante la respuesta inflamatoria. Además, facilita la interacción de estas células con la MEC y otros componentes del microambiente inflamatorio, modulando tanto la respuesta proinflamatoria como las funciones antifibróticas mediante la eliminación de células apoptóticas, reduciendo de esta manera el daño fibrótico producido (149,150). Además, factores como la Ang.II y la aldosterona promueven el proceso fibrótico al estimular a los macrófagos. Sin embargo, estos también pueden tener un efecto antifibrótico al inhibir la activación de los CFs y facilitar la eliminación de células apoptóticas, reduciendo de esta manera el daño fibrótico (142).

Además, de los monocitos y macrófagos, otro tipo de célula inmunitaria implicada en el proceso fibrótico son los **mastocitos**. En áreas fibróticas del miocardio se produce una expansión de este tipo celular que contribuye al proceso fibrótico modulando las respuestas inflamatorias (151). Estos mastocitos desencadenan el proceso fibrótico liberando mediadores fibrogénicos almacenados en sus gránulos (ej.: TNF- α , TGF- β , IL-4 y PDGF), que activan a los CFs y amplifican la respuesta fibrótica. Además, este proceso de

desgranulación puede ser activado por factores como los del complemento, las ROS, la adenosina o las citocinas (**152,153**). Otra célula inmunitaria importante son los **linfocitos**, particularmente, los linfocitos T juegan un papel decisivo en el proceso de fibrosis cardíaca (tanto en el IM como en la IC no isquémica) (**154,155**). En el IM, los linfocitos T se reclutan mediante quimiocinas (**156**), mientras que, en la IC por sobrecarga de presión, el reclutamiento de linfocitos T puede ser inducido por estrés mecánico y por la activación de vías neurohumorales (**157**). Se ha demostrado que los linfocitos T contribuyen a la fibrosis cardíaca mediante: la activación directa de los CFs, promoviendo su diferenciación a MioFBs mediante el TGF- β (**158**); la regulación de citocinas fibrogénicas (IL-4 e IL-13) que estimulan la síntesis de colágeno (**159**); la interacción con macrófagos amplificando el proceso fibrótico; y la influencia en la supervivencia de los cardiomiocitos facilitando su reemplazo por tejido fibrótico (**160**). Por otro lado, los granulocitos, incluidos los **neutrófilos**, participan principalmente en la respuesta inflamatoria aguda del miocardio y ayudan en la reparación tisular al influir en los macrófagos, aunque se eliminan rápidamente de las áreas lesionadas (**161**). En cuanto a los **eosinófilos** y **basófilos**, debido a la poca cantidad presente en el miocardio lesionado, no se considera que tengan una función relevante en el proceso de fibrosis cardíaca.

3.4. MATRIZ EXTRACELULAR Y COLÁGENO

3.4.1. *MORFOLOGÍA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR*

La MEC cardíaca presenta una organización tridimensional compleja que contribuye tanto a la arquitectura como a la funcionalidad del tejido cardíaco (**Figura 14**). Está compuesta por dos estructuras principales: por un lado, la membrana basal, que rodea a los cardiomiocitos y a los vasos sanguíneos presentes en el corazón, y, por otro lado, la matriz intersticial, rica en células que se encarga de proporcionar soporte estructural para la organización de los

INTRODUCCIÓN

cardiomiocitos y de los vasos sanguíneos más grandes (162,163). Según las características morfológicas, la MEC cardíaca se subdivide en: **epimisio**, que rodea a todo el músculo cardíaco y se encuentra en las superficies endocárdicas y epicárdicas, proporcionando soporte a las células endoteliales y mesoteliales (células epiteliales especializadas); **perimisio**, que se encuentra rodeando a las fibras musculares, agrupándolas en haces organizados y estructurando el tejido cardíaco y, por último, el **endomisio**, que deriva del perimisio y que se encuentra rodeando de manera individual a cada uno de los cardiomiocitos formando conexiones esenciales para la transmisión de señales mecánicas y bioquímicas (164). Esta disposición no solo garantiza el soporte estructural del miocardio, sino que también facilita procesos funcionales como la transmisión de fuerza durante la contracción y la modulación de señales mecánicas, químicas y eléctricas en condiciones fisiológicas y patológicas (165–167).

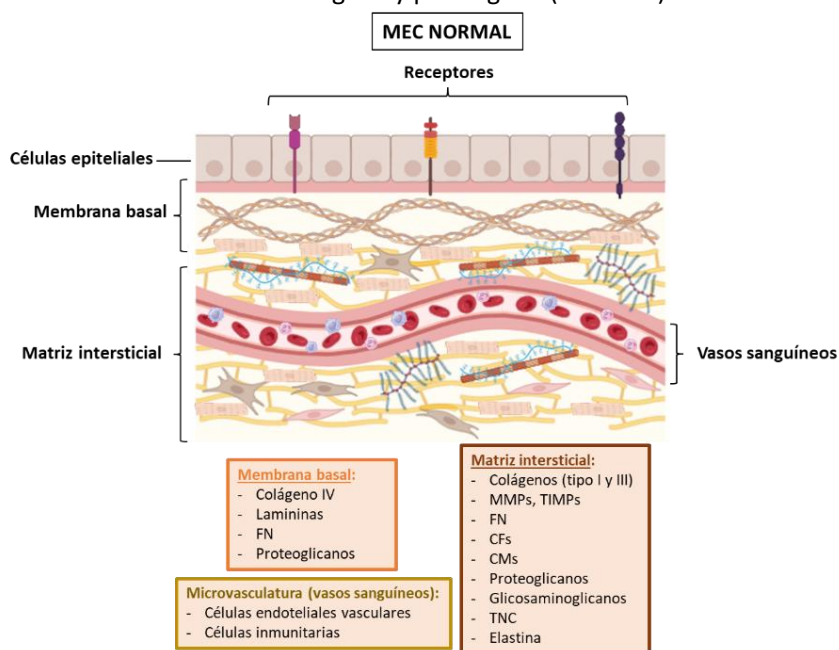


Figura 14. Representación general de la estructura de la matriz extracelular sana presente en el tejido cardíaco. La MEC cardíaca sana está compuesta por una membrana basal, una matriz intersticial y una microvasculatura, con diferentes componentes. Figura creada con BioRender.com. **MEC:** matriz extracelular; **FN:** fibronectina; **MMPs:** metaloproteinasas; **TIMPs:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas; **CFs:** cardiofibroblastos; **CMs:** cardiomiocitos; **TNC:** tenascina-C.

3.4.2. COMPOSICIÓN Y REGULACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La MEC cardíaca está compuesta por proteínas estructurales, matricelulares y de adhesión, como glucoproteínas, glucosaminoglicanos, proteoglicanos, factores de crecimiento y proteasas, organizados para mantener la homeostasis tisular y responder a las necesidades funcionales del corazón (90). Las principales proteínas estructurales son los colágenos fibrilares, que forman una red tridimensional que conecta a los cardiomiocitos y a los vasos sanguíneos. Los colágenos predominantes en el miocardio son el tipo I (80-85%) y el tipo III (10-15%), pero también se encuentra el colágeno tipo IV (<5%), tipo V (<1-3%) y tipo VI (<1%). El colágeno tipo I proporciona rigidez, mientras que el tipo III mantiene la integridad estructural del miocardio debido a que es más distensible (164,168–170). Los colágenos no fibrilares, como el tipo IV y V, juegan roles en la activación de los CFs y ensamblaje del colágeno. Los colágenos tipo I y tipo III son sintetizados principalmente por los CFs y MioFBs en forma de propéptidos N- y C- terminales (171,172).

En el tejido cardíaco sano, la composición y orientación de los componentes de la MEC están estrictamente regulados. La homeostasis de los colágenos estructurales depende del equilibrio entre su síntesis y degradación, controlado por las MMPs, responsables de degradar las fibras de colágeno, y las enzimas inhibitoras (TIMPs) que bloquean su actividad (173). El equilibrio entre las MMPs y los TIMPs es esencial para el mantenimiento estructural y funcional del corazón, ya que cambios en la organización y composición de la MEC, en particular de las fibras de colágeno, son fundamentales para el desarrollo y progresión de la IC.

Además de los colágenos, la MEC está compuesta por otras proteínas estructurales como son la glucoproteína dimérica FN y la laminina, secretadas principalmente por los CFs y los cardiomiocitos. La FN se encarga de regular la adhesión y migración celular, el proceso de cicatrización de heridas y la

INTRODUCCIÓN

angiogénesis. Además, su variante EDA-FN es clave en la conversión de CFs a MioFBs (174,175). Por su parte, la laminina contribuye a la migración y proliferación celular, y es esencial para la supervivencia de los cardiomiocitos y el proceso de angiogénesis (176). Por otro lado, las proteínas de adhesión, como las integrinas, son esenciales para conectar el citosqueleto de las células con la MEC y mantener la estructura y comunicación celular en el corazón. Estas integrinas son expresadas tanto por los cardiomiocitos como por los CFs presentes en el miocardio (177). El receptor DDR, particularmente el subtipo DDR2 presente en los CFs, también juega un papel relevante al unirse al colágeno (178). Asimismo, también predominan unas proteínas que se encargan de regular la comunicación entre células, que se denominan cadherinas (179).

A parte de la presencia de proteínas estructurales, la MEC también contiene proteínas matricelulares que actúan como intermediarios entre las proteínas de la propia MEC y las células. Estas incluyen trombospondinas (TSP), tenascinas, periostina, osteopontina (OPN) y la familia CCN (180), que regulan la reparación de tejidos, la cicatrización de heridas, el crecimiento celular y la apoptosis. Por ejemplo, la TSP-1 estabiliza la MEC mediante la inhibición de las MMPs y la activación del TGF- β , promoviendo la diferenciación de CFs a MioFBs. La TNC y la proteína secretada ácida y rica en cisteína (*SPARC*), están asociadas con los MioFBs y participan en el proceso de remodelado cardíaco y acumulación de colágeno. Por otro lado, la OPN, regulada positivamente en la fibrosis, actúa como citocina o proteína matricelular, apoyando la activación de los CFs (181). La proteína periostina, localizada en los MioFBs y en la matriz intersticial, regula el ensamblaje de la MEC y potencia procesos fibrogénicos. Su ausencia afecta el reclutamiento de CFs y a la fibrogénesis del colágeno (182). Asimismo, el CTGF (o *CCN2*), es un mediador clave en la síntesis de la MEC en condiciones fibróticas. Este factor de crecimiento promueve la producción excesiva de MEC inducida por el estímulo TGF- β y juega un papel importante en el remodelado y fibrosis cardíaca (183).

Además de los CFs y los cardiomiocitos, la MEC también está constituida por otros tipos celulares como son las células endoteliales vasculares que forman la microvasculatura del miocardio y son esenciales para asegurar un suministro constante de nutrientes (90). También se encuentran en el intersticio cardíaco las células inmunitarias (macrófagos, mastocitos, células dendríticas y linfocitos) y las células murales vasculares (células musculares lisas y pericitos) (184). Estas poblaciones celulares varían en función de su capacidad para producir y secretar diferentes componentes de la MEC. Este equilibrio celular y molecular es fundamental para mantener la funcionalidad cardíaca y responder a lesiones o estrés.

3.4.3. IMPLICACIONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA FIBROSIS CARDÍACA

La MEC desempeña un papel fundamental en los procesos de fibrosis cardíaca, caracterizados por un remodelado estructural y funcional del miocardio en respuesta al daño o estrés. Durante el proceso de fibrosis se produce un desequilibrio en la composición del colágeno, con un aumento en la síntesis del colágeno tipo I en detrimento del colágeno de tipo III, conduciendo a una mayor rigidez del tejido cardíaco. Este desequilibrio está promovido por la desregulación en las MMPs, particularmente de la MMP9, y sus inhibidores, TIMPs. A nivel cardíaco, la MMP9 además de degradar componentes de la MEC como el colágeno, la FN y la laminina, tiene efectos cardioprotectores independientes, siendo crucial su expresión en la regulación de la fibrosis cardíaca (25,185). Por otro lado, las proteínas matricelulares que componen la MEC, como son la FN, la laminina y la periostina, junto con mediadores como el TGF- β_1 , favorecen la diferenciación de los CFs a MioFBs, promoviendo la acumulación del colágeno en el tejido cardíaco. Alteraciones en la MEC pueden impedir la adhesión efectiva de los cardiomiocitos a la membrana basal, comprometer la integridad posicional de los cardiomiocitos y facilitar la

INTRODUCCIÓN

dilatación del corazón (186). Otras proteínas, como la TSP-1, se eleva en condiciones de fibrosis y ayuda a estabilizar la MEC inhibiendo las MMPs, además de activar el TGF- β y promover la conversión de los CFs a MioFBs (180,187). Asimismo, proteínas como la TNC y la SPARC se inducen en corazones con fibrosis, promoviendo la migración de los CFs y el reclutamiento de MioFBs, así como también la acumulación de colágeno, cuya eliminación puede mitigar el daño fibrótico. Además, la proteína SPARC también potencia la señalización de factores de crecimiento y el proceso de angiogénesis (188,189). Además, las células inmunitarias también juegan un papel importante en el proceso de fibrosis cardíaca. La infiltración de macrófagos y otras células del sistema inmune en el tejido dañado contribuyen significativamente a la activación de los CFs y a la síntesis de MEC. En conjunto, la acumulación excesiva de MEC y la reorganización de sus componentes generan rigidez, disminuyen la capacidad contráctil del corazón y favorecen el desarrollo de IC.

3.5. REMODELADO CARDÍACO

El remodelado cardíaco se refiere a una serie de cambios en la expresión génica, así como alteraciones moleculares, celulares e intersticiales, que se traducen clínicamente en modificaciones en el tamaño, la forma y la función del corazón. Este proceso adaptativo y fisiopatológico ocurre en respuesta a condiciones como un IM, una sobrecarga de presión (HTA, estenosis aórtica), una miocarditis, una miocardiopatía dilatada o una sobrecarga de volumen. Su objetivo es compensar el gasto cardíaco inadecuado, normalizando la tensión sobre las paredes del corazón. El remodelado es facilitado principalmente por los cardiomiocitos, aunque también participan el intersticio cardíaco, el colágeno, la vasculatura coronaria y los CFs (190). En respuesta a un IM, el proceso de remodelado cardíaco involucra varios mecanismos clave, como son: la angiogénesis, la necrosis/pérdida de cardiomiocitos, la hipertrofia de los

cardiomiocitos restantes y la proliferación de los CFs. Estos mecanismos resultan en un aumento en el depósito de colágeno y alteraciones en la MEC, además de cambios en hormonas intracelulares, citocinas, matriquinas y factores de crecimiento. Entre estos factores se encuentran la IL-6, el TGF- β , la ET-1, el TNF- α , el FGF y la Ang.II, los cuales juegan roles fundamentales en la apoptosis, en la angiogénesis y en las respuestas cardioprotectoras tras la lesión (191–194).

El proceso de reparación del tejido cardíaco tras un IM se divide en dos fases: una fase inflamatoria, que comienza con la oclusión de la arteria coronaria y se caracteriza por la degradación de la MEC, la infiltración de células inflamatorias y, la inducción de citocinas y péptidos bioactivos (163); y una fase de remodelado tisular, donde se produce la degradación adicional de la MEC para permitir la infiltración de células inflamatorias y la proliferación de macrófagos y CFs, lo que favorece la formación de cicatrices (167). Durante el proceso de cicatrización, se observa un aumento en los niveles de lamininas e integrina β 1 en la interfaz miocárdica, lo que favorece la acumulación de los CFs y el posterior depósito de colágeno, contribuyendo al desarrollo de fibrosis (Figura 15) (195,196).

Tras un IM, el remodelado cardíaco implica la formación de una red microvascular a través del proceso de angiogénesis, esencial para proporcionar el oxígeno y los nutrientes necesarios a las células responsables de la reparación. Un desequilibrio en la síntesis y degradación del colágeno y, otros componentes de la MEC, puede incrementar la presión miocárdica y causar la disfunción del corazón. La degradación del colágeno presente produce una dilatación y una disminución de la rigidez del ventrículo, mientras que un aumento en el colágeno o reticulación da lugar a un miocardio más rígido provocando una disfunción diastólica ventricular (197). Los CFs secretan factores como la Ang.II y el TGF- β que afectan al proceso de reparación y recambio del colágeno. La secreción del factor TGF- β induce la hipertrofia de los cardiomiocitos y aumenta la producción de TIMPs, lo que disminuye eficazmente la degradación de la MEC provocando

INTRODUCCIÓN

su acumulación. La fibrosis y el exceso de colágeno endurecen el miocardio, alteran su dinámica mecánica y eléctrica, y pueden resultar en IC (195).

Tras la lesión, los cardiomiocitos supervivientes modifican sus interacciones con otras células y con la MEC, lo que lleva a un remodelado del ventrículo, tanto en el área lesionada como en zonas remotas al daño (163,198). La MEC puede adaptarse temporalmente a los cambios biomecánicos, pero un aumento excesivo y prolongado de la carga provoca un depósito anormal de colágeno, provocando una dilatación del ventrículo izquierdo y, por ende, conducir a una IC (199). La disposición y composición de las fibras de colágeno en el corazón afectan la distribución del estrés y al movimiento del líquido en los compartimentos extracelulares. Los cardiomiocitos responden a esta carga mecánica mediante señales químicas que coordinan la contracción muscular (200). Bajo condiciones hipertróficas, la transmisión de la carga mecánica a lo largo del miocardio puede engrosar la pared del ventrículo y aumentar la contractilidad cardíaca, lo cual puede ser beneficioso o perjudicial. Si el remodelado se vuelve no adaptativo, con hipertrofia descompensada, puede desencadenar una 'fibrosis reactiva o patológica' (196,201).

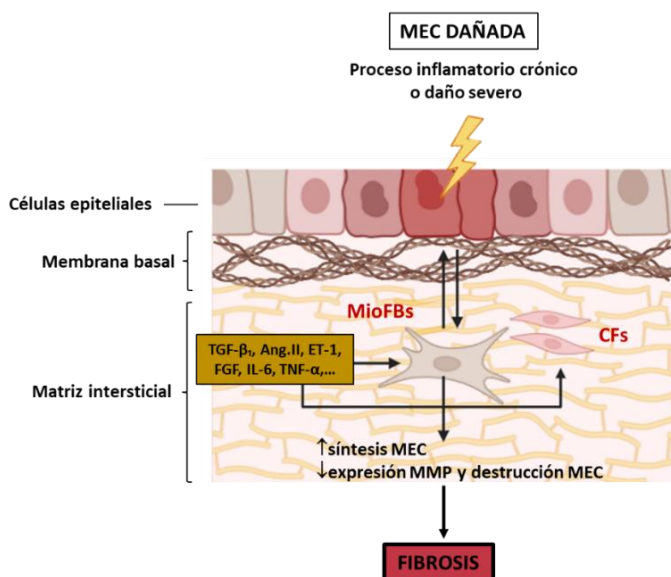


Figura 15. Representación general de la estructura de la matriz extracelular cardíaca tras sufrir un daño. Tras un estímulo dañino, los CFs se activan y se diferencian a MioFBs bajo la influencia de mediadores profibróticos (TGF- β_1 , Ang.II, ET-1, etc.). Los MioFBs producen cantidades excesivas de MEC mientras reducen la expresión de las MMPs, lo que favorece la acumulación de colágeno y el remodelado tisular patológico, caracterizando el proceso de fibrosis. Figura creada con BioRender.com. **MEC:** matriz extracelular; **MioFBs:** miofibroblastos; **CFs:** cardiofibroblastos; **TGF- β_1 :** factor de crecimiento transformante beta 1; **Ang.II:** angiotensina II; **ET-1:** endotelina-1; **FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos; **IL-:** interleucina; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral alfa; **MMPs:** metaloproteinasas.

3.5.1. TIPOS DE LESIONES FIBRÓTICAS

En condiciones fisiológicas, las fibras de colágeno en el corazón adulto brindan soporte a los cardiomiocitos. Sin embargo, tras una lesión, el corazón presenta una capacidad limitada para regenerarse y esta capacidad depende de la formación de cicatrices fibróticas para reparar el daño. La fibrosis miocárdica se puede clasificar en tres tipos según criterios histopatológicos (202,203):

- Fibrosis reparativa o de reemplazo: se produce después de un IM, cuando los cardiomiocitos necróticos son reemplazados por una cicatriz fibrótica de colágeno para prevenir la ruptura cardíaca (Figura 16).

INTRODUCCIÓN

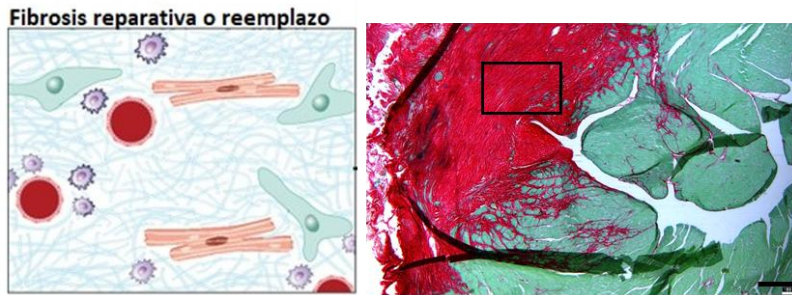


Figura 16. Representación histológica de la fibrosis reparativa o de reemplazo generada en el tejido cardíaco tras una lesión. Se muestra un esquema representativo (izquierda) junto con un corte transversal de tejido cardíaco infartado de ratón tras la tinción “Sirius Red” (derecha). El color rojo representa los depósitos de colágeno en la zona lesionada. Figura adaptada de (203) e Imágenes obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMi8 (Barra = 100 μ m).

- Fibrosis reactiva o intersticial: ocurre en la zona del borde del infarto y en el miocardio no dañado, debido a la expansión del tejido conectivo (endomysio y perimysio). Se caracteriza por la acumulación de proteínas de la MEC sin una pérdida significativa de cardiomiocitos, lo que provoca un endurecimiento del miocardio (**Figura 17**).

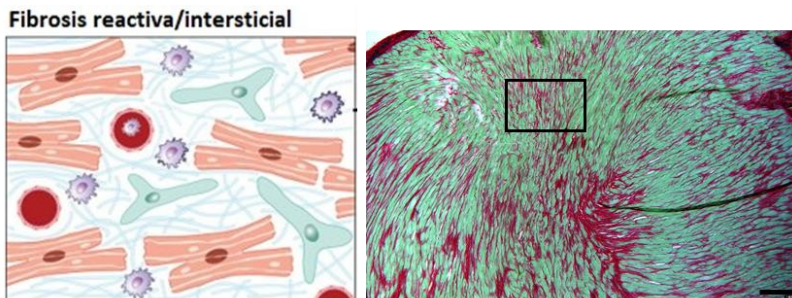


Figura 17. Representación histológica de la fibrosis reactiva o intersticial generada en el tejido cardíaco tras una lesión. Se muestra un esquema representativo (izquierda) junto con un corte transversal de tejido cardíaco infartado de ratón tras la tinción “Sirius Red” (derecha). El color rojo representa los depósitos de colágeno en la zona lesionada. Figura adaptada de (203) e Imágenes obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMi8 (Barra = 100 μ m).

- Fibrosis perivascular: aparece alrededor de los vasos sanguíneos intracoronarios, especialmente en la capa adventicia de la microvasculatura cardíaca (**Figura 18**). Este tipo de fibrosis puede estrechar los vasos sanguíneos y restringir el flujo sanguíneo, siendo común en enfermedades cardíacas hipertensivas (**204**).

Fibrosis perivascular

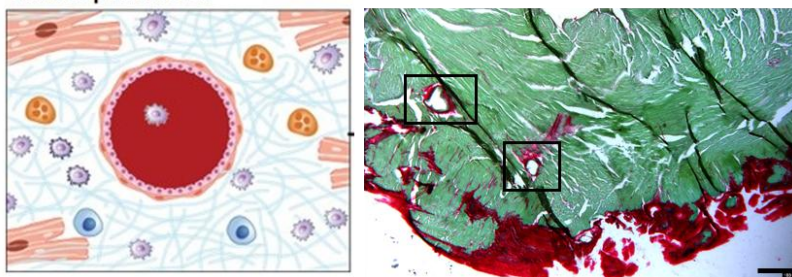


Figura 18. Representación histológica de la fibrosis perivascular generada en el tejido cardíaco tras una lesión. Se muestra un esquema representativo (izquierda) junto con un corte transversal de tejido cardíaco infartado de ratón tras la tinción “Sirius Red” (derecha). El color rojo representa los depósitos de colágeno en la zona lesionada. Figura adaptada de (**203**) e imágenes obtenidas con un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMi8 (Barra = 100 μ m).

La persistencia en el tiempo del estímulo profibrótico puede perpetuar la fibrosis intersticial y perivascular originando una ‘fibrosis reactiva patológica’ que mayormente compromete a la función cardíaca (**204,205**).

3.6. DIAGNÓSTICO DE LA FIBROSIS CARDÍACA: BIOMARCADORES

Para el diagnóstico de la fibrosis cardíaca, la biopsia endomiocárdica sigue siendo el método estándar, pero debido a sus limitaciones, se recurre a métodos alternativos no invasivos que consisten en utilizar biomarcadores cardíacos específicos, clasificados en diversos grupos tal y como se muestra en la **Tabla 4** (**206–209**), donde aparecen algunos de los biomarcadores más empleados en la práctica clínica para el diagnóstico de la patología fibrótica:

INTRODUCCIÓN

Tabla 4. Biomarcadores cardíacos empleados para el diagnóstico de la fibrosis/insuficiencia cardíaca.

BIOMARCADOR	FUNCIÓN	IMPLICACIÓN EN LA FIBROSIS/IC	NIVELES INDICATIVOS
REMODELADO DE LA MEC Y FIBROSIS			
GAL-3	Promueve activación CFs y producción de colágeno	Asociada con fibrosis y remodelado, peor pronóstico en IC y miocardiopatía dilatada	Niveles >25-30 ng/mL en IC, <20 ng/mL en personas sanas
PICP/PIIINP	PICP: Liberado en la síntesis colágeno tipo I	Altamente correlacionado con la fibrosis miocárdica y FVCI	Niveles ↑: producción activa colágeno
	PIIINP: Generado en la conversión del procolágeno tipo III a colágeno tipo III	Correlacionado con la fibrosis y gravedad de IC	Niveles ↑: indican fibrosis
sST2	Relacionado con respuesta cardíaca al estrés y fibrosis	Refleja la gravedad de fibrosis y riesgo de eventos adversos en IC	Niveles >35 ng/mL indican pronóstico negativo
MMPs	Degradan la MEC	Alteración MMPs/TIMPs contribuye a la fibrosis o degradación MEC	↑MMP1: menor fibrosis; MMP9 relacionada con áreas de fibrosis en miocardiopatía
LESIÓN DE CARDIOMIOCITOS			
Troponinas cardíacas (T e I)	Biomarcadores específicos de necrosis miocárdica	Lesión miocardio, diagnóstico de IM y pronóstico de IC	Troponina I >0.4 ng/mL daño miocárdico
DETERIORO BIOMECÁNICO			
Péptidos natriuréticos (BNP, NT-proBNP)	Indicadores de estrés y sobrecarga cardíaca	Diagnóstico de IC, correlacionados con fibrosis en etapas avanzadas de IC	BNP >400 pg/mL IC descompensada; BNP <100 pg/mL descarta IC aguda; <35 pg/mL indica ausencia de IC
INFLAMACIÓN RESPUESTA INMUNE			
CT-1	Citocina que induce la expresión de colágeno tipo I y III	Asociada con fibrosis en HTA y IC, pero limitada como marcador de fibrosis	Correlación con niveles de PICP, pero no con FVC

↓: disminución; ↑: aumento; **GAL-3**: galectina-3; **PICP**: propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I; **PIIINP**: propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III; **FVCI**: fracción

volumétrica de colágeno intersticial; **FVC**: fracción volumétrica del colágeno; **IC**: insuficiencia cardíaca; **sST2**: isoforma soluble de supresión de tumorigenicidad 2; **MMPs**: metaloproteinasas; **TIMPs**: inhibidor tisular de las metaloproteinasas; **BNP**: péptido natriurético cerebral; **NT-proBNP**: propéptido natriurético cerebral N-terminal; **CT-1**: cardiotrofina-1; **HTA**: hipertensión arterial; **MEC**: matriz extracelular; **IM**: infarto de miocardio; **CMs**: cardiomiocitos.

4. ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS ACTUALES EN EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

El manejo terapéutico del paciente con IC es complejo en función del tipo de IC (ICEFp o ICEFr), de las comorbilidades y de los signos y sintomatología clínica de cada paciente. La mayoría de los pacientes requieren combinaciones terapéuticas y ajuste de dosis individualizadas para un control adecuado de la patología. En la **Tabla 5**, se indican las estrategias farmacológicas recomendadas por las guías clínicas actuales para el manejo de la IC (**208,210–212**). La mayoría de estos grupos terapéuticos van dirigidos a mejorar los parámetros hemodinámicos sistémicos de los pacientes, y así reducir el trabajo cardíaco, mejorando la contractilidad del corazón. Adicionalmente, existe tratamientos coadyuvantes junto con otros fármacos para controlar las comorbilidades CV asociadas a la IC, como son los fármacos hipolipemiantes, los fármacos hipoglucemiantes, los anticoagulantes, etc. A pesar de las numerosas opciones terapéuticas disponibles, todas ellas mejoran la calidad de vida del paciente, alivian los síntomas y previenen el progreso de la enfermedad, pero no resuelven de forma definitiva la patología. De hecho, los datos epidemiológicos señalan que, incluso en pacientes controlados farmacológicamente, la mortalidad se mantiene muy elevada (aproximadamente un 50%) a los 5 años desde su diagnóstico (**12**).

Por tanto, se necesitan nuevas terapias dirigidas a dianas más específicas que resuelvan la patología cardíaca asociada a la IC como es la ‘fibrosis reactiva’.

INTRODUCCIÓN

Tabla 5. Estrategias farmacológicas actuales para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

GRUPO FARMACOLG.	MECANISMO ACCIÓN	EFFECTOS EN LA IC	FÁRMACOS
IECA/ARA-II	(-) SRAA, ↓ Ang.II (vasoconstrictor)	Mejoran la función cardíaca, ↓ PA, ↓ morbimortalidad, previenen la fibrosis	enalapril, lisinopril, ramipril, losartán, valsartán
Inhibidores renina	(-) enzima renina, bloqueando la síntesis de Ang.II	Modulan el SRAA, Previenen la fibrosis cardíaca	aliskireno
ARNI	(-) neprilisina y el SRAA (efecto dual)	Mejoran la función cardíaca, previenen la progresión de la IC reducen la carga de volumen, previniendo la fibrosis	LCZ696 (sacubitrilo/valsartán)
ARM	Bloquean aldosterona, ↓ reducen sobrecarga volumen	Previenen remodelado ventricular, ↓ fibrosis, mejoran función cardíaca	espironolactona, eplerenona
β-bloqueantes	Bloquean receptores β-adrenérgicos (-) SNS, ↓ FC y la contractilidad	↓ Morbimortalidad, mejoran la estructura y función cardíaca, evitan el remodelado y ↓ síntomas de IC	bisoprolol, carvedilol, metoprolol
Diuréticos	↑ Excreción agua y electrolitos	Alivian la congestión (sobrecarga ventricular) y los síntomas asociados a la retención líquidos	furosemda, bumetanida, espironolactona
iSGLT2	(-) reabsorción glucosa en riñones, ↑ diuresis	Mejoran función cardíaca ↓ hospitalizaciones y mortalidad y evitando la fibrosis cardíaca	dapagliflozina, empagliflozina

(-): inhibición; ↓: disminución; ↑: aumento; IC: insuficiencia cardíaca; **IECA**: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; **ARA-II**: antagonistas del receptor de Ang.II; **PA**: presión arterial; **SRAA**: sistema renina-angiotensina-aldosterona; **Ang.II**: angiotensina II; **ARNI**: inhibidores de la neprilisina/antagonistas de los receptores de angiotensina; **ARM**: antagonistas del receptor mineralocorticoide; **SNS**: sistema nervioso simpático; **FC**: frecuencia cardíaca; **iSGLT2**: Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2.

5. PERSPECTIVAS DE FUTURO EN EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS CARDÍACA

La fibrosis cardíaca es uno de los procesos asociados a la IC, es por ello por lo que sus vías de activación o células efectoras podrían ser claves como dianas terapéuticas con el objetivo de tratar dicha patología. El control o la reversión de la ‘fibrosis reactiva o patológica’ evitaría el progreso de la IC. Actualmente, en la terapia CV no existe ningún fármaco dirigido específicamente a reducir la fibrosis cardíaca. No obstante, la fibrosis es un proceso común que puede afectar a todos los órganos y sistemas. De hecho, existen fármacos antifibróticos que se encuentran en diversas fases de ensayos clínicos (**Figura 19**), principalmente en fases I y II de investigación, dirigidos a otros órganos (**213**). Los escasos fármacos en fase IV ya aprobados, están indicados para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática [pirfenidona (PFD) y nintedanib (NTB)]. Ambos fármacos fueron aprobados y comercializados por la “*Food and Drug Administration*” (FDA) en 2014. En el caso del tratamiento de la fibrosis cardíaca, no hay ningún compuesto, a excepción de la pirfenidona, que se esté investigando a nivel clínico (fase II) (**214**), pero son escasos los estudios experimentales en el área CV (**Figura 19**).

La **Tabla 6** muestra las nuevas estrategias farmacológicas dirigidas específicamente a las vías fibróticas: inhibidores del TFG- β (pirfenidona, tranilast), inhibidores de los receptores asociados a tirosinas quinasas [VEGFR, FGFR, PDGFR] (nintedanib) e inhibidores de integrinas (cilengitide). A parte de los fármacos aprobados para tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, otros que están aprobados para otras patologías (tumores [cilengitide] o alergias [tranilast]) son objeto de estudios preclínicos por su potencial propiedad antifibrótica.

INTRODUCCIÓN

Tabla 6. Fases de desarrollo de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas implicadas en la fibrosis.

DIANA TERAPÉUTICA	COMPUESTO	FASE DE DESARROLLO FIBROSIS CARDÍACA
Inhibidores del TGF- β	Pirfenidona (PFD)	→ <u>Estudios preclínicos</u> (murinos): ↓ fibrosis cardíaca, previniendo el remodelado y el depósito de colágeno. Además, tiene efectos antiinflamatorios significativos (215–218). → <u>Ensayos clínicos</u> (fase II): muestran eficacia en fibrosis cardíaca postinfarto en pacientes con ICfEp (214). * NCT05531955 (en curso): tratamiento de la fibrosis cardíaca después de sufrir un IM.
	Tranilast	→ <u>Ensayos preclínicos</u> (murinos): ↓ fibrosis cardíaca al suprimir TGF-β y tiene propiedades antiinflamatorias (219–222). → <u>Ensayos preclínicos</u> (CFs humanos): ↓ proliferación, migración y fibrosis inducida por Ang.II (223). * Ausencia de ensayos clínicos.
	GW788388	→ <u>Ensayos preclínicos</u> (murino): ↓ fibrosis cardíaca en ratones con enfermedad de Chagas (224). * Ausencia de ensayos clínicos.
Inhibidores de tirosina quinasa (VEGFR, FGF, PDGFR)	Nintedanib (NTB)	→ <u>Ensayos preclínicos</u> (murinos): escasos estudios donde se demuestra su posible efecto beneficioso en la fibrosis cardíaca (225,226). → <u>Ensayos clínicos</u>: Evidencia limitada (227,228), faltan investigaciones en este campo.
Inhibidores de integrinas ($\alpha\text{v}\beta 3$ y $\alpha\text{v}\beta 5$)	Cilengitide (CIL)	Antitumoral para pacientes con glioblastoma recién diagnosticado (229). → <u>Estudios preclínicos</u> (murinos): propiedades antiangiogénicas y antifibróticas (230–232). * Ausencia de ensayos clínicos.

↓: disminución; TGF- β : factor de crecimiento transformante beta; PFD: pirfenidona; ICfEp: insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada; IM: infarto de miocardio; CFs: cardiofibroblastos; NTB: nintedanib; CIL: cilengitide; VEGFR: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular; FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La escasez de evidencia sobre la acción de fármacos antifibróticos a nivel cardíaco, junto con la relevancia clínica que supone el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la disfunción cardíaca, común a diversas patologías (IC), centran el interés de la presente Tesis Doctoral. La hipótesis de la presente Tesis Doctoral es que los fármacos (pirfenidona, cilengitide, nintedanib y losartán) podrían reducir la respuesta fibrótica a nivel cardíaco.

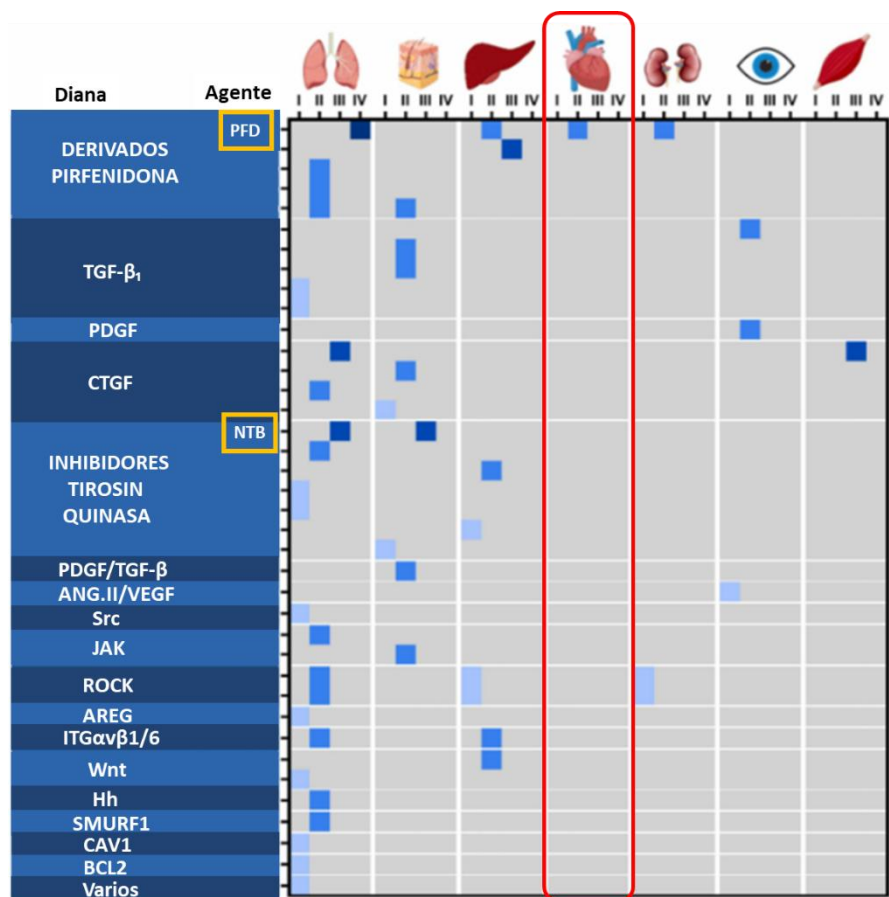


Figura 19. Agentes farmacológicos en fase de investigación clínica dirigidos contra las vías centrales de la fibrosis en diferentes órganos. La figura muestra los diferentes agentes farmacológicos, junto con su diana efectora, que se encuentran actualmente en diferentes fases de ensayo clínico contra la fibrosis en diferentes órganos, destacando el NTB y la PFD. En concreto, en la figura se destaca con un **recuadro rojo** los fármacos en fase de investigación contra la fibrosis cardíaca, donde queda evidente la escasa investigación farmacológica contra este órgano. Figura extraída y adaptada de (213). PFD: pirfenidona; NTB: nintedanib.



OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral consiste en analizar la potencial aplicación de fármacos antifibróticos en el territorio cardiovascular (CV).

Para ello, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el potencial efecto antifibrótico de los fármacos en cardiofibroblastos (CFs) humanos primarios determinando:
 - 1.1. La expresión génica y proteica de diversos marcadores involucrados en el proceso fibrótico.
 - 1.2. La función de migración celular mediante ensayos funcionales.
2. Estudiar el potencial efecto antiinflamatorio sistémico de los fármacos.
3. Investigar el potencial efecto antifibrótico de los fármacos en un modelo *in vivo* de fibrosis cardíaca generado mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD), determinando:
 - 3.1. La infiltración leucocitaria en el tejido cardíaco infartado.
 - 3.2. El depósito de colágeno en el tejido cardíaco infartado.
 - 3.3. La proliferación celular y el proceso de angiogénesis en el tejido cardíaco infartado.
 - 3.4. La expresión génica de marcadores proinflamatorios y profibróticos en el tejido cardíaco.
 - 3.5. Los biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco.



MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

BLOQUE I: EXPERIMENTOS *IN VITRO*

1. CULTIVO DE CARDIOFIBROBLASTOS HUMANOS PRIMARIOS

1.1. MUESTRA EXPERIMENTAL

Se emplearon células primarias de CFs humanos adquiridos de la casa comercial Innoprot® (P10452). Los CFs humanos primarios fueron aislados de corazones adultos sanos y criopreservados en nitrógeno líquido en pase 2, conteniendo $\geq 5 \times 10^5$ células/mL. Para el inicio del cultivo, el vial adquirido se calentó a 37°C y se llevó a cultivar a un frasco T75 (previamente pretratado con polilisina, 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) junto con 15 mL de medio apto para fibroblastos (*FM-2*, “*Fibroblasts Medium-2*”) que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo de estas células. Además, el medio está suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, factor de crecimiento *FGS-2* (“*Fibroblasts Growth Supplement-2*”) y un 1% (v/v) de estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y penicilina (100 U/mL) para evitar la contaminación. El frasco se mantuvo a 37°C y 5%CO₂ hasta alcanzar la confluencia adecuada (80-90%). Las células se amplificaron hasta el pase 5-6 para realizar los experimentos. Finalmente, las células se traspasaron a placas de cultivo aptas para su tratamiento y se incubaron a las condiciones óptimas hasta alcanzar la confluencia deseada, según el tiempo de tratamiento al que se fueran a someter.

1.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Alcanzada la confluencia óptima para el tratamiento de los CFs humanos primarios, se establecieron dos protocolos experimentales:

1.2.1. EFECTO DE ESTÍMULOS PROFIBRÓTICOS

Para establecer el modelo *in vitro*, los CFs humanos primarios fueron tratados con los estímulos TGF- β_1 , Ang.II y condiciones de hipoxia, a diversas

MATERIAL Y MÉTODOS

concentraciones, durante dos tiempos diferentes, 24 y 48h (**Tabla 7** y **Figura 20**). Las condiciones de hipoxia se establecieron utilizando una cámara de hipoxia (Thermo Scientific® Forma Steri-Cycle i160) de la sección de cultivos celulares de la Unidad Central de Investigación Médica (UCIM) de la Universitat de València.

Tabla 7. Estímulos profibróticos seleccionados para inducir fibrosis en un cultivo primario de CFs humanos.

VEHÍCULO/CONTROL	ESTÍMULO PROFIBRÓTICO	CONCENTRACIÓN
H ₂ O estéril	TGF- β_1	5 y 15 ng/mL
	Ang. II	1 y 10 μ M
Normoxia ($\approx 21\%O_2$)	Hipoxia	1%O ₂

H₂O: agua; TGF- β_1 ; factor de crecimiento transformante beta 1; Ang.II: angiotensina II.

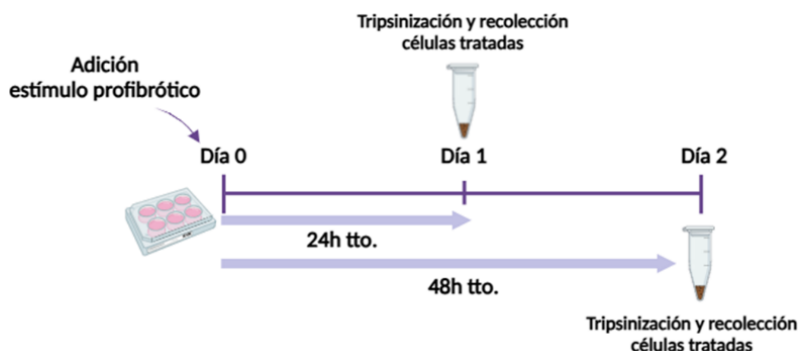


Figura 20. Protocolo experimental de tratamiento para inducir fibrosis en el cultivo primario de CFs humanos mediante estímulos profibróticos. Los CFs humanos primarios fueron tratados con los estímulos profibróticos seleccionados: TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μ M) e hipoxia (1%O₂), durante 24 y 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento las células fueron recogidas mediante tripsinización y almacenadas a -80°C hasta su utilización. Figura creada con BioRender.com.

1.2.2. EFECTO DE POTENCIALES FÁRMACOS ANTIFIBRÓTICOS

Se evaluó el efecto de los fármacos: **pirfenidona** (PFD), **cilengitide** (CIL), **nintedanib** (NTB) y **losartán** (LOS). Cada fármaco fue adicionado al cultivo primario de CFs humanos al mismo tiempo que el estímulo profibrótico y fueron incubados durante 24 y 48h (**Figura 21**). Se emplearon dos concentraciones de cada uno de los fármacos (una más baja próxima a las concentraciones

plasmáticas medidas en pacientes; y otra muy superior recogida de la bibliografía existente) (Tabla 8).

Tabla 8. Tratamiento de los CFs humanos primarios con los fármacos experimentales.

VEHÍCULO/CONTROL	FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	REFERENCIAS
H ₂ O estéril	Pirfenidona (PFD)	0.085 y 1 mM	(233–235)
	Cilengitide (CIL)	0.5 y 1 μM	(231,236,237)
	Losartán potásico (LOS)	1.5 y 10 μM	(238,239)
DMSO (0.05%)	Nintedanib (NTB)	0.02 y 2 μM	(240–244)

H₂O: agua; DMSO: dimetilsulfóxido.

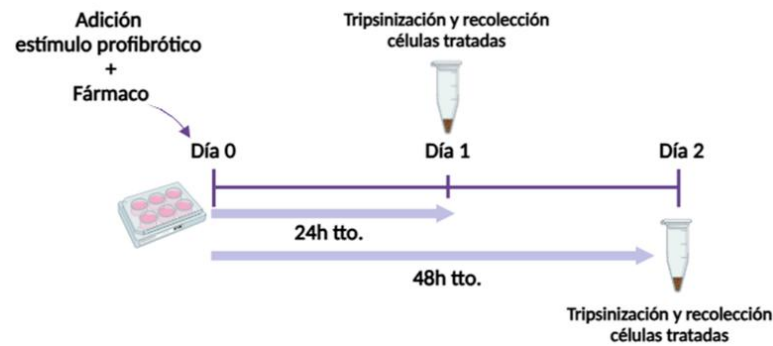


Figura 21. Protocolo experimental de tratamiento de los CFs humanos primarios con los fármacos experimentales. Los CFs humanos primarios fueron tratados con los fármacos experimentales: PFD (0.085 y 1 mM), CIL (0.5 y 1 μM), NTB (0.02 y 2 μM) y LOS (1.5 y 10 μM), junto con el estímulo profibrótico, durante 24 y 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento las células fueron recogidas mediante tripsinización y almacenadas a -80°C hasta su utilización. Figura creada con BioRender.com.

Finalizado el tiempo de tratamiento en ambos protocolos, los CFs humanos primarios tratados se recogieron mediante tripsinización empleando tripsina/ ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se lavaron, se resuspendieron en 1 mL de solución salina tamponada Dulbecco's PBS sin Ca⁺² y Mg⁺² (DPBS⁻) y se centrifugaron durante 5 min a 1.000 rpm. Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular tratado se almacenó a -80°C hasta su utilización.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.3. ENSAYOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

1.3.1. ENSAYOS FUNCIONALES

1.3.1.1. Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad y proliferación de los CFs humanos primarios tras los distintos tratamientos, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular. Este ensayo se basa en la reducción de la sal de **tetrazolio** (MTT) (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazil-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), soluble de color amarillo, a cristales de **formazán** (insoluble, de color púrpura), debido a la acción de la enzima succinil deshidrogenasa mitocondrial de las células activas (**Figura 22**). Los cristales de formazán formados se solubilizaron y la solución coloreada resultante se cuantificó espectrofotométricamente.

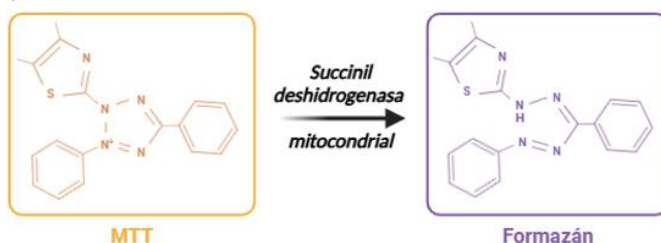


Figura 22. Metabolización de la sal de MTT a formazán. El MTT, un compuesto soluble de color amarillo es reducido por la enzima succinil deshidrogenasa de las mitocondrias activas, formando cristales insolubles de formazán de color púrpura. Figura creada con BioRender.com.

Se cultivaron CFs humanos primarios en medio de fibroblastos (*FM-2*), en una placa de 96 pocillos y se incubó a las condiciones óptimas de crecimiento (37°C y 5%CO₂). Al día siguiente, se procedió al tratamiento de las células (tratamientos de las **Tablas 7 y 8**) durante 24 y 48h empleando medio *FM-2* sin SFB. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se adicionó el reactivo MTT a la concentración de 0.5 mg/mL a cada uno de los pocillos y se llevó a incubar durante 4h a 37°C y 5%CO₂. Se decantó el sobrenadante, se adicionó 100 µL del solubilizador (10% dodecil sulfato sódico (SDS) en 0.01 M de HCl) a cada uno de

los pocillos y se llevó a incubar la placa toda la noche. Tras 24h, se comprobó la solubilización total de los cristales de formazán y se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 550 nm (λ referencia = 650 nm) utilizando el espectrofotómetro Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific®, Massachusetts, EEUU). Para la cuantificación de la viabilidad, se tomaron como valor de 100% de viabilidad los CFs tratados con vehículo crecidos en condiciones de normoxia (21%O₂).

1.3.1.2. Citometría de flujo. Cambios morfológicos, apoptosis celular y moléculas de adhesión

La técnica de citometría de flujo permite, en base a las características de tamaño (*FSC, forward scatter*) y granulosidad (*SSC, side scatter*) de los CFs humanos primarios, el estudio de los cambios morfológicos, el proceso de apoptosis celular y la expresión de las moléculas de adhesión, producidos en los CFs humanos primarios empleándose el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter®, California, EEUU).

Para ello, los CFs se cultivaron en medio *FM-2* en una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C y 5%CO₂. Tras 24h, se procedió al tratamiento de las células con los distintos fármacos experimentales durante 24 y 48h (**Tabla 8**). Transcurrido el tiempo de tratamiento, se recogieron las células mediante tripsinización y se analizaron 10.000 eventos/muestra con el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter®, California, EEUU).

MATERIAL Y MÉTODOS

I. CAMBIOS MORFOLÓGICOS: los cambios morfológicos producidos en los CFs humanos primarios tras el tratamiento farmacológico se analizaron en base a los cambios producidos en el tamaño (FSC) y la granulosidad (SSC) celular tras analizar 10.000 eventos/muestra (**Figura 23**).

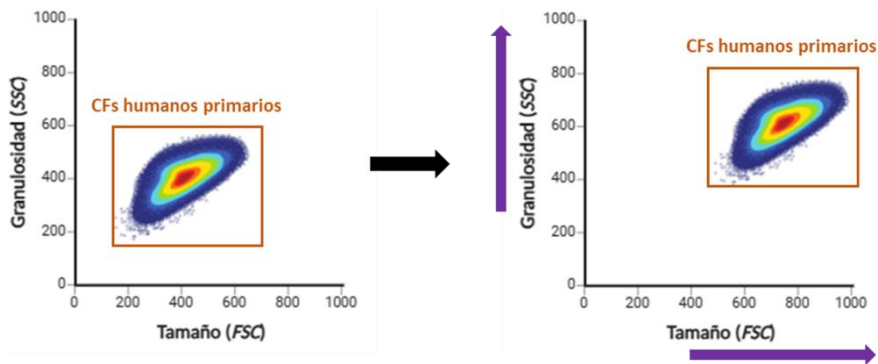


Figura 23. Histograma representativo de los cambios morfológicos observados en los CFs humanos primarios tras el tratamiento farmacológico. En la figura se observa un esquema representativo de los cambios morfológicos producidos en el tamaño (FSC) y la granulosidad (SSC) de los CFs humanos primarios antes (figura izquierda) y después (figura derecha) del tratamiento farmacológico, tras analizar 10.000 eventos/muestra con el citómetro de flujo. Figura creada con BioRender.com.

II. APOPTOSIS-NECROSIS CELULAR: tras el tratamiento farmacológico los CFs humanos se recogieron mediante tripsinización, se lavaron y se resuspendieron en una solución *1X Binding Solution* (proporcionado por el kit) a una concentración final de $1 \cdot 10^6$ células/mL. Posteriormente, se incubaron durante 15 min a 4°C y en oscuridad con los anticuerpos de **anexina-V FITC** (marca las células en apoptosis) y **yoduro de propidio-PE** (marca las células en necrosis). Se empleó como control positivo de apoptosis la staurosporina (4 μ M, 5h de tratamiento). El porcentaje de apoptosis-necrosis de 10.000 eventos/muestra se midió utilizando un citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter®, California, EEUU) y los datos fueron analizados con el programa Kaluza Analysis 2.2.1 (**Figura 24**).

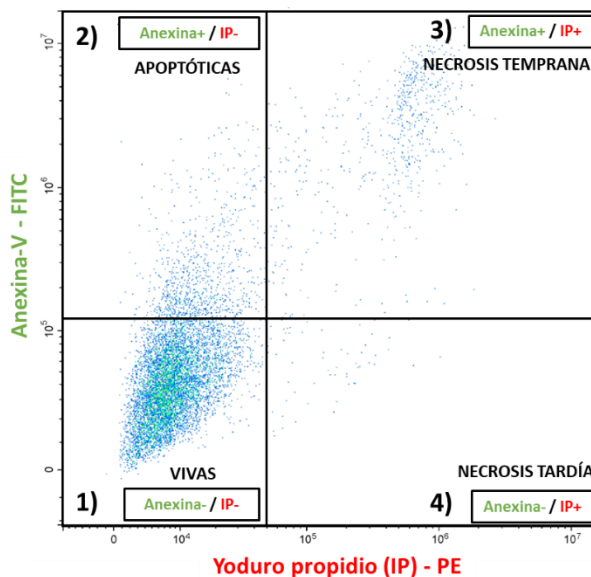


Figura 24. Histograma representativo del proceso celular de apoptosis-necrosis en los CFs humanos primarios tras el tratamiento farmacológico. A-1) En una célula viva, la membrana plasmática se encuentra íntegra y, por tanto, ni la anexina-V ni el IP se pueden unir a sus ligandos correspondientes (anexina-/IP-); A-2) En apoptosis temprana, la membrana de las células sufre un cambio conformacional que permite la unión de la anexina-V a su ligando, la fosfatidilserina (anexina+/IP-); A-3) Mientras que en apoptosis tardía (anexina+/IP+), la célula ha perdido la integridad de la membrana, permitiendo la unión de la anexina-V y la entrada del IP a la célula; A-4) La célula necrótica ha perdido su integridad y el IP se incorpora al núcleo de la célula (anexina-/IP+). Figura extraída y adaptada del citómetro CytoFLEX S. IP: yoduro de propidio; FITC: fluoresceína de isotiocianato; PE: ficoeritrina.

III. EXPRESIÓN MOLÉCULAS DE ADHESIÓN: se analizaron las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en los CFs humanos primarios. 4h antes de finalizar el tiempo de tratamiento farmacológico (24h), los CFs fueron tratados con el estímulo proinflamatorio, TNF- α (10 ng/mL). Transcurrido el tiempo de tratamiento, los CFs se incubaron durante 30 min a 4°C y en oscuridad, con los anticuerpos que marcan las moléculas de adhesión ICAM-1 (anti-CD54) y VCAM-1 (anti-CD106), así como con el isotipo control anti-IgG₁, conjugados con fluoresceína de isotiocianato (FITC) o ficoeritrina (PE), como se muestra en la **Tabla 9**, a concentraciones saturantes. Tras la incubación con los anticuerpos, las células cardíacas se centrifugaron y el sedimento celular obtenido fue

MATERIAL Y MÉTODOS

resuspendido en tampón salino fosfato (PBS). Después de identificar la población de los CFs, se analizó la expresión de las moléculas de adhesión en el citómetro de flujo estudiando la mediana de la intensidad de fluorescencia.

Tabla 9. Moléculas de adhesión analizadas en los CFs humanos primarios mediante citometría de flujo.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN PRESENTES EN LOS CFs HUMANOS PRIMARIOS	
Superfamilia de inmunoglobulinas	ICAM-1-PE (CD54)
	VCAM-1-FITC (CD106)
Isotipo control anti-IgG ₁ , conjugados FITC o PE, según corresponda	

FITC: fluoresceína de isotiocianato; PE: ficoeritrina; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.

1.3.1.3. Ensayo de migración celular

La capacidad de cicatrización de los CFs humanos primarios frente a un daño se analizó mediante la realización de experimentos *in vitro* que consiste en evaluar su capacidad de migración. Se cultivaron CFs humanos primarios en medio de fibroblastos (FM-2) en una placa de 6 pocillos y se llevó a incubar a 37°C y 5%CO₂ hasta obtener una monocapa uniforme de células 100% confluentes. A continuación, se realizó un raspado único, verticalmente sobre el pocillo con una punta de pipeta desechable de 1-10 µL. Tras lavar con DBPS⁻ para eliminar los restos celulares, se adicionó medio FM-2 sin SFB y se procedió al tratamiento de las células con los diversos fármacos experimentales (Tabla 8). Se empleó medio sin FBS para que los CFs dejaran de proliferar y permanecieran en la etapa G1 o G0 del ciclo celular (245). Se realizó un seguimiento en el tiempo del cierre de la herida tomando tres fotos en campo claro y en la misma zona de la herida (t=0, 8, 24 y 48h) empleando un microscopio óptico invertido de fluorescencia Leica® DMI8 (Leica Microsystems, Barcelona, España) y el software Cell^R v.2.8 (Figura 25). El área de la herida fue cuantificada con el programa informático ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, EEUU) a partir de tres fotografías

representativas tomadas de cada pocillo a los diferentes tiempos. El 100% de la herida abierta se correspondió con las fotografías tomadas a $t=0h$.

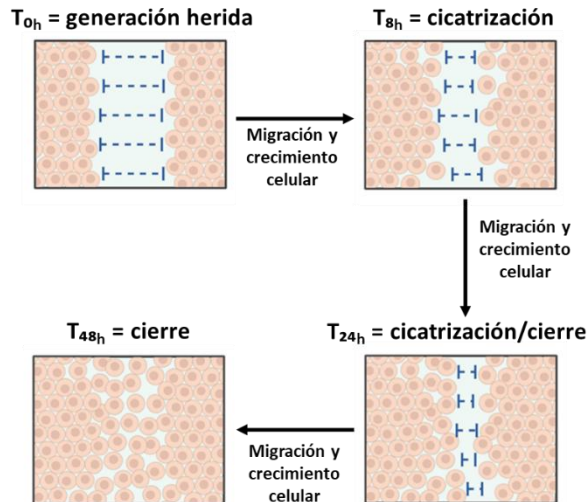


Figura 25. Representación gráfica del ensayo de migración celular en los CFs humanos primarios. La figura muestra el proceso de migración celular de los CFs humanos primarios tras generar una herida en el cultivo. Para analizar el proceso de migración celular y el cierre de la herida, se realizó un seguimiento tomando fotos en la misma zona de la herida tras 8, 24 y 48h. Figura creada con BioRender.com.

1.3.2. ENSAYOS DE EXPRESIÓN

1.3.2.1. PCR cuantitativa en tiempo real. Expresión génica

I. EXTRACCIÓN DEL ARN PROCEDENTE DE LOS CFs HUMANOS PRIMARIOS: el sedimento celular de CFs humanos primarios tratados y almacenados a -80°C fue utilizado para la extracción y purificación del ARN (ácido ribonucleico) mediante el empleo del kit Illustra RNAspin Mini, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Así, este fue resuspendido en 353 μL de solución de lisis (proporcionada por el kit) junto con β -mercaptoetanol (proporción 1:100) y homogeneizado con ayuda de una jeringa de 1 mL y una aguja de 25G. Posteriormente, se adicionaron 350 μL de etanol 70% (v/v) y la mezcla se transfirió a una columna para retener el ARN celular extraído. Tras la incubación

MATERIAL Y MÉTODOS

con la ADNasa para eliminar el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico, se procedió a lavar las columnas con las soluciones de lavado proporcionados por el kit de extracción (*Wash Buffer I* y *Wash Buffer II*). Finalmente, el ARN extraído fue eludido de la columna empleando 30 µL de agua libre de ARNsas. La pureza y la concentración del ARN presente en las muestras se determinó mediante espectrofotometría, utilizando el Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific®, Massachusetts, EEUU).

II. SÍNTESIS DEL ADNc POR TRANSCRIPCIÓN INVERSA: a partir del ARN extraído, el ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario) fue sintetizado por transcripción inversa empleando el kit de reactivos PrimeScript™ RT. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µL usando 1 µg del ARN extraído, 4 µL de 5X *PrimeScript Buffer*, 1 µL de *PrimeScript RT Enzyme Mix*, 1 µL (50 pmol) de hexámeros aleatorios y 1 µL (25 pmol) de *Oligo dT* cebador. La reacción se llevó a cabo en el termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Massachusetts, EEUU). Una vez sintetizado el ADNc, las muestras fueron diluidas 1:2 con agua libre de ARNsas y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

III. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR): la qPCR se realizó con SYBR® Premix Ex Taq™ que contiene ADN polimerasa Takara Ex Taq HS, mezcla de dNTP, Mg²⁺, Tli RNasa H y TB Green I. La reacción se llevó a cabo mezclando 1 µL de ADNc sintetizado, 5 µL de la pre-mezcla SYBR Ex Taq 2X, 2 µM del cebador sentido y antisentido del gen que se desea analizar, y agua libre de ARNsas en un volumen final de 10 µL. La qPCR se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real Light Cycler 96 (Roche®, Basilea, Suiza), siguiendo el siguiente protocolo: 30 seg a 95°C; 5 seg a 95°C; 20 seg a 60°C (50 ciclos); 1 seg a 95°C; 15 seg a 65°C; 1 seg a 95°C y 30 seg a 40°C.

Los pares de cebadores utilizados para la realización de los experimentos fueron diseñados y adquiridos en Sigma-Aldrich®. Antes de su uso, los cebadores se

testaron realizando un análisis de la curva de fusión y una electroforesis estándar en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X que contiene tinción de ADN GELRED®. Posteriormente, las bandas fueron detectadas por fluorescencia a 535 nm en el equipo de detección Amersham ImageQuant 800 (Roche®). Los genes analizados se muestran en la **Tabla 10**.

Los datos de la qPCR fueron analizados usando el método comparativo de C_T (ciclo umbral) obteniendo la expresión génica relativa del gen de interés.

Este método de cuantificación (**246**) se basa en la ecuación siguiente:

$$\text{Cambio en la expresión génica relativa} = 2^{-\Delta(\Delta C_T)},$$

Donde:

$$\Delta C_T = (C_T \text{ gen de interés}) - (C_T \text{ gen de referencia}) \text{ y,}$$

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T \text{ grupo experimental}) - (\Delta C_T \text{ grupo control}).$$

Como gen de referencia se empleó el *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) o la *ACTAB* en función de las condiciones experimentales. Este último se empleó como gen de referencia para los experimentos de hipoxia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 10. Pares de cebadores humanos empleados para el análisis génico mediante qPCR.

GEN	CADENA SENTIDO (5'→3')	CADENA ANTISENTIDO (5'→3')
COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC		
COL1A1	GGAGCAGACGGGAGTTTCTC	CCGTTCTGTACGCAGGTGAT
COL3A1	CGCCCTCCTAATGGTCAAGG	TTCTGAGGACCAGTAGGGCA
FN1	AAACCAATTCTTGAGCAGG	CCATAAAGGGCAACCAAGAG
MMP9	AGTCCACCCTTGCTCTTC	CCCGAGTGAACCATAGCGG
TIMP1	TTCTCATTGCTGGAAACTGC	CAGGGGATGGATAAACAGGG
SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR		
S100A4 (FSP1)	TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT	CCTGTTGCTGTCCAAGTTGC
CDH2 (N-cadherina)	TGAAAGACCCATCCACGCC	CCTGCTCACCACCACTACTT
TGF-β₁	AGCAACAATTCCTGGCGATAC	CGGTAGTGAACCCGTTGATG
ACTA2 (α-SMA)	GCTCCCTGAACACCACCA	ACAGAGCCCAGAGCCATTGT
MARCADORES PROINFLAMATORIOS		
IL-1β	TTCGACACATGGGATAACGAGG	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
IL-6	ATGAGGAGACTTGCCTGGTG	CTGGCATTGTGTTGGGTC
TNF-α	AGCCGCATCGCCGTCTCCTA	CAGCGCTGAGTCGGTCACCC
REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR		
PDGFRα	GCACGCTCTTTACTCCATGTG	TCACTTCACTCTCCCAAAGC
PDGFRβ	CGTGGCTTTTCTGGTATCTTG	ACTTTCTTTGCGGGGGTATG
CONTROLES DE CARGA		
GAPDH	GCTCTCTGCTCCTCTGTTC	TTCCCGTTCTAGCCTTGAC
ACTAB (β-actina)	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

MEC: matriz extracelular; **COL1A1:** colágeno tipo I; **COL3A1:** colágeno tipo III; **FN1:** fibronectina; **MMP9:** metaloproteínasa 9; **TIMP1:** inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1; **FSP1:** proteína específica de fibroblastos 1; **CDH2:** cadherina 2 o N-cadherina; **TGF-β₁:** factor de crecimiento transformante beta 1; **ACTA2 (α-SMA):** alfa actina del músculo liso; **IL-:** interleucina; **TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa; **PDGFR-:** receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; **GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

1.3.2.2. Western Blot. Expresión proteica

I. EXTRACCIÓN PROTEICA DE CFs HUMANOS PRIMARIOS TRATADOS: el sedimento celular de CFs humanos primarios tratados y almacenados a -80°C fue utilizado para la extracción y cuantificación de las proteínas mediante el empleo de una mezcla en la proporción 1:10 de inhibidores de proteasas compuesta de

Tablet cOmplete Mini® y Phosphosafe®. Se agitaron las muestras y se dejaron incubar en hielo durante 10 min. Pasada la incubación, las muestras se volvieron a agitar y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C. El sedimento celular fue descartado y se utilizó el sobrenadante proteico de cada una de las muestras tratadas para la cuantificación.

II. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (ENSAYO DEL BCA): para llevar a cabo la cuantificación proteica se empleó el kit Pierce™BCA Protein Assay Reagent. El método del ácido bicinónico (BCA) se basa en la reducción de los iones cúpricos (Cu^{+2}) a iones cuprosos (Cu^{+1}) en medio alcalino, seguido de la quelación de estos iones formados con el compuesto BCA. Para la medición, se preparó una curva estándar de proteínas mediante diluciones seriadas de suero bovino de albúmina (SBA) (15.6 – 1000 $\mu\text{g/mL}$). En una placa de 96 pocillos se añadieron 10 μL de cada una de las muestras proteicas previamente extraídas, diluidas en agua destilada a la proporción 1:10, a cada pocillo. Posteriormente, se añadieron 200 μL del reactivo BCA diluido 1:50, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tanto las muestras como los diferentes puntos de la curva estándar se analizaron por duplicado. Tras 30 min de incubación de la placa (37°C, oscuridad y agitación lenta) se produjo la reacción proporcionando una coloración púrpura intensa que se midió a 570 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific®, Massachusetts, EEUU).

III. ANÁLISIS PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT:

- **Preparación de las muestras proteicas:** se adicionó un tampón de muestra 6X (0.5 mM tampón Tris-HCl pH=6.8, 25% glicerol (v/v), 10% SDS, 0.5% β -mercaptoetanol y 0.5% de azul de bromofenol) a las muestras proteicas previamente extraídas. Posteriormente, las muestras se calentaron a 100°C

MATERIAL Y MÉTODOS

durante 5 min en el Thermomixer confort (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania) para su desnaturalización.

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE):** se prepararon geles de poliacrilamida al 10% empleando una mezcla comercial de acrilamida/bisacrilamida (37.5:1). El proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se realizó mediante el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU). Preparado el gel, las muestras proteicas se cargaron en cantidades iguales (~25 µg proteína/pocillo) y se empleó un marcador de peso molecular EZ-Run™ Pre-Stained Recombinant Protein Ladder para poder determinar el peso molecular de las proteínas de interés. El proceso de electroforesis se realizó en una cubeta apta para el proceso con tampón de migración 1X (25 mM Tris pH=8.3, 0.1% de SDS y 192 mM de glicina), a un voltaje constante de 120 V a temperatura ambiente.

- **Transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa:** separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando una Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories, California, EEUU). El proceso de transferencia se llevó a cabo a 4°C en un tampón de transferencia 1X (25 mM Tris pH=8.3, 192 mM de glicerina y 20% de metanol), a un amperaje constante de 350 mA durante 75 min. Finalizada la transferencia, las membranas se sumergieron en una solución de Rojo de Ponceau para verificar la eficiencia del proceso. Esta solución tiñe de color rojo todas las proteínas presentes en la muestra.

- **Bloqueo e incubación con los anticuerpos correspondientes:** transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se incubaron con una solución de bloqueo para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. El bloqueo se realizó empleando leche en polvo desnatada o SBA al 5% (p/v) diluido en una solución salina tamponada con Tris y Tween (TBS-T), en función del anticuerpo

primario empleado. El bloqueo se realizó en agitación suave y a temperatura ambiente durante 1h. Finalizado el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 11**), preparado en solución de bloqueo suplementada con 0.02% de azida sódica durante toda la noche a 4°C y en agitación suave. Tras 24h, se lavó la membrana tres veces con TBS-T en agitación rápida y durante 10 min con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido. Como control de carga se empleó el GAPDH, a excepción de las muestras sometidas a condiciones de hipoxia (1%O₂) en las que se empleó la β -actina, ya que la expresión proteica del GAPDH se vio modificada bajo estas condiciones. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (**Tabla 11**) diluido en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras la incubación la membrana se volvió a lavar tres veces con TBS-T.

- **Detección de proteínas mediante la técnica de quimioluminiscencia:** las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia, utilizando los reveladores correspondientes que se muestran en la **Tabla 12**, en función de la sensibilidad de la proteína a detectar. Este método de detección se basa en la reacción de oxidación del luminol por la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), conjugada con el anticuerpo 2º, en presencia del peróxido de hidrógeno, dando lugar a un compuesto que emite luz y permite identificar las proteínas marcadas por el anticuerpo. Las bandas de proteínas se visualizaron con un analizador de imágenes luminiscentes Amersham ImageQuant 800 (Roche®, Basilea, Suiza). Tras la adquisición de imágenes, los análisis densitométricos se realizaron utilizando el software Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) y se relativizaron al correspondiente control de carga (GAPDH o β -actina, según corresponda).

- **Método de ‘stripping’:** para poder analizar varias proteínas en la misma membrana se procedió a realizar el método de ‘stripping’. Este método consiste en eliminar los anticuerpos empleados anteriormente de la membrana mediante

MATERIAL Y MÉTODOS

la incubación de ésta con Tampón de lavado de inmunotransferencia (*Western Blot*) Restore™ durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación rápida. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados con TBS-T durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación rápida y, posteriormente, se volvió a bloquear la membrana y se incubó con los anticuerpos primarios y secundarios, según el protocolo descrito anteriormente.

Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para el análisis proteico mediante *Western Blot*.

ANTICUERPO 1º	PM (kDa)	ESPECIE/REACTIVIDAD	DILUCIÓN ANTICUERPO
ANTICUERPOS CONTROL DE CARGA			
GAPDH	34	Ratón / Humano	1:5000 leche 5%
β-actina	42	Conejo / Humano	1:1000 leche 5%
ANTICUERPOS FRENTE A PROTEÍNAS FIBRÓTICAS			
Colágeno tipo I	220	Conejo / Humano	1:1000 SBA 5%
Colágeno tipo III	138		1:5000 leche 5%
α-SMA	43-44		1:1000 leche 5%
Fibronectina	285		1:2000 leche 5%
ANTICUERPO 2º	ESPECIE	REACTIVIDAD	DILUCIÓN ANTICUERPO
Anti-IgG conjugado con HRP	Cabra	Conejo	1:1000 leche o SBA 5% (según anticuerpo 1º)
		Ratón	

PM: peso molecular; **GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; **α-SMA:** alfa actina del músculo liso; **HRP:** peroxidasa de rábano picante; **SBA:** suero bovino de albúmina.

Tabla 12. Reveladores empleados para la detección proteica mediante la técnica de *quimioluminiscencia*. La elección de un revelador u otro depende de la sensibilidad de las proteínas que se van a detectar.

REVELADOR EMPLEADO	PROTEÍNA A DETECTAR
Immobilon® Forte Western HRP Substrate	Colágeno tipo I y tipo III
Immobilon® Crescendo Western HRP Substrate (+ sensibilidad para detectar proteínas de alta abundancia)	GAPDH, fibronectina, α-SMA

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; **α-SMA:** alfa actina del músculo liso; **HRP:** peroxidasa de rábano picante.

2. SANGRE ENTERA DE DONANTES SANOS

2.1. MUESTRA EXPERIMENTAL

Para la realización de estos experimentos se empleó sangre periférica procedente de donantes sanos. La sangre fue recogida en tubos de citrato sódico 0.105 M (anticoagulante) de la vena antecubital del donante. La sangre se obtuvo del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana y todos ellos firmaron los formularios de consentimiento informado* correspondiente antes de participar en el estudio (*apartado: CERTIFICADOS).

Los pacientes que tenían pautados antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o que había recibido dicho tratamiento en un período inferior a 15 días, fueron excluidos del estudio ya que podría interferir con el proceso inflamatorio inducido por el estímulo proinflamatorio, TNF- α .

2.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

La sangre extraída se trató con ambas concentraciones de los fármacos experimentales (**Tabla 8**) junto con el estímulo proinflamatorio, TNF- α (10 ng/mL), y se llevó a incubar durante 4h a 37°C.

2.3. CITOMETRÍA DE FLUJO. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Transcurrido el tiempo de tratamiento, la sangre se incubó durante 30 min, a 4°C y en oscuridad, con los anticuerpos que marcan las moléculas de adhesión leucocitaria anti-CD11b (subunidad α de Mac-1) y anti-CD18 (subunidad β_2 de Mac-1), así como con el isotipo control anti-IgG₁, conjugados con FITC o PE a concentraciones saturantes, como se muestra en la **Tabla 13**. Posteriormente, las muestras se lisaron, lavaron y fijaron con solución de lisis FACS Lysing Solution. Se analizaron 10.000 eventos/muestras y, una vez separadas las poblaciones en función de sus características morfológicas (tamaño y granulosidad) (**Figura 26**), se midió la mediana de la intensidad de fluorescencia

MATERIAL Y MÉTODOS

empleada como marcador para determinar la expresión de las dos subunidades (CD11b y CD18) de la molécula de adhesión Mac-1, expresadas principalmente en neutrófilos y monocitos, mediante el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter®, California, EEUU).

Tabla 13. Moléculas de adhesión leucocitarias medidas en sangre procedente de donantes sanos mediante citometría de flujo.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS (SANGRE ENTERA)	
Integrinas β2	Mac-1 (CD11b-PE/CD18-FITC) Presente en: neutrófilos y monocitos
Isotipo control anti-IgG ₁ , conjugados FITC o PE, según corresponda	

PE: ficoeritrina; FITC: fluoresceína de isotiocianato.

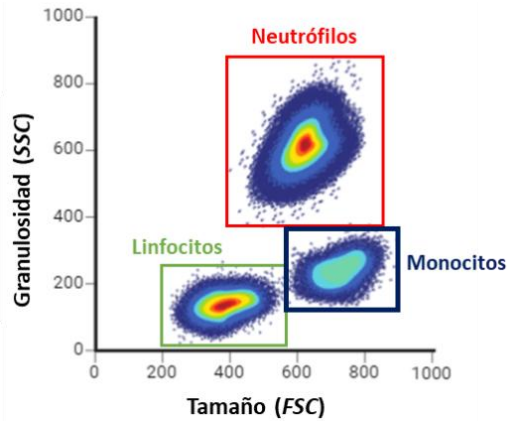


Figura 26. Identificación de las diferentes poblaciones leucocitarias obtenidas en el citómetro de flujo. La figura muestra el histograma de las distintas poblaciones leucocitarias separadas en función del tamaño (FSC) y granulosidad (SSC) celular [neutrófilos, monocitos y linfocitos] tras su análisis mediante el citómetro de flujo CytoFLEX S. Figura creada con Biorender.com.

BLOQUE II: EXPERIMENTOS *IN VIVO*. MODELO MURINO DE FIBROSIS CARDÍACA

1. MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratones macho *wild-type* de la cepa C57BL/6J con edades comprendidas entre 10-12 semanas y con un peso aproximado de 22-30 g (Charles River Laboratories, Barcelona, España). La edad seleccionada para la realización de los experimentos corresponde con la edad adulta del ratón en la que se considera que el corazón está completamente formado. Los animales fueron estabulados en el animalario de la UCIM de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València, bajo condiciones estándar de ventilación, temperatura ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$), luz (12/12h de luz/oscuridad) y humedad. Además, recibieron una alimentación artificial estándar (Teklad Global Rodent 2014 diet) y agua *ad libitum*.

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universitat de València y autorizados por la Consejería de Agricultura, siguiendo la normativa dispuesta en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013 (código de referencia del procedimiento*: 2023-VSC-PEA-0200) (*apartado: CERTIFICADOS).

1.2. ETAPA PREQUIRÚRGICA

Para inducir fibrosis cardíaca en los animales de experimentación se empleó el modelo descrito en el año 1954 por Johns & Olson et al. (247), con ligeras modificaciones, basado en la generación de un IM mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) (248–251). La etapa prequirúrgica se llevó a cabo el mismo día de la cirugía, una vez preparada la mesa de operaciones junto con el instrumental quirúrgico (**Figura 27**), y se compuso de varias fases:

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MARCAJE Y CONTROL DEL PESO CORPORAL DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN: se realizó un control del peso antes de la cirugía y durante todo el procedimiento de cada uno de los animales. Cada uno de los animales vino identificado mediante un código realizado en las orejas.

II. ANALGESIA-ANESTESIA: se administraron 100 μ L por vía intraperitoneal (i.p) con una jeringa de 1 mL y una aguja de 25G, de una solución analgésica y antiinflamatoria compuesta por buprenorfina (0.05 mg/kg) y meloxicam (0.3 mg/kg), diluida en solución salina (NaCl 0.9%). Posteriormente, se indujo la anestesia del animal con isoflurano 5% de la concentración alveolar mínima (CAM) y un flujo constante de oxígeno (0.4 L/min) hasta perder por completo los reflejos. Posteriormente, al animal se mantuvo anestesiado con un flujo constante de isoflurano al 2% CAM.

III. INTUBACIÓN-VENTILACIÓN: se procedió a la intubación orotraqueal colocando al animal en un pedestal en posición supina, en la que los incisivos superiores quedaron sujetos por una goma elástica de tal forma que la boca quedó ligeramente abierta permitiendo la intubación. A continuación, se colocó una luz fría transtraqueal para visualizar la garganta y la glotis, y permitir la introducción de una cánula de 22G, $\varnothing$ 0.9x25 mm, a modo de tubo endotraqueal. A continuación, una vez se comprobó que el tubo endotraqueal quedó en la posición correcta (se comprobó la ventilación bilateral), se proporcionó ventilación artificial con ayuda de un respirador en 'Y' para roedores (MiniVent 845, Harvard Apparatus) que ventiló isoflurano al 2% CAM, junto con oxígeno, con un flujo lento de 0.4 L/min, una velocidad de ventilación de 133 golpes/min y un volumen sistólico de 160 μ L (252). Esta ventilación se mantuvo durante todo el procedimiento quirúrgico y hasta que el animal recuperó la conciencia (**Figura 28-A**).

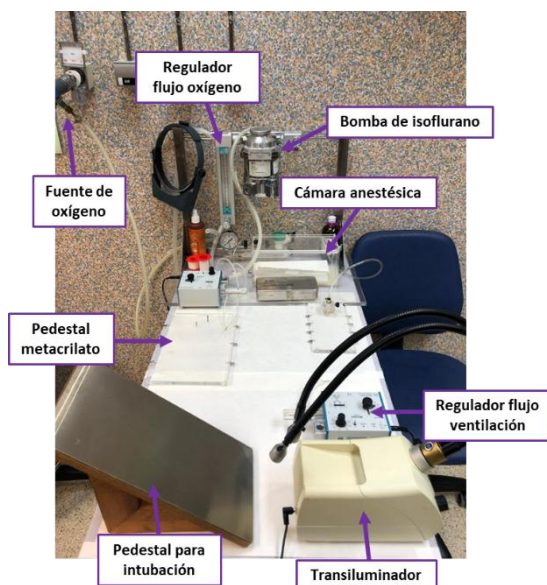


Figura 27. Mesa de operaciones, junto con el instrumental quirúrgico necesario, para llevar a cabo la cirugía en ratones. La mesa de operaciones para realizar la cirugía en los animales de experimentación consta de: una fuente de oxígeno junto con su regulador, una bomba de isoflurano que inyecta el anestésico al animal, una cámara anestésica para anestesiarse a los animales, un pedestal de metacrilato para colocar al animal durante el procedimiento, un pedestal para la intubación, un transiluminador para facilitar la inserción de la cánula de intubación y un regulador del flujo de ventilación.

1.3. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

El procedimiento quirúrgico fue realizado por la Dra. Ana Díaz, veterinaria del servicio del animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València. Para proceder a la cirugía, el animal se inmovilizó en posición decúbito-supino sobre una plataforma de metacrilato, expuesto con una lámpara de luz roja (37°C) y se le aplicó un gel lubricante oftalmológico de administración tópica, para evitar la sequedad ocular provocada por la pérdida de reflejos (**Figura 28-B**). Tras la desinfección de la pared torácica externa, se realizó un corte entre el 4º-5º espacio intercostal izquierdo. Seguidamente, se separó cuidadosamente las capas de piel y músculo, y se insertó una sutura de gliconato absorbibles 5-0 a través de la capa muscular, una a cada lado de la

MATERIAL Y MÉTODOS

incisión, para facilitar el cierre posterior de la cavidad torácica. A continuación, se realizó un corte entre el 3º y 4º espacio intercostal, espacio donde es accesible el ventrículo izquierdo y se realizó una pericardiectomía para proporcionar una mejor exposición del corazón. La arteria coronaria se visualizó por su color rojo intenso que discurre por el medio de la pared cardíaca (desde la parte baja de la aurícula izquierda hasta el ápice del corazón) (**Figura 28-C**). Una vez identificada la arteria coronaria y, a 1-2 mm por debajo del vértice de la aurícula izquierda, con una aguja cónica se pasó una sutura de gliconato absorbible 6-0 por debajo de la arteria. La oclusión de la arteria se realizó realizando dos lazadas alrededor de una cánula de etileno-tetrafluoroetileno (ETFE) (21Gx1", Ø0.85x25 mm) con el objetivo de minimizar daños en la arteria y facilitar la retirada posterior de la ligadura realizada (**Figura 28-D**). La oclusión de la arteria se confirmó por la palidez de la parte anterior del ventrículo izquierdo. Finalmente, se procedió a cerrar la cavidad torácica con la sutura previamente preparada a la cánula durante 45 min ('tiempo de isquemia') (**Figura 28-E**) (**253**). Para ello, los músculos y la piel se cerraron capa por capa (**Figura 28-F**). Durante ese tiempo de isquemia, el ratón permaneció conectado al ventilador artificial hasta que recuperó la conciencia y el patrón de respiración fue normal. En este punto, se pudo proceder a la extubación del animal (**Figura 28-G**). Los ratones operados de forma simulada (a los que asignaremos con el nombre *SHAM*) siguieron el mismo procedimiento quirúrgico con la salvedad de que no se ligó la arteria coronaria.

Pasados los 45 min de restricción de flujo, se procedió a la reperusión del flujo sanguíneo hacia la parte distal del ventrículo izquierdo. Para ello, el ratón se volvió a anestesiarse con un flujo de isoflurano al 2% CAM y, tras comprobar que el ratón perdió completamente los reflejos, se retiró cuidadosamente la cánula para restablecer el flujo sanguíneo. Tras la reperusión, se colocó el animal sobre la mesa de operaciones iluminado con una lámpara de luz roja para mantener su temperatura hasta su completa recuperación (**254**). Cuando el ratón mostró una

frecuencia y profundidad de respiración fisiológica y respondió a los estímulos, se colocó en una jaula de recuperación limpia para evitar infecciones en la herida quirúrgica, bajo una lámpara de luz roja. Al animal se le proporcionó comida húmeda y agua sólida para facilitar su alimentación durante los primeros dos días postcirugía.

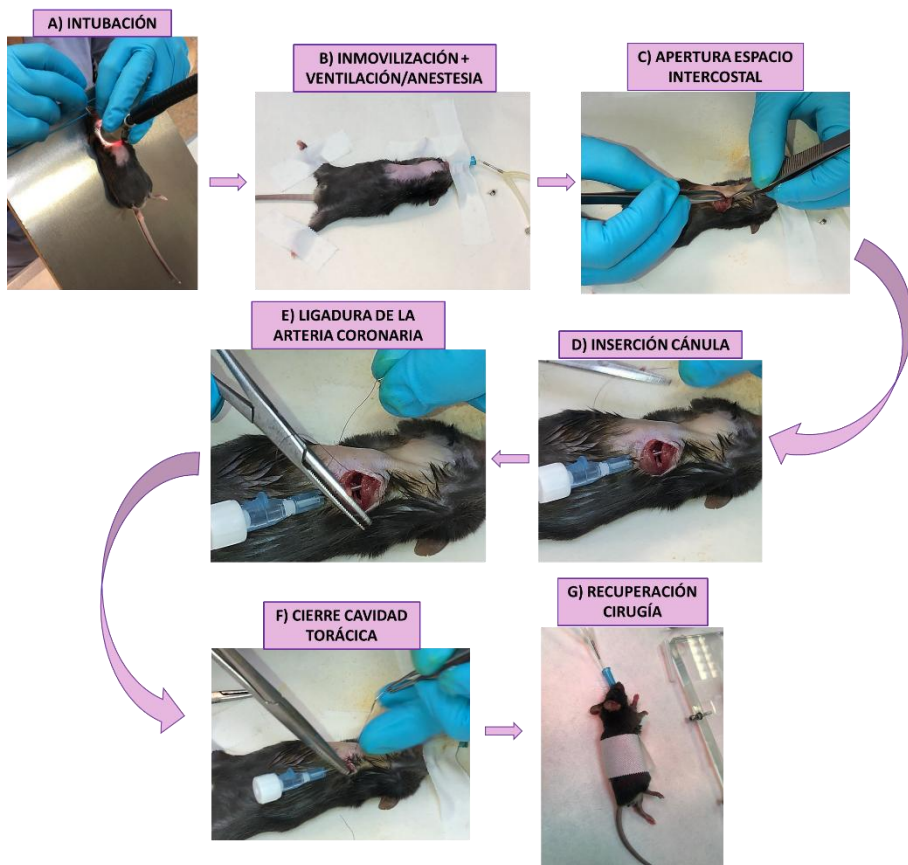


Figura 28. Procedimiento quirúrgico llevado a cabo para inducir infarto de miocardio en ratones (modelo LAD). A) INTUBACIÓN del animal de experimentación; B) INMOVILIZACIÓN del animal y mantenimiento de la VENTILACIÓN y ANESTESIA para iniciar el proceso quirúrgico; C) Apertura de la cavidad torácica y acceso al ESPACIO INTERCOSTAL; D) Una vez localizada la arteria coronaria, se INSERTA UNA CÁNULA para, posteriormente, realizar la lazada; E) Se realiza la LIGADURA DE LA ARTERIA CORONARIA durante 45 min ('tiempo de isquemia'); F) Tras comprobar la oclusión de la arteria, se procede a CERRAR LA CAVIDAD TORÁCICA; G) Al animal se le deja en RECUPERACIÓN hasta que recupere su patrón respiratorio y se recupere por completo de la anestesia. Imágenes tomadas durante el procedimiento quirúrgico con permiso de la Dra. Ana Díaz, veterinaria del servicio del animalario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

2.1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Tras el procedimiento quirúrgico, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales de tratamiento (**Tabla 14**) y fueron tratados durante 14 días, período suficiente para que se genere fibrosis postinfarto en el tejido cardíaco.

Tabla 14. Grupos experimentales de tratamiento en el modelo in vivo.

GRUPO 1	Operación simulada	SHAM	
GRUPO 2	Operación + ligadura de la arteria coronaria descendente (LAD)	Vehículo	agua de bebida, estéril
GRUPO 3		losartán potásico (LOS)	Dosis = 23.4 mg/kg/día
GRUPO 4		nintedanib esilato (NTB)	Dosis = 52.7 mg/kg/día

La tabla muestra los diferentes grupos experimentales, el tratamiento farmacológico recibido y la dosis administrada al ratón (equivalente del humano) durante los 14 días de procedimiento. **SHAM**: ratones sometidos a la operación simulada (no presentan ligadura); **LAD**: ligadura de la arteria coronaria descendente; **LOS**: losartán; **NTB**: nintedanib.

Los fármacos para la realización de este procedimiento experimental fueron adquiridos de la casa comercial MedChemExpress® (Nueva Jersey, EEUU). Ambos medicamentos (NTB y LOS) se suministraron en formato polvo, que fue pesado y disuelto el mismo día de la administración, en función del peso del animal de experimentación. El fármaco LOS se disolvió fácilmente en agua de bebida estéril a temperatura ambiente, quedando una disolución transparente totalmente acuosa; mientras que el fármaco NTB se disolvió también en agua de bebida estéril, pero necesitó de una agitación de 1 min dando lugar a una solución amarilla estable de aspecto oleoso. Las dosis fueron calculadas usando el factor de escalamiento alométrico interespecies normalizado establecido por la FDA (255) para lograr el equivalente a la dosis terapéutica diaria máxima en humanos de NTB (300 mg/día) y LOS (150 mg/día).

La duración total del procedimiento fue de 14 días ininterrumpidos de administración de fármacos y/o vehículo, administrados por vía oral (v.o) con ayuda de una sonda gástrica de 22G. El procedimiento finalizó el día 15 postcirugía con el sacrificio de los animales y la posterior recogida de muestras (Figura 29).



Figura 29. *Protocolo experimental llevado a cabo en el procedimiento in vivo.* El inicio del procedimiento se estableció el día 0 con la cirugía y, tras un periodo de 14 días ininterrumpidos de administración de fármacos y/o vehículo, el día 15 postinfarto se procedió al sacrificio y obtención de muestras (sangre y corazón). Figura creada con BioRender.com

2.2. SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES. ETAPA POSTQUIRÚRGICA

Tras la operación y durante todo el procedimiento de administración de fármacos y/o vehículo, se realizó un seguimiento exhaustivo al animal de experimentación. Durante los dos primeros días postcirugía, es importante controlar el abordaje quirúrgico (toracotomía) con el fin de evitar posibles aperturas de la sutura o infecciones, controlar la temperatura corporal (evitar hipotermia), controlar el patrón respiratorio y autocuidado del animal. Además, se le administró por vía i.p una dosis de buprenorfina+meloxicam para paliar el dolor causado por la propia cirugía. También se hizo un seguimiento del peso antes de cada administración y durante todo el procedimiento, y si era necesario, se administró suero salino (NaCl 0.9%) por vía subcutánea (s.c) para evitar la deshidratación del animal. Además, si era necesario se proporcionó comida húmeda para facilitar y garantizar su alimentación.

2.3. SACRIFICIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Tras finalizar el procedimiento, se anestesiaron los animales en la cámara de inducción con un flujo constante de isoflurano 2% CAM. Una vez se comprobó que el animal había perdido por completo los reflejos, se procedió a la recolección de las muestras: sangre y corazón.

2.3.1. *RECOLECCIÓN DE LA SANGRE*

El animal de experimentación se colocó en posición decúbito-supino y se le abrió la cavidad torácica para acceder a la vena cava. Con ayuda de una jeringa que contenía anticoagulante (EDTA 0.5 M, pH=7.4) y una jeringa de 1 mL y una aguja de 25G de calibre, se extrajo la sangre hasta exanguinación (aproximadamente 1 mL por ratón). Inmediatamente, la sangre extraída se centrifugó a 2.000 rpm durante 15 min a 4°C para la obtención del plasma, que fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

2.3.2. *RECOLECCIÓN DEL CORAZÓN*

Posteriormente, se dislocó al animal y se procedió a abrir la cavidad torácica para la extracción del corazón. Una vez extraído, el corazón se lavó con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar los restos de sangre, se pesó y, se incluyó en parafina para realizar los estudios histológicos, o se almacenó a -80°C para estudios moleculares. De esta forma, dentro de una misma condición experimental, los corazones de un número de animales ($n \geq 5$) se destinaron a estudios histológicos y otro número ($n \geq 5$) a estudios moleculares.

3. ENSAYOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

3.1. MUESTRAS DE SANGRE

3.1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). NIVELES PLASMÁTICOS DE FÁRMACO

La determinación de las concentraciones plasmáticas se realizó en la Sección de Imagen Biomédica y Metabolómica de la UCIM de la Universitat de València en las muestras de plasma de ratones infartados tratados con el fármaco NTB.

El método empleado para la determinación del fármaco fue validado siguiendo las recomendaciones de la guía de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (256). Para las determinaciones, se tomaron 100 μL de plasma de ratón y se empleó un equipo de HPLC de módulos integrados Waters (Waters Corporation, Milford, EEUU) empleándose una columna C18 XBridge (150×4.6 d.i. mm, 5 μm) (Figura 30). La detección espectrofotométrica se efectuó en el UV-vis, generando una recta de calibrado con un rango de concentraciones definido (C: 10-500 ng/mL) (257–260).

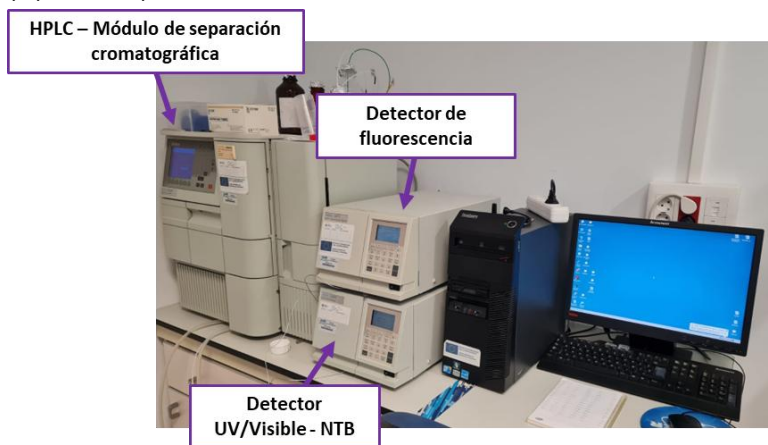


Figura 30. Equipo de HPLC de la Sección de imagen Biomédica y Metabolómica de la UCIM para las determinaciones de las concentraciones plasmáticas del fármaco Nintedanib. El equipo de HPLC empleado para las determinaciones de las concentraciones plasmáticas del fármaco consta de: un módulo de separación cromatográfica y dos detectores, uno de fluorescencia y un detector UV/Visible.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.2. INMUNOENSAYOS ABSORBENTES A ENZIMAS (ELISA).

DETECCIÓN DE BIOMARCADORES CARDÍACOS

Los inmunoensayos (ELISA) fueron utilizados para la detección y cuantificación de proteínas específicas presentes en el plasma obtenido de los diferentes grupos experimentales de ratones tras 14 días de la generación del IM y tratamiento con los fármacos. Consisten en la reacción específica entre un antígeno (proteína que se desea detectar) y un anticuerpo (proteína que se une específicamente al antígeno). En la **Tabla 15**, se muestran los ensayos realizados para la detección de la proteína de interés, de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante:

Tabla 15. Biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco detectados mediante ELISA.

PROTEÍNA	BIOMARCADOR DE:	VOLUMEN MUESTRA	RANGO DETECCIÓN
Troponina I cardíaca	LESIÓN MIOCÁRDICA	100 µL sin diluir	0-500 pg/mL
Péptido BNP	ESTRÉS MIOCÁRDICO	100 µL diluido 1:4	0-1000 pg/mL
GAL-3	REMODELADO VENTRICULAR Y FIBROSIS MIOCÁRDICA	100 µL diluido 1:200	0-2000 pg/mL

BNP: péptido natriurético cerebral; **GAL-3:** galectina-3

3.2. MUESTRAS DE CORAZÓN

3.2.1. CORTES HISTOLÓGICOS

Para realizar los experimentos histológicos, se procedió a cortar el corazón en tres secciones transversales (región basal, región media y región apical) de 1 mm de grosor desde el eje mayor del corazón hasta el ápice (**Figura 31**). Las secciones transversales de 1 mm de grosor se fijaron en una solución de formalina al 10% (Histofix® Preservative) durante 24h. Posteriormente, fueron deshidratadas, embebidas en parafina y, finalmente, cortadas con ayuda de un microtomo generando cortes de 5 µm de grosor de cada una de las tres secciones.

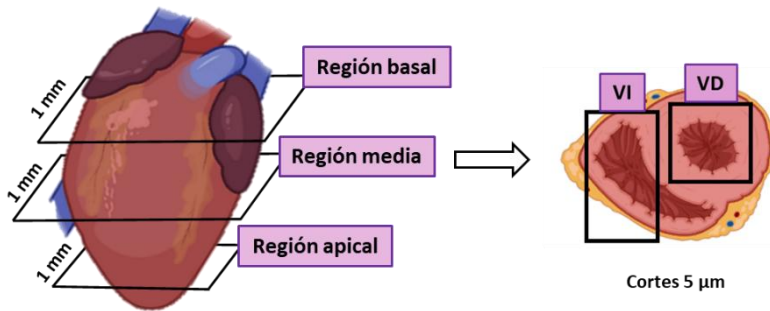


Figura 31. Imagen representativa de los cortes transversales realizados en los corazones murinos. Extraído el corazón, se cortó en 3 secciones transversales (basal, media y apical) de 1 mm de grosor. Tras el parafinado, cada una de las secciones se empleó para realizar cortes seriados de 5 µm de grosor que, posteriormente, fueron empleados para los estudios histológicos. VI: ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho. Figura creada con BioRender.com.

3.2.1.1. Tinciones histológicas

3.2.1.1.1. Tinción eosina-hematoxilina. Determinación de la infiltración leucocitaria

La tinción consiste en el empleo de dos colorantes: **eosina** y **hematoxilina**. La eosina, de naturaleza ácida, tiñe de rosa los componentes básicos presentes en el citoplasma y las proteínas extracelulares, mientras que la hematoxilina, de naturaleza básica, se une a los componentes ácidos como los ácidos nucleicos presentes en el núcleo, tiñéndolos de azul-púrpura, permitiendo una visualización detallada de la morfología celular y tisular.

Los cortes de tejido se incubaron previamente a 60°C durante 30 min. Posteriormente, se sometieron a un proceso de desparafinado y rehidratación, mediante inmersiones sucesivas en xileno (2 x 3 min), seguido de inmersiones de 1 min en grados decrecientes de etanol (100, 95 y 70%) terminando la cadena en agua destilada. Seguidamente, los cortes se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad, con una solución de hematoxilina, previamente filtrada y diluida 1:4 (v/v) en agua destilada. Se realizaron lavados

MATERIAL Y MÉTODOS

con agua destilada (3 x 5 seg) y, seguidamente, se incubaron los cortes durante 30 seg a temperatura ambiente y en oscuridad, en una solución del 0.5% de etanol-HCl. A continuación, se realizaron lavados con agua destilada (2 x 5 seg) y se procedió a la incubación de los cortes en una solución al 1% de hidróxido amónico en agua destilada durante 30 seg a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se volvieron a realizar lavados con agua destilada (2 x 5 seg) y, acto seguido, se procedió a la tinción con una solución acuosa de eosina + 0.5% de ácido acético sumergiendo los cortes durante 30 seg. Se volvieron a realizar lavados con agua destilada (2 x 5 seg) y se procedió a la deshidratación de los cortes realizando inmersiones en grados crecientes de etanol (70, 95 y 100%) de 1 min cada uno, finalizando en inmersiones de xileno (3 x 3 min). Finalmente, el montaje de los cortes se realizó colocando un cubreobjetos empleando un medio de montaje adecuado (DPX® Mountant). Tras 24h de secado, las imágenes fueron adquiridas con un microscopio óptico invertido digital de luz polarizada (Leica DMI8, Leica Microsystems, Barcelona, España) a diferentes aumentos (4x; 10x).

Análisis del grado de infiltración leucocitaria: tras la tinción se tomaron imágenes de los diferentes cortes generados (basal, medio y apical) para cada grupo experimental de ratones. El grado de infiltración leucocitaria se midió estableciendo una escala semicuantitativa (puntuación o *score*) que evaluó el nivel de inflamación según la intensidad y la extensión de la coloración púrpura (=hematoxilina) en las secciones histológicas del tejido cardíaco de cada una de las fotos tomadas. La puntuación asignada se muestra en la **Tabla 16**:

Tabla 16. Clasificación del grado de inflamación en función del área lesionada en el tejido cardíaco.

SCORE	DESCRIPCIÓN DEL DAÑO PRODUCIDO EN EL TEJIDO CARDÍACO
0	Sin inflamación (ausencia de coloración púrpura, no hay infiltración)
1	Inflamación leve (pequeñas áreas púrpuras, <10% del área total)
2	Inflamación moderada (parches púrpuras moderados, entre el 10 y 25% del área total)
3	Inflamación severa (extensas áreas púrpuras, entre el 25 y 50% del área total)
4	Inflamación muy severa (gran parte del tejido cardíaco afectado, >50% del área total)

La tabla muestra la clasificación del grado de inflamación mediante un *score* o puntuación asignada en función de la intensidad y extensión de la infiltración leucocitaria en el tejido cardíaco (261,262).

Tras asignar la puntuación o *score* a cada uno de los tres cortes transversales de cada uno de los ratones de cada grupo experimental, se calculó la media del *score* asignado a los tres cortes y dicho resultado se empleó para la cuantificación y análisis de los resultados [apartado: ANEXOS (Tabla 28)].

3.2.1.1.2. Tinción Sirius Red. Determinación del depósito de colágeno

La tinción “*Sirius Red*” consiste en la reacción de los grupos de ácido sulfónico presentes en la molécula de “*Sirius Red*” que reaccionan con los grupos aminos (como, por ejemplo, los grupos lisina e hidroxilisina) presentes en las moléculas de colágeno del tejido. Esta tinción permite determinar la presencia de colágeno en el tejido a examinar.

Los cortes se incubaron previamente a 60°C durante 30 min. Posteriormente, se sometieron a un proceso de desparafinado y rehidratación, mediante inmersiones en xileno (3 x 3 min), seguido de inmersiones de 3 min en grados decrecientes de etanol (100, 95, 85 y 70%) terminando la cadena en agua destilada. Seguidamente, los cortes se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, con una solución del 0.01% de **Fast Green** en una solución de ácido pícrico al 1.3% en agua destilada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Finalizada la incubación, se realizaron lavados con agua destilada (3 x 5 seg) y se incubaron los cortes durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, en una solución del 0.1% de *Sirius Red* / 0.04% de *Fast Green* en una solución acuosa de ácido pícrico. Seguidamente, se realizaron lavados con agua destilada (2 x 5 seg) y se procedió a la deshidratación de los cortes realizando inmersiones en grados crecientes de etanol (70, 85, 95 y 100%) durante 3 min cada uno, finalizando en xileno (3 x 3 min). Finalmente, el montaje de los cortes se realizó colocando un cubreobjetos empleando un medio de montaje adecuado (DPX® Mountant). Tras 24h de secado, las imágenes fueron adquiridas con un microscopio óptico invertido digital de luz polarizada (Leica DMI8, Leica Microsystems, Barcelona, España) a diferentes aumentos (4x; 10x).

Análisis del grado de fibrosis (263,264): tras la tinción se tomaron imágenes de los diferentes cortes generados (basal, medio y apical) de cada uno de los ratones de cada grupo experimental. Las imágenes adquiridas fueron analizadas con el software informático Image J 1.52n (National Institutes of Health, USA). El tamaño de infarto generado, determinado mediante el depósito de colágeno, se calculó dividiendo la suma de las áreas del infarto (área teñida de rojo) de cada uno de los tres cortes transversales, entre la suma de las áreas del ventrículo izquierdo de todas las secciones (incluidas aquellas sin cicatriz de infarto). El resultado obtenido fue expresado en porcentaje [apartado: ANEXOS (**Tabla 29**)].

3.2.1.2. Inmunohistoquímica. Detección de Ki67 y CD31

La determinación de Ki67 y CD31 se basa en su capacidad para evaluar procesos biológicos clave involucrados en la reparación y el remodelado del tejido tras un infarto, específicamente la proliferación celular y el proceso de angiogénesis. La proteína **Ki67** identifica células proliferativas en el área infartada, tratándose de un marcador útil para evaluar la capacidad regenerativa del tejido y el grado de

activación celular en respuesta al daño. Mientras que **CD31** se trata de una molécula de adhesión celular que detecta la densidad y distribución de los vasos sanguíneos, permitiendo evaluar la angiogénesis en la zona infartada. Además, ayuda a determinar la formación de nuevos vasos como respuesta reparadora para reestablecer el flujo sanguíneo en el área lesionada.

Para llevar a cabo la determinación de Ki67 y CD31 en el tejido cardíaco se procedió a realizar una inmunohistoquímica, que consta de las siguientes fases:

I. DESPARAFINADO: los cortes de tejido cardíaco se incubaron a 60°C durante 30 min para deshacer la parafina.

II. RECUPERACIÓN DE EPÍTOPOS INDUCIDO POR CALOR: para deshacer los enlaces cruzados que enmascaran los antígenos presentes en el tejido, los cortes se introdujeron en el PT Link versión 2.0.1 (Agilent, Dako) que contiene una solución de citrato 1X a pH=6 y 95°C durante 73 min, combinando desparafinado, rehidratación y recuperación de epítomos. Finalizado el proceso, los cortes se lavaron en TBS-T (2 x 5 min).

III. BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA: para evitar tinciones inespecíficas debido a la presencia de las peroxidasas endógenas, los cortes se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en agua destilada durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Acto seguido, los cortes se volvieron a lavar en TBS-T (2 x 5 min).

IV. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON LOS ANTICUERPOS: se procedió a bloquear los sitios de unión inespecíficos incubando los cortes durante 1h a temperatura ambiente y en presencia de humedad con una solución de bloqueo que contiene: 1% de SBA y 5% del suero de la especie en la que se produjo el anticuerpo secundario, en nuestro caso suero de cabra diluido en una solución de PBS pH=7.2 con 0.5% Triton-X. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se incubaron los

MATERIAL Y MÉTODOS

cortes con la solución de anticuerpo primario (Ki67 o CD31) (**Tabla 17**) durante 30 min a temperatura ambiente y en ambiente húmedo. Terminada la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron con TBS-T (2 x 5 min) y, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario diluido 1:200 durante 45 min a temperatura ambiente y en humedad (**Tabla 17**). Luego, se volvieron a realizar dos lavados con TBS-T (2 x 5 min), seguida de lavados con PBS (2 x 5 min).

Tabla 17. *Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de Ki67 y CD31 en el tejido cardíaco mediante la técnica de inmunohistoquímica.*

ANTICUERPO 1º	ESPECIE/REACTIVIDAD	DILUCIÓN EMPLEADA
Ki67	Conejo / Ratón	1:400
CD31	Conejo / Ratón	1:100
ANTICUERPO 2º	ESPECIE/REACTIVIDAD	DILUCIÓN EMPLEADA
Anti-IgG conjugado con HRP	Cabra / Conejo	1:200

HRP: peroxidasa de rábano picante.

V. DETECCIÓN CROMOGENICA (DAB): para la detección de la proteína específica, se empleó el sustrato cromogénico 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Dicho sustrato produce una tinción de color marrón intensa por la acción de la peroxidasa presente en el anticuerpo secundario. La solución DAB se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante y, se adicionó durante 5 min a la muestra de tejido observando la aparición de una coloración marrón. La reacción se detuvo introduciendo los cortes en agua destilada. A continuación, los cortes de tejido se contrastaron con hematoxilina durante 30 seg. Seguidamente, se realizaron lavados con agua destilada (3 x 10 seg) y, de manera secuencial, los cortes se sumergieron en una solución de 0.5% etanol-HCl durante 10 seg y finalizando el lavado en agua destilada durante 3 min.

VI. MONTAJE Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES: los cortes se deshidrataron empleando etanoles de graduación creciente (70, 85, 95 y 100%) y xileno. Finalmente, el montaje de los cortes se realizó colocando un cubreobjetos y empleando un medio de montaje adecuado (DPX® Mountant). Tras 24h de secado, las imágenes fueron adquiridas tras el escaneo digital de alta resolución

de los portaobjetos con el escáner Pannoramic® 250 Flash III DX (3DHISTECH, Budapest, Hungría). Posteriormente, las imágenes escaneadas fueron visualizadas con el programa SlideViewer 2.8® (3DHISTECH, Budapest, Hungría).

Análisis de la proliferación celular (determinación de Ki67): tras el escaneo digital de los portaobjetos, se procedió a la cuantificación de los núcleos positivos para Ki67 mediante el programa informático QuPath™. Este programa permite distinguir los núcleos positivos para Ki67 (núcleos marrones, teñidos por la tinción DAB) del resto de núcleos celulares (núcleos teñidos de púrpura, contrastados con la hematoxilina) presentes en el tejido cardíaco, estableciendo previamente un umbral de intensidad. Tras la detección de los núcleos se procedió a la cuantificación del índice de Ki67, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Ki67} = \frac{n^{\circ} \text{ núcleos positivos (Ki67}^{+})}{\text{Núcleos totales (Ki67}^{+} \text{ y Ki67}^{-})} \times 100$$

El índice de Ki67 se determinó en cada uno de los tres cortes transversales de cada uno de los ratones de los diferentes grupos experimentales y la media obtenida de los tres cortes fue empleada para el análisis de los datos [apartado: ANEXOS (Tabla 30)].

Análisis del proceso de angiogénesis (determinación de vasos CD31 positivos): tras el escaneo digital de los portaobjetos, se procedió a la cuantificación de los vasos CD31 positivos presentes en el tejido cardíaco, mediante el programa informático QuPath™. Este programa permite visualizar el tejido cardíaco completo en alta resolución facilitando la cuantificación manual del número absoluto de vasos positivos para CD31 en todo el tejido cardíaco (típicamente lumen rodeado por células endoteliales positivas, visualizándose de color marrón por la tinción con DAB). Se calculó la media de los valores absolutos obtenidos de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los

MATERIAL Y MÉTODOS

ratones de los diferentes grupos experimentales y, tras el cálculo de la media, el valor obtenido fue empleado para realizar el análisis de los datos [apartado: ANEXOS (**Tabla 31**)].

3.2.2. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL. EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis de la expresión génica se emplearon muestras de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales.

I. EXTRACCIÓN ARN DEL TEJIDO CARDÍACO DE RATÓN: el ARN procedente de los corazones de los ratones se aisló empleando el método del Trizol (TRizol® Reagent). Las muestras de corazón (aproximadamente 10 mg de tejido cardíaco) se homogeneizaron con un disociador Precellys® Evolution (Bertin Technologies, 432-0454) en 800 µL de Trizol y cuatro bolas metálicas de Ø2.4 mm (SI-BS02, Scientific Industries Inc®), realizando dos ciclos de 25 seg a 5.500 rpm con una pausa de 10 seg entre ambos ciclos. El homogenado tisular obtenido se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se mezcló con 160 µL de cloroformo y se incubó durante 15 min a 4°C. Transcurrido el tiempo, las muestras se volvieron a centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C y la fase superior acuosa obtenida (ARN) tras la centrifugación se transfirió a un tubo nuevo. A continuación, se adicionó isopropanol en la proporción 1:1 (v/v) y se llevó a incubar durante 1h a -20°C para provocar la precipitación del ARN. Finalizada la incubación, las muestras se volvieron a centrifugar a 13.000 rpm durante 20 min a 4°C y el precipitado obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en 30 µL de agua libre de ARNasa.

La pureza y concentración del ARN obtenido se determinó de igual forma que en el apartado 1.3.2.1-I.

II. SÍNTESIS DEL ADNc POR TRANSCRIPCIÓN INVERSA: la síntesis del ADNc se realizó siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado 1.3.2.1-II.

III. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR): la qPCR y los datos obtenidos tras su realización se analizaron siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado 1.3.2.1-III. Los pares de cebadores específicos para ratones se diseñaron y se adquirieron en Sigma-Aldrich® y las secuencias se muestran en la **Tabla 18**. En este caso, como gen de referencia únicamente se empleó el *gapdh*.

Tabla 18. Pares de cebadores murinos empleados para el análisis génico mediante qPCR.

GEN	CADENA SENTIDO (5'→3')	CADENA ANTISENTIDO (5'→3')
COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC		
<i>col1a1</i>	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	AAACCTCTCTCGCCTCTTGC
<i>col3a1</i>	CTACACCTGCTCCTGTGCTTC	GATAGCCACCCATTCTCCCA
<i>fn1</i>	CCTGATTGGGAGGAAGAAGAC	TGAAGTGTGGAGGGGAACATC
<i>mmp9</i>	TCGACACTGACAAGAAGTGGG	GGGACACATAGTGGGAGGTG
<i>timp1</i>	GGCATCTGGCATCCTCTTGTG	GTGGTCTCGTTGATTCTGGGG
SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR		
<i>s100a4 (FSP1)</i>	GCACTTCTCTCTCTTGGTCTG	AACCTCATGTCCCTGTTGCTG
<i>cdh2</i> (N-cadherina)	GAAACCCAGGAAAAGTGGCAG	AGTTGATTGGCGGGATGACC
<i>tgf-β₁</i>	GCGGACTACTATGCTAAAGAGG	TCAAAGACAGCCACTCAGG
<i>acta2</i> (α-SMA)	TGACTACTGCCGAGCGTGAG	AGGTGGTTTCGTGGATGCC
MARCADORES PROINFLAMATORIOS		
<i>il-1β</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
<i>il-6</i>	GAGTCCTCAGAGAGATACAGAAAC	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
<i>tnf-α</i>	GATCGGTCCCAAAGGGATG	GGTGGTTTGTGAGTGTGAGGG
CONTROL DE CARGA		
<i>gapdh</i>	GAGAGTGTTCCTCGTCCC	ATGGGCTTCCCGTTGATG

MEC: matriz extracelular; *col1a1*: colágeno tipo I; *col3a1*: colágeno tipo III, *fn1*: fibronectina; *mmp9*: metaloproteínasa 9; *timp1*: inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1; *fsp1*: proteína específica de fibroblastos 1; *cdh2*: cadherina 2 o N-cadherina; *tgf-β₁*: factor de crecimiento transformante beta 1; *acta2 (α-SMA)*: alfa actina del músculo liso; *il-*: interleucina; *tnf-α*: factor de necrosis tumoral alfa; *gapdh*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

4. REACTIVOS

Los diferentes reactivos, fármacos, anticuerpos y kits empleados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral han sido agrupados por tablas y se muestran a continuación:

Tabla 19. Reactivos generales empleados.

REACTIVOS GENERALES	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Polilisina	Innoprot®, PLL
FM-2 + kit suplementos	Innoprot®, P60108-2
Dulbecco's PBS sin Ca ⁺² y Mg ⁺² (DPBS ⁻)	Gibco®, 14190-094
Tripsina/EDTA	Lonza®, CC-5012
PBS pH=7.2	Gibco®, 20012-019
Azida sódica (NaN ₃)	Sigma-Aldrich®, S2002
FACS Lysing Solution	BD Pharmigen™, 349202
SYBR® Premix Ex Taq™	Takara Bio Inc., RR420W
100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	Takara Bio Inc., 3422A
Tablet cOmplete Mini®	Sigma-Aldrich®, 11836153001
Phosphosafe®	Sigma-Aldrich®, 71296-3
Acrilamida/bisacrilamida (37.5:1)	Akralab®, A3626
EZ-Run™ Pre-Stained Recombinant Protein Ladder	ThermoFisher®, BP3603-500
Solución Rojo de Ponceau	Sigma-Aldrich®, P7170
Polvo de suero bovino de albúmina (SBA)	FisherScientific®, 11413164
Leche desnatada en polvo	Hacendado, Mercadona
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich®, H1009
Solución salina (NaCl 0.9%)	B Braun®, 5/469829/0610
Suero de cabra	Gibco®, 16210-064
Histofix® Formalina 10%	PanReac®, 256462.0961
Hematoxilina	Sigma-Aldrich®, GHS332
Eosina	Sigma-Aldrich®, HT110216
Xileno	Sigma-Aldrich®, XX0060-5
DPX® Mountant	Sigma-Aldrich®, 06522
Fast Green FCF	Sigma-Aldrich®, F7258
Ácido pícrico	Sigma-Aldrich®, P6755
Direct Red 80	Sigma-Aldrich®, 365548
Immobilon® Forte Western HRP Substrate (revelador)	EMD Millipore Corporation, WBLUF0500
Immobilon® Crescendo Western HRP Substrate (revelador)	EMD Millipore Corporation, WBLUR0500

Tubos de citrato sódico para extracción de sangre	BD Vacutainer®, 367704
Trizol	ThermoFisher®, 15596018
Cloroformo	Sigma-Aldrich®, 366919
Isopropanol	PanReac®, 131090.1611

Tabla 20. Fármacos y estímulos empleados en el modelo in vitro para el tratamiento de los CFs humanos primarios.

FÁRMACOS Y ESTÍMULOS EMPLEADOS IN VITRO	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Angiotensina II (Ang.II)	Sigma-Aldrich®, A9525
Cilengitide (CIL)	Sigma-Aldrich®, SML1594
Losartán potásico (LOS)	Sigma-Aldrich®, 61188
Nintedanib (NTB)	Sigma-Aldrich®, SML2848
Pirfenidona (PFD)	Sigma-Aldrich®, P2116
Staurosporina	Sigma-Aldrich®, 569396
TGF- β_1 recombinante humano	Sigma-Aldrich®, GF346
TNF- α humano	Sigma-Aldrich®, SRP3177

Tabla 21. Kits y ELISAs empleados.

KITS Y ELISAs EMPLEADOS	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Anexina V – yoduro de propidio (IP) (kit)	Dojindo®, AD10
DAB Enhanced Liquid Substrate System (kit)	Sigma-Aldrich®, D3939
ELISA Galectina-3 (GAL-3) ratón	ThermoFisher®, EMLGALS3
ELISA péptido BNP ratón	ThermoFisher®, EEL089
ELISA Troponina I cardíaca ratón	ThermoFisher®, EEL112
Illustra RNAspin Mini (kit)	Sigma-Aldrich®, GE25-0500-72
MTT viabilidad celular (kit)	Roche®, 11465007001
Pierce™BCA Protein Assay Reagent (kit)	ThermoFisher®, 23227
reactivos PrimeScript™ RT (kit)	Takara Bio Inc., RR037A

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 22. Anticuerpos empleados para la técnica Western Blot.

ANTICUERPOS WESTERN BLOT	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Anticuerpo 1º frente a GAPDH	ThermoFisher®, MA5-15738
Anticuerpo 1º frente a β -actina	Sigma-Aldrich®, A5060
Anticuerpo 1º frente a colágeno tipo I	Cell Signaling Technology®, 91144S
Anticuerpo 1º frente a colágeno tipo III	Abcam®, ab7778
Anticuerpo 1º frente a α -SMA	Abcam®, ab5694
Anticuerpo 1º frente a fibronectina	Abcam®, ab2413
Anticuerpo 2º frente a conejo conjugado con HRP	R&D Systems®, HAF008
Anticuerpo 2º frente a ratón conjugado con HRP	R&D Systems®, HAF007

Tabla 23. Anticuerpos empleados para citometría de flujo.

ANTICUERPOS CITOMETRÍA DE FLUJO	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo Control FITC	BD Pharmigen™, 554679
Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo Control PE	BD Pharmigen™, 550617
Anticuerpo frente a CD18 FITC	BD Pharmigen™, 555923
Anticuerpo frente a CD11b PE	BD Pharmigen™, 555388
Anticuerpo frente a CD54 (ICAM-1) PE	BD Pharmigen™, 555511
Anticuerpo frente a CD106 (VCAM-1) FITC	BD Pharmigen™, 551146

Tabla 24. Fármacos empleados en el modelo in vivo.

FÁRMACOS EMPLEADOS IN VIVO	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Buprecare® Multidosis (hidrocloruro de buprenorfina)	Ecuphar®, 02400204
IsoFlo® (isoflurano 100%, p/p)	Zoetis®, 571329.8
Losartán potásico	MedChemExpress®, HY-17512A
Lubrital® (gel lubricante oftalmológico)	Dechra®
Metacam® (meloxicam)	Boehringer Ingelheim®, 04400015
Nintedanib esilato	MedChemExpress®, HY-11106

Tabla 25. *Anticuerpos empleados para la inmunohistoquímica en el tejido cardíaco.*

ANTICUERPOS	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Anticuerpo frente a CD31	Abcam®, ab28364
Anticuerpo frente a Ki67	Cell Signaling®, D3B5
Anticuerpo frente a IgG1 de conejo conjugado con HRP	ThermoFisher®, 656160

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los análisis estadísticos de todos los resultados fueron realizados con el programa GraphPad Prism 8.0, y las inmunohistoquímicas fueron cuantificadas por el programa QuPath™ y analizadas posteriormente con el programa estadístico mencionado.

Todos los resultados se expresaron como la media aritmética $\pm$ el error estándar de la media (E.E.M), considerándose que había significatividad estadística entre los diferentes grupos experimentales cuando el $p \leq 0.05$. En algunos casos se realizó una normalización de los datos con respecto a su control/vehículo, mientras que en otros se empleó el valor absoluto. El tamaño de la muestra fue variable entre unos experimentos y otros, indicándose el número exacto en el pie de figura correspondiente.

Las muestras procedentes de los animales de experimentación fueron procesadas de acuerdo con los objetivos a desarrollar y a las limitaciones del proceso experimental, intentando cumplir con las '3Rs' (reducción, refinamiento y reemplazo), y siguiendo la normativa correspondiente (265).

El análisis estadístico entre 3 o más grupos, que siguieron una distribución normal se realizó con un análisis de varianza ANOVA paramétrico de una vía, con la posterior corrección de Tukey; los datos que siguieron una distribución no normal se compararon mediante análisis no paramétrico Kruskal-Wallis seguido

MATERIAL Y MÉTODOS

de la corrección Dunn's. El análisis entre 2 grupos se analizó con *t-test de Student* no pareado si siguen una distribución normal o con test de Mann-Whitney para los que siguen una distribución no normal. El análisis realizado entre la hipoxia y su control (normoxia, 21%O₂) fue el test no paramétrico de Wilcoxon. Más específicamente, para los ensayos funcionales de migración, se empleó el análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la corrección Geisser-Greenhouse (medidas repetidas), que permitió medir la misma condición experimental realizando un seguimiento en el tiempo.

Para las correlaciones se realizó el análisis de correlación *Pearson* (distribución normal, paramétrico) o *Spearman* (distribución no normal, no paramétrico), según el correspondiente análisis de normalidad.

Por último, se realizó una curva de supervivencia tipo Kaplan-Meier seguido de la correlación Mantel-Cox para analizar la mortalidad en el modelo *in vivo* de generación de IM.



RESULTADOS

IV. RESULTADOS

BLOQUE I: RESULTADOS EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO*

1. CULTIVO DE CARDIOFIBROBLASTOS HUMANOS PRIMARIOS

1.1. SELECCIÓN DE LOS ESTÍMULOS PROFIBRÓTICOS

1.1.1. ESTUDIOS SOBRE LA TOXICIDAD CELULAR

Los estímulos TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μ M) e hipoxia (1%O₂) no afectaron a la viabilidad de los CFs humanos primarios, a ninguno de los dos tiempos analizados (24 y 48h) (**Figura 32**).

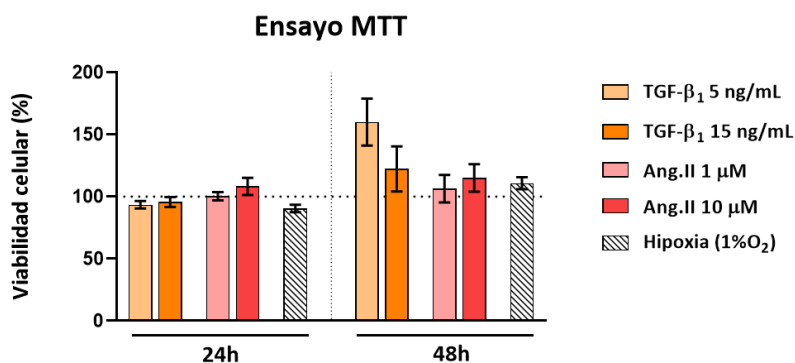


Figura 32. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la viabilidad de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con los estímulos TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μ M) e hipoxia (1%O₂), durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se realizó el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción del MTT. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en porcentaje con respecto al vehículo (100% viabilidad) para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y con respecto a la normoxia (21%O₂, 100% viabilidad) para el tratamiento con hipoxia. Los datos fueron expresados como la media $\pm$ E.E.M (n=3-6) (línea punteada: vehículo/normoxia). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis seguido de la corrección Dunn's para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y el análisis Wilcoxon test para la hipoxia.

RESULTADOS

1.1.2. EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE MARCADORES PROFIBRÓTICOS

1.1.2.1. Efectos sobre la expresión génica

Inicialmente, evaluamos los cambios en la expresión génica de los marcadores profibróticos inducidos por los diversos estímulos seleccionados.

Se demostró que el tratamiento con el estímulo TGF- β_1 fue el único que provocó cambios significativos en los diversos genes analizados. El TGF- β_1 provocó cambios en los genes que conforman la MEC, como el *COL1A1* (**Figura 33-A**) y la *FN1* (**Figura 33-C**), a las dos concentraciones (5 y 15 ng/mL) tras 24 y 48h de tratamiento; mientras que la concentración de 15 ng/mL provocó aumentos significativos en los genes *MMP9* (**Figura 33-D**) y *TIMP1* (**Figura 33-E**) únicamente tras 24h de tratamiento. Asimismo, ambas concentraciones de TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL) provocaron aumentos significativos en la expresión génica de *MMP9* (**Figura 33-D**) tras 48h. Por otro lado, el TGF- β_1 también fue capaz de modular la expresión de genes encargados de la señalización, regulación y contracción celular, provocando aumentos significativos en el gen *ACTA2* (**Figura 34-A**) a ambas concentraciones tras 24h de tratamiento y, reducciones significativas de la expresión del gen *S100A4* (**Figura 34-B**). Estos resultados se mantuvieron en el gen *S100A4* (**Figura 34-B**) tras 48h, sin embargo, el aumento significativo del gen *ACTA2* se mantuvo únicamente con la concentración de 15 ng/mL a este tiempo (**Figura 34-A**). Por lo que respecta al estímulo de Ang.II (1 y 10 μ M), este no afectó a ninguno de los genes evaluados durante los tiempos analizados (24 y 48h), con la salvedad de que la concentración de 10 μ M redujo significativamente la expresión de *MMP9* (**Figura 33-D**), mostrando un efecto contrario al esperado. En el caso de la hipoxia, esta solo afectó significativamente a la expresión del gen *S100A4* (**Figura 34-B**) provocando un aumento a las 24h de tratamiento, perdiéndose la significatividad a las 48h.

COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC

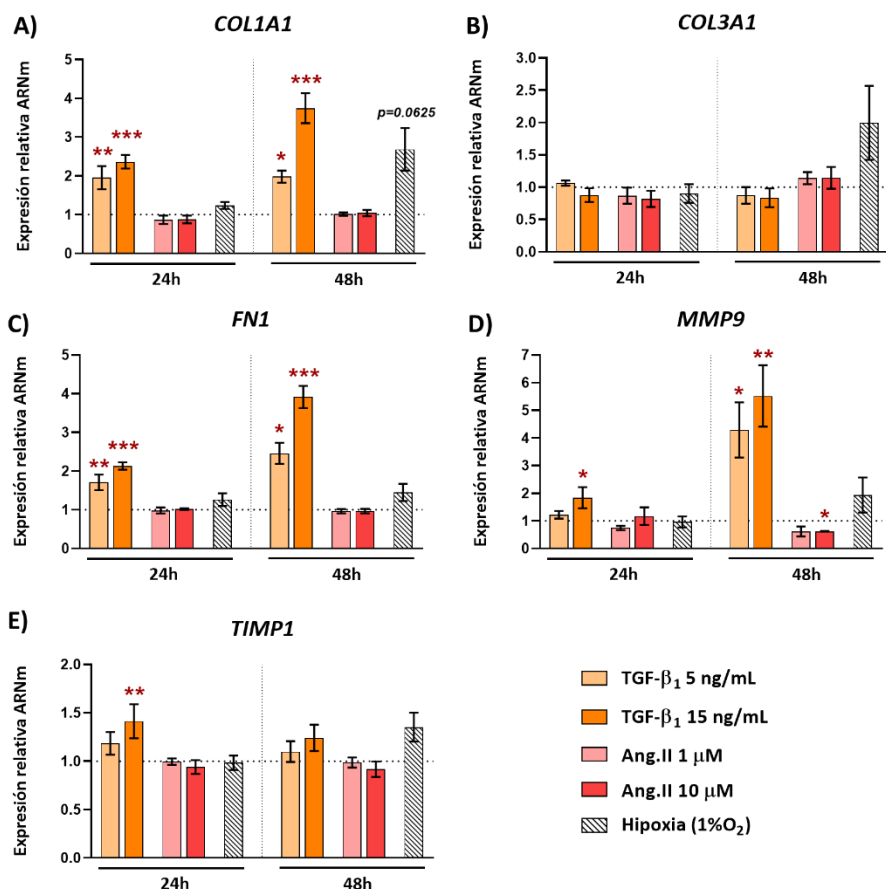


Figura 33. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión génica de marcadores que constituyen y regulan la matriz extracelular en los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con los estímulos profibróticos TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μ M) e hipoxia (1%O₂), durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) COL1A1**, **B) COL3A1**, **C) FN1**, **D) MMP9** y **E) TIMP1**. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y con respecto a la normoxia (21%O₂) para el tratamiento con hipoxia. Los datos de los valores normalizados fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-7) (línea punteada: vehículo/normoxia). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$; *** $p\leq 0.001$ respecto al grupo vehículo o normoxia (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis seguido de la corrección Dunn's para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y el análisis Wilcoxon test para analizar el tratamiento de la hipoxia.

RESULTADOS

SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR

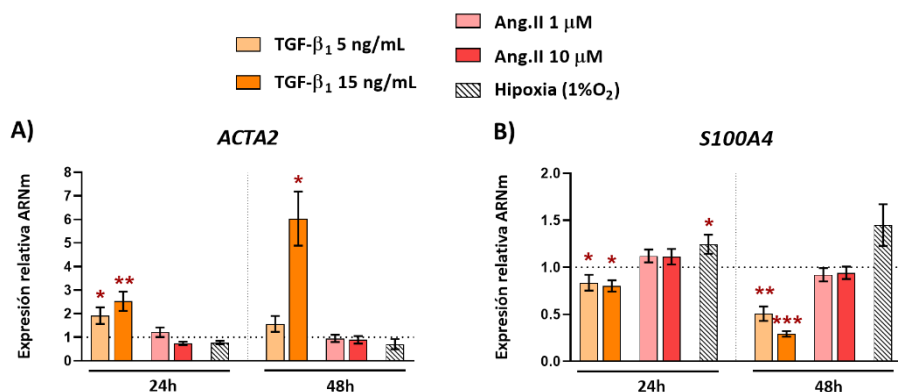


Figura 34. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión génica de marcadores implicados en diversos procesos celulares tras el tratamiento de los CFs humanos primarios.

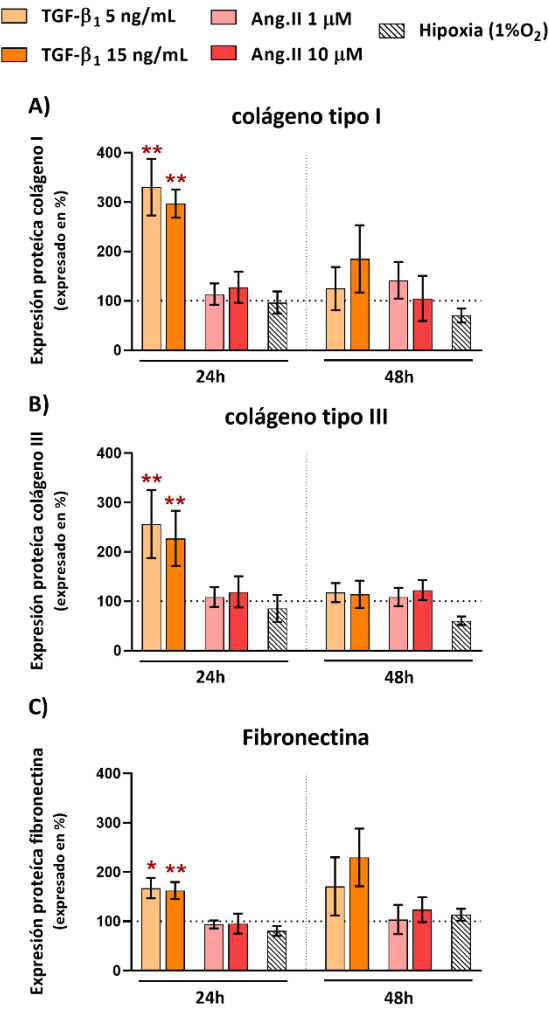
Los CFs fueron tratados con los estímulos profibróticos TGF-β₁ (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μM) e hipoxia (1%O₂), durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) ACTA2** y **B) S100A4**. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo para los tratamientos con TGF-β₁ y Ang.II, y con respecto a la normoxia (21%O₂) para el tratamiento con hipoxia. Los datos de los valores normalizados fueron representados como la media±E.E.M (n=5-7) (línea punteada: vehículo/normoxia). **p*≤0.05; ***p*≤0.01; ****p*≤0.001 respecto al grupo vehículo o normoxia (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis seguido de la corrección Dunn's para los tratamientos con TGF-β₁ y Ang.II y, el análisis Wilcoxon test para analizar el tratamiento de la hipoxia.

1.1.2.2. Efectos sobre la expresión proteica

Tras 24h de tratamiento de los CFs humanos primarios con los estímulos profibróticos, el TGF-β₁ volvió a ser el único estímulo capaz de producir cambios significativos en las proteínas analizadas. Ambas concentraciones de TGF-β₁ provocaron un aumento significativo de las proteínas que conforman la MEC, aumentando la expresión de colágeno tipo I (**Figura 35-A**), colágeno tipo III (**Figura 35-B**) y fibronectina (**Figura 35-C**) tras 24h de tratamiento. Sin embargo, tras 48h de tratamiento no se detectaron cambios significativos y los valores de las proteínas analizadas se normalizaron. Por el contrario, a pesar de que el gen *ACTA2* aumentó significativamente su expresión génica en respuesta a dicho

estímulo (**Figura 34-A**), la expresión proteica no se modificó tras el tratamiento con TGF- β_1 a ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 36-A**). Por el contrario, los estímulos de Ang.II y el tratamiento bajo condiciones de hipoxia, no fueron capaces de modular la expresión de las proteínas que conforman la MEC (**Figura 35**) ni tampoco la de α -SMA (**Figura 36**).

COMPONENTES DE LA MEC



RESULTADOS

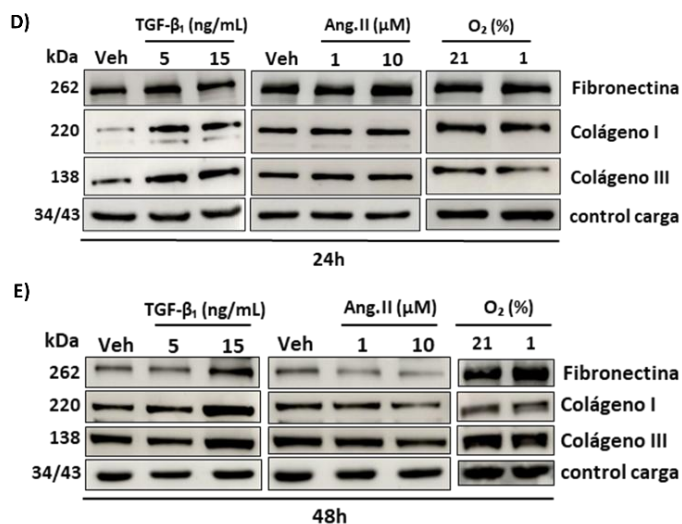


Figura 35. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión de proteínas que conforman la matriz extracelular tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con los estímulos profibróticos: TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μ M) e hipoxia (1%O₂), durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se analizaron mediante *Western Blot* las proteínas de **A)** colágeno tipo I, **B)** colágeno tipo III y **C)** fibronectina. Los resultados obtenidos fueron relativizados al control de carga GAPDH (TGF- β_1 y Ang.II) o β -actina (hipoxia) y expresados en porcentaje con respecto al vehículo (100%) para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y con respecto a la normoxia (100%) para el tratamiento con la hipoxia. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-7) (línea punteada: vehículo/normoxia). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo vehículo o normoxia. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis seguido de la corrección Dunn's para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II y, el análisis Wilcoxon test para analizar el tratamiento de la hipoxia; **D-E)** Membranas representativas de las proteínas analizadas tras 24 y 48h de tratamiento de los CFs con los estímulos profibróticos, mediante quimioluminiscencia.

SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR

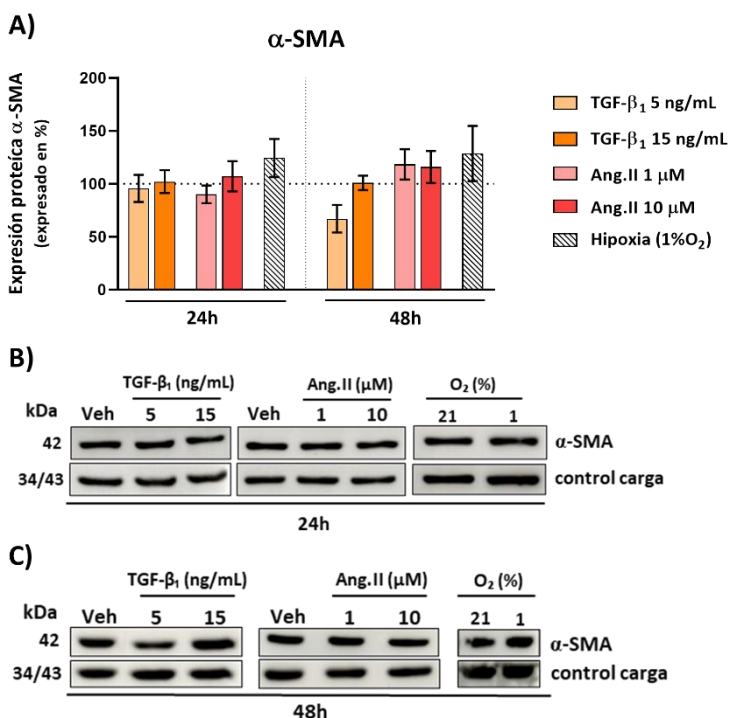


Figura 36. Efecto de los estímulos profibróticos sobre la expresión de la proteína α -SMA tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con los estímulos profibróticos: TGF- β_1 (5 y 15 ng/mL), Ang.II (1 y 10 μ M) e hipoxia (1%O₂), durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se analizó mediante *Western Blot* la proteína **A)** α -SMA. Los resultados obtenidos fueron relativizados al control de carga GAPDH (TGF- β_1 y Ang.II) o β -actina (hipoxia) y expresados en porcentaje con respecto al vehículo (100%) para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y con respecto a la normoxia (100%) para el tratamiento con la hipoxia. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-7) (línea punteada: vehículo/normoxia). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis seguido de la corrección Dunn's para los tratamientos con TGF- β_1 y Ang.II, y el análisis Wilcoxon test para analizar el tratamiento de la hipoxia; **D-E)** Membranas representativas de la proteína α -SMA analizadas tras 24 y 48h de tratamiento de los CFs con los estímulos profibróticos, mediante quimioluminiscencia.

En definitiva, el TGF- β_1 fue el único capaz de producir cambios significativos tanto a nivel de la expresión génica como proteica. Por este motivo fue seleccionado como estímulo profibrótico para inducir daño en el cultivo primario de CFs humanos a la concentración de 5 ng/mL.

RESULTADOS

1.2. EFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIFIBRÓTICOS

1.2.1. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CELULAR DE LOS FÁRMACOS

1.2.1.1. Efecto sobre la viabilidad celular

Se analizó el efecto de los fármacos seleccionados [NTB (0.02 y 2 μ M), LOS (1.5 y 10 μ M), PFD (0.085 y 1 mM) y CIL (0.5 y 1 μ M)] sobre la viabilidad de los CFs humanos primarios. Se demostró que ninguno de los fármacos “*per se*”, a ninguna de las concentraciones seleccionadas (Tabla 8), ni a los dos tiempos de tratamiento analizados (24 y 48h), provocaban cambios significativos en la viabilidad de los CFs humanos primarios (Figura 37).

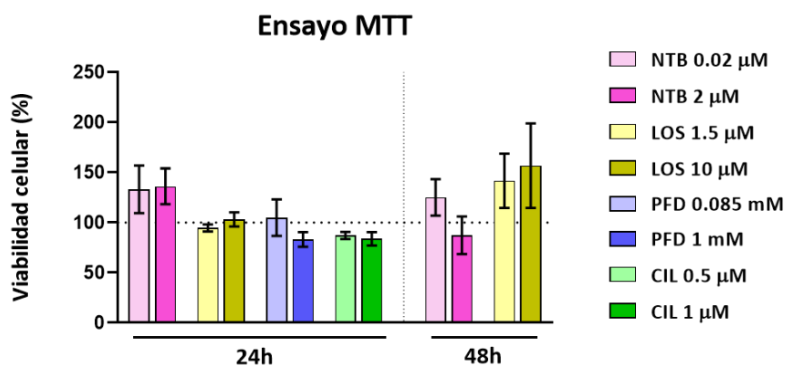


Figura 37. Efecto de los potenciales fármacos antifibróticos sobre la viabilidad de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con las diferentes concentraciones de los fármacos: nintedanib [NTB (0.02 y 2 μ M)], pirfenidona [PFD (0.085 y 1 mM)], cilengitide [CIL (0.5 y 1 μ M)] y losartán [LOS (1.5 y 10 μ M)], durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se realizó el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción del MTT. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en porcentaje con respecto al vehículo (100% viabilidad). Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=3-6) (línea punteada: vehículo). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis seguido de la corrección Dunn's.

1.2.1.2. Efecto sobre el proceso de apoptosis-necrosis

En función de la positividad o no de las células cardíacas respecto a los marcadores de **anexina-V** y **yoduro de propidio**, los CFs se clasificaron en base al estado celular en: células vivas, células apoptóticas (temprana o tardía) y células necróticas. El tratamiento de los CFs con los fármacos NTB (0.02 y 2 μ M) (Figura 38) y LOS (1.5 y 10 μ M) (Figura 39) no afectó a ninguno de los estadios del ciclo celular analizados, presentando un porcentaje de células vivas superior al 80% en ambos casos (Figura 38-A y Figura 39-A).

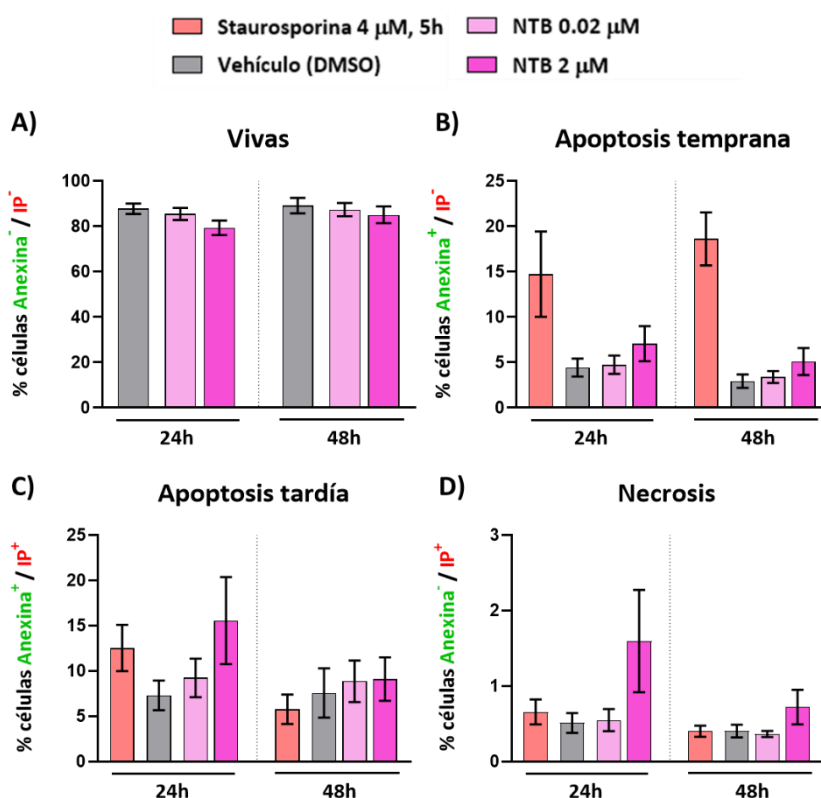


Figura 38. Efecto del fármaco Nintedanib sobre el proceso celular de apoptosis-necrosis en los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con NTB (0.02 y 2 μ M) durante 24 y 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó el ensayo de apoptosis-necrosis incubándose las células durante 15 min con los anticuerpos de **anexina V-FITC** y **yoduro de propidio-PE**, empleándose como control positivo la staurosporina. Tras analizar 10.000 eventos/muestra, los resultados absolutos obtenidos en porcentaje de células **A)** vivas, **B)** apoptosis temprana, **C)** apoptosis tardía y **D)** necrosis, fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=4-5). Se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de la corrección Tukey.

RESULTADOS

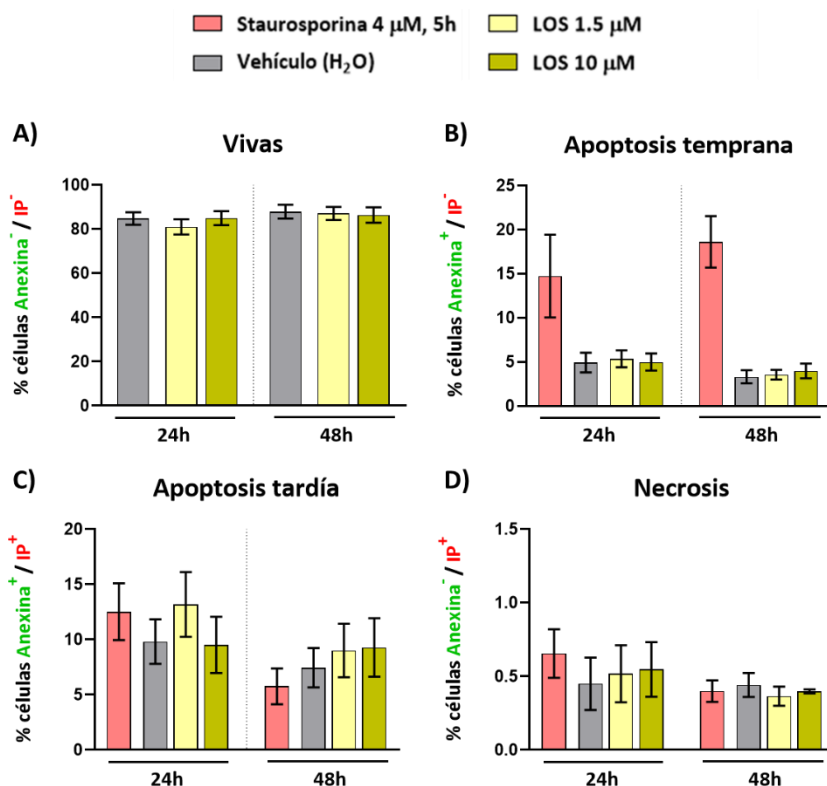


Figura 39. Efecto del fármaco Losartán sobre el proceso celular de apoptosis-necrosis en los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con LOS (1.5 y 10 μM) durante 24 y 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó el ensayo de apoptosis-necrosis incubándose las células durante 15 min con los anticuerpos de **anexina V-FITC** y **yoduro de propidio-PE**, empleándose como control positivo la staurosporina. Tras analizar 10.000 eventos/muestra, los resultados absolutos obtenidos en porcentaje de células **A)** vivas, **B)** apoptosis temprana, **C)** apoptosis tardía y **D)** necrosis, fueron representados como la media±E.E.M (n=4-5). Se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía seguido de la corrección Tukey.

1.2.1.3. Efecto sobre la morfología

El fármaco NTB, tras 24h de tratamiento no provocó cambios en la morfología de las células cardíacas (**Figura 40**). Sin embargo, tras 48h, la concentración de 2 μM provocó cambios significativos tanto en el tamaño (**Figura 40-A**) como en la granulosidad celular (**Figura 40-B**). Sin embargo, el fármaco LOS no modificó la morfología de las células cardíacas a ninguno de los dos tiempos analizados (**Figura 41**).

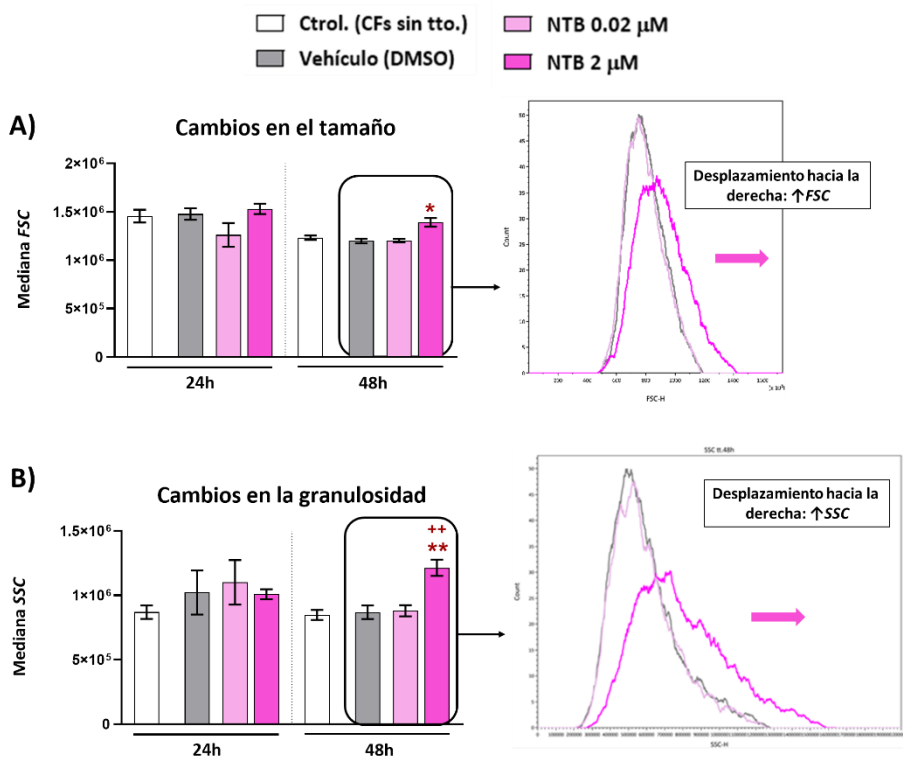


Figura 40. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la morfología de los CFs humanos primarios.

Los CFs fueron tratados con el fármaco NTB (0.02 y 2 μ M) durante 24 y 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los CFs se tripsinizaron, se lavaron y se analizaron 10.000 eventos/muestra, separando la población por tamaño (*FSC*) y granulosidad celular (*SSC*) mediante citometría de flujo. Los resultados absolutos obtenidos fueron expresados como la mediana de *FSC* y *SSC*. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=4-5). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo vehículo; ++ $p\leq 0.01$ respecto al Ctról. (CFs sin tratamiento). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

RESULTADOS

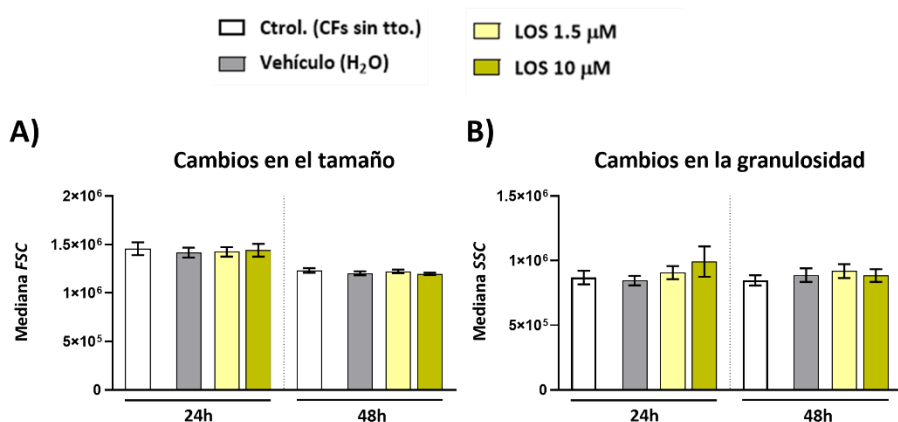


Figura 41. Efecto del fármaco Losartán sobre la morfología de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco LOS (1.5 y 10 μM) durante 24 y 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los CFs se tripsinizaron, se lavaron y se analizaron 10.000 eventos/muestra, separando la población por tamaño (*FSC*) y granulosidad celular (*SSC*) mediante citometría de flujo. Los resultados absolutos obtenidos fueron expresados como la mediana de *FSC* y *SSC*. Los datos fueron representados como la media±E.E.M (n=4-5). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

1.2.2. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES FIBRÓTICOS

Se analizó el efecto “*per se*” de los fármacos (NTB, LOS, PFD y CIL) sobre la expresión génica de determinados marcadores involucrados en el proceso fibrótico (componentes y reguladores de la MEC; señalizadores, reguladores y encargados de la contracción celular; reguladores del crecimiento y proliferación; y proinflamatorios) en los CFs humanos primarios. Adicionalmente, se evaluó el efecto de los fármacos sobre los marcadores fibróticos en dichas células en condiciones estimuladas (presencia de TGF-β₁) durante 24 y 48h.

De las dos concentraciones del fármaco NTB (0.02 y 2 μ M), únicamente la concentración de 2 μ M modificó la expresión génica en los CFs humanos, y dichos resultados se presentan a continuación:

1.2.2.1. Componentes y reguladores de la matriz extracelular

El fármaco NTB “*per se*” fue capaz de reducir la expresión de los genes de ambos colágenos *COL1A1* (**Figura 42-A**) y *COL3A1* (**Figura 42-B**) en los CFs humanos primarios tras 48h de tratamiento. Adicionalmente, el NTB también disminuyó significativamente la expresión del gen *FN1* en dichas células a ambos tiempos analizados (**Figura 42-C**). El resto de los genes reguladores de la MEC, *MMP9* (**Figura 42-D**) y *TIMP1* (**Figura 42-E**) no fueron afectados por el fármaco.

El estímulo profibrótico TGF- β_1 (5 ng/mL) produjo un incremento significativo en la expresión génica del *COL1A1* (**Figura 42-A**) y *FN1* (**Figura 42-C**) a ambos tiempos analizados (24 y 48 h). Por el contrario, no afectó a la expresión del gen de *COL3A1* (**Figura 42-B**), y aumentó de manera muy acusada uno de los genes reguladores de la MEC, el *TIMP1* (**Figura 42-E**).

El fármaco NTB en condiciones estimuladas (presencia de TGF- β_1) consiguió normalizar a niveles basales la expresión génica del *COL1A1* (48h) y de la *FN1* (24 y 48h), incrementada como respuesta al estímulo profibrótico, pero dicha disminución en la expresión génica de ambos genes ya se observó directamente por el efecto “*per se*” del fármaco. Respecto a la expresión génica de *COL3A1*, como el estímulo TGF- β_1 no afectó a su expresión, los niveles se mantuvieron reducidos por la propia acción del fármaco (**Figura 42-B**). El NTB a las 48h de tratamiento fue capaz de revertir significativamente el aumento acusado del gen *MMP9* inducido por el TGF- β_1 (**Figura 42-D**). Además, este efecto fue el único que también mostró el fármaco NTB a concentraciones bajas (0.02 μ M). Respecto al gen regulador *TIMP1* no se observó ningún cambio producido ni por el fármaco “*per se*” ni por el TGF- β_1 (condiciones estimuladas) (**Figura 42-E**).

RESULTADOS

1.2.2.2. Marcadores de señalización, regulación y contracción celular

El fármaco NTB “*per se*” fue capaz de disminuir significativamente la expresión génica de *CDH2* (N-cadherina) (**Figura 43-B**) y del gen *TGF-β₁* (**Figura 43-C**) en los CFs humanos primarios tras 24h de tratamiento. Sin embargo, el NTB incrementó significativamente la expresión génica de *S100A4* (**Figura 43-A**) y *ACTA2* (**Figura 43-D**) en dichas células tras 24h de tratamiento.

El estímulo profibrótico TGF-β₁ (5 ng/ml) ejerció unos efectos contrarios a los producidos por el fármaco NTB, ya que aumentó de forma importante los genes profibróticos *CDH2* (24 y 48h) (**Figura 43-B**) y *TGF-β₁* (24h) (**Figura 43-C**), y redujo la expresión génica de *S100A4* (24 y 48h) (**Figura 43-A**) en los CFs humanos primarios. Adicionalmente, el TGF-β₁ aumentó la expresión génica de *ACTA2* (24h), de manera similar al efecto ejercido por el propio fármaco NTB (**Figura 43-D**).

El NTB en condiciones estimuladas (presencia de TGF-β₁), consiguió amortiguar a las 24h y, revertir significativamente a las 48h de tratamiento, el aumento significativo de la expresión génica de *CDH2* inducida por TGF-β₁ (**Figura 43-B**). Puntualmente, la concentración de 0.02 μM de NTB fue capaz de revertir también el aumento significativo de la expresión génica de *CDH2* inducida por TGF-β₁ (**Figura 43-B**). Sin embargo, no fue así con la expresión del gen *TGF-β₁* que se mantuvo elevado en presencia del fármaco NTB (**Figura 43-C**). La reducción significativa del gen *S100A4* inducida por el estímulo profibrótico (TGF-β₁) fue normalizada por el efecto “*per se*” del fármaco (**Figura 43-A**). En el caso del gen *ACTA2* la combinación del estímulo profibrótico y el fármaco NTB, potenció la expresión del gen de manera muy significativa (**Figura 43-D**).

1.2.2.3. Reguladores del crecimiento y proliferación celular

El fármaco NTB “*per se*” fue capaz de disminuir significativamente la expresión génica de *PDGFRα* (48h) (**Figura 43-E**) y, aumentar de manera significativa la expresión de *PDGFRβ* (**Figura 43-F**) en los CFs humanos primarios (24h), normalizándose, en este caso, los efectos tras 48h de tratamiento.

El estímulo profibrótico TGF- β_1 (5 ng/ml) no consiguió modular la expresión de ninguno de los dos genes, *PDGFRα* y *PDGFRβ*, a ninguno de los dos tiempos analizados (24 y 48h) (**Figura 43-E,F**).

En condiciones estimuladas (presencia de TGF- β_1), el NTB mantuvo bajo los niveles de *PDGFRα*, de manera similar al efecto “*per se*” del fármaco (**Figura 43-E**) tras 24 y 48h de tratamiento. Mientras que el *PDGFRβ* permaneció elevado de manera similar al efecto “*per se*” del fármaco (24h) (**Figura 43-E**), normalizándose transcurridas 48h.

1.2.2.4. Marcadores proinflamatorios

El fármaco NTB “*per se*” no fue capaz de modular la expresión génica ni de *IL-1β* (**Figura 44-A**) ni de *TNF-α* (**Figura 44-C**) a ninguno de los dos tiempos analizados (24 y 48h). Sin embargo, fue capaz de aumentar significativamente la expresión génica de *IL-6* (**Figura 44-B**), únicamente a las 24h de tratamiento, normalizando los valores tras 48h de tratamiento, en el cultivo primario de CFs humanos.

El estímulo profibrótico TGF- β_1 (5 ng/ml) no consiguió modular la expresión del gen *TNF-α* a ninguno de los dos tiempos (24 y 48h) (**Figura 44-C**). Sin embargo, fue capaz de disminuir de manera significativa los genes *IL-1β* (**Figura 44-A**) e *IL-6* (**Figura 44-B**), tras 24 y 48h de tratamiento.

En condiciones estimuladas (presencia de TGF- β_1), el NTB mantuvo bajo los niveles génicos de *IL-1β* (**Figura 44-A**) a ambos tiempos (24 y 48h), de manera

RESULTADOS

similar al efecto producido por el propio estímulo profibrótico. Sin embargo, tras 24h de tratamiento, fue capaz de revertir la disminución significativa de la expresión del gen de *IL-6* inducida por el estímulo TGF- β_1 , y conseguir normalizar los valores transcurridas 48h (**Figura 44-B**). Respecto al *TNF- α* no se observó ningún cambio en la expresión génica a ninguno de los tiempos analizados (**Figura 44-C**).

Los fármacos LOS (1.5 y 10 μ M) (**Figuras 45-47**), PFD (0.085 y 1 mM) (**Figura 48**) y CIL (0.5 y 1 μ M) (**Figura 49**), en general, no produjeron ningún efecto relevante a destacar sobre la expresión génica de los marcadores fibróticos analizados en los CFs humanos primarios. Puntualmente, la PFD (0.085 mM) fue capaz de reducir significativamente la expresión génica de *MMP9* tras 24h de tratamiento (**Figura 48-D**).

COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC

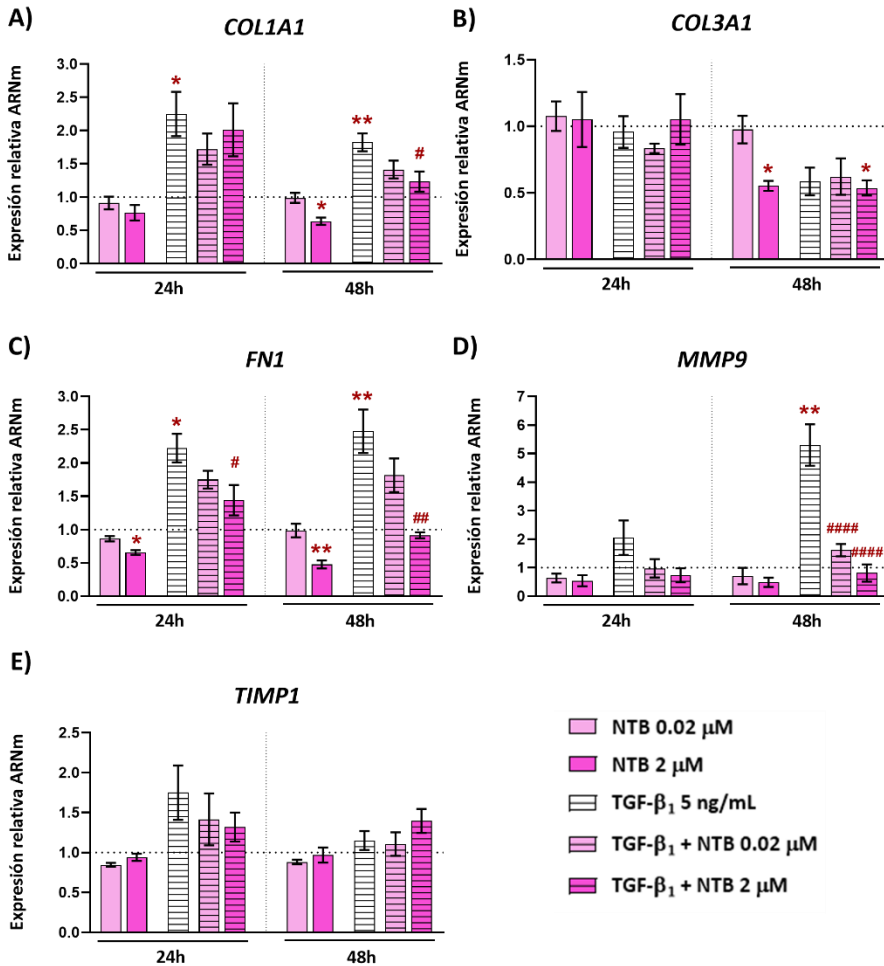


Figura 42. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de componentes y reguladores de la matriz extracelular tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco NTB (0.02 y 2 μM) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes A) COL1A1, B) COL3A1, C) FN1, D) MMP9 y E) TIMP1. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media±E.E.M (n=5-6). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada); # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; #### $p \leq 0.0001$ respecto al TGF-β₁. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

RESULTADOS

SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR

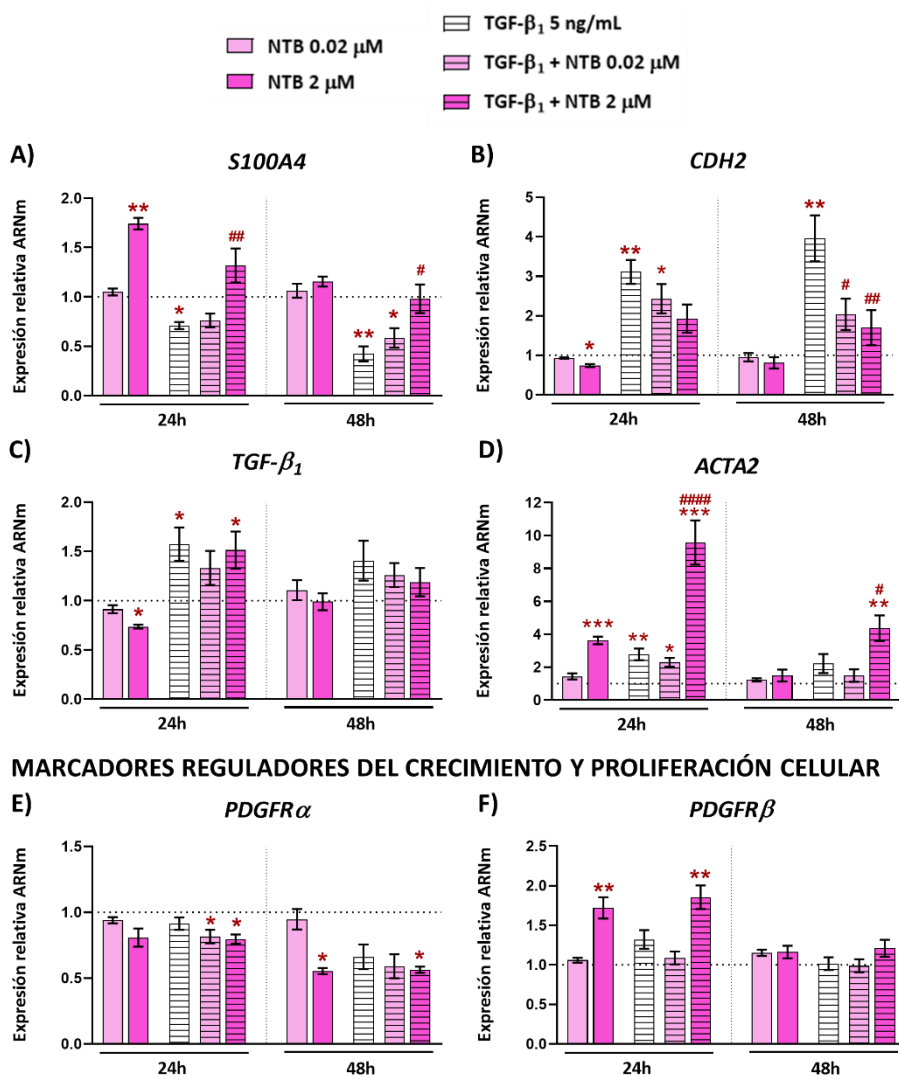


Figura 43. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de marcadores involucrados en diversos procesos celulares tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco NTB (0.02 y 2 μM) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) S100A4**, **B) CDH2**, **C) TGF-β₁**, **D) ACTA2**, **E) PDGFRα** y **F) PDGFRβ**. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media±E.E.M (n=5-6). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 respecto al grupo vehículo (línea punteada); #p<0.05; ##p<0.01; ####p<0.0001 respecto al TGF-β₁. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

MARCADORES PROINFLAMATORIOS

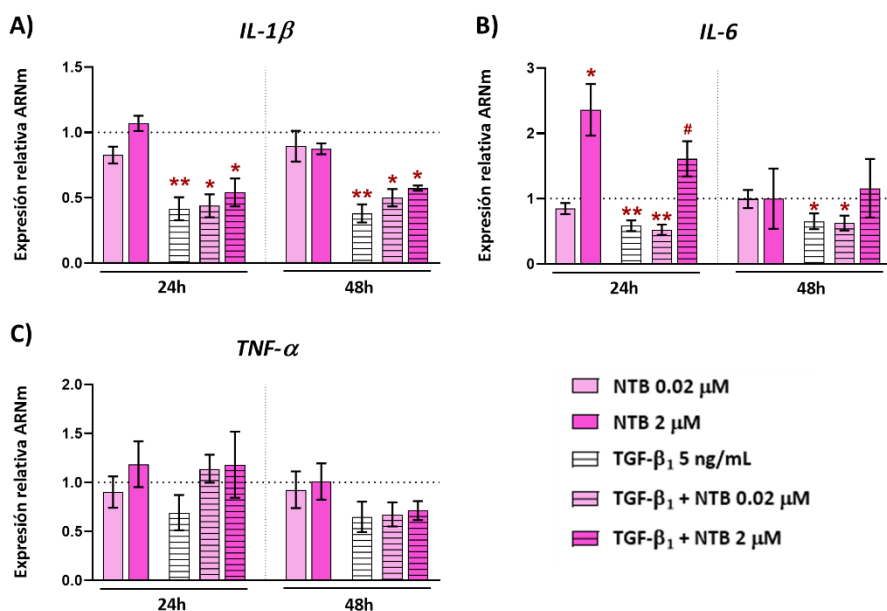


Figura 44. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco NTB (0.02 y 2 μ M) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) IL-1 β** , **B) IL-6** y **C) TNF- α** . Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-6). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada); # $p\leq 0.05$ respecto al TGF- β_1 . Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

RESULTADOS

COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC

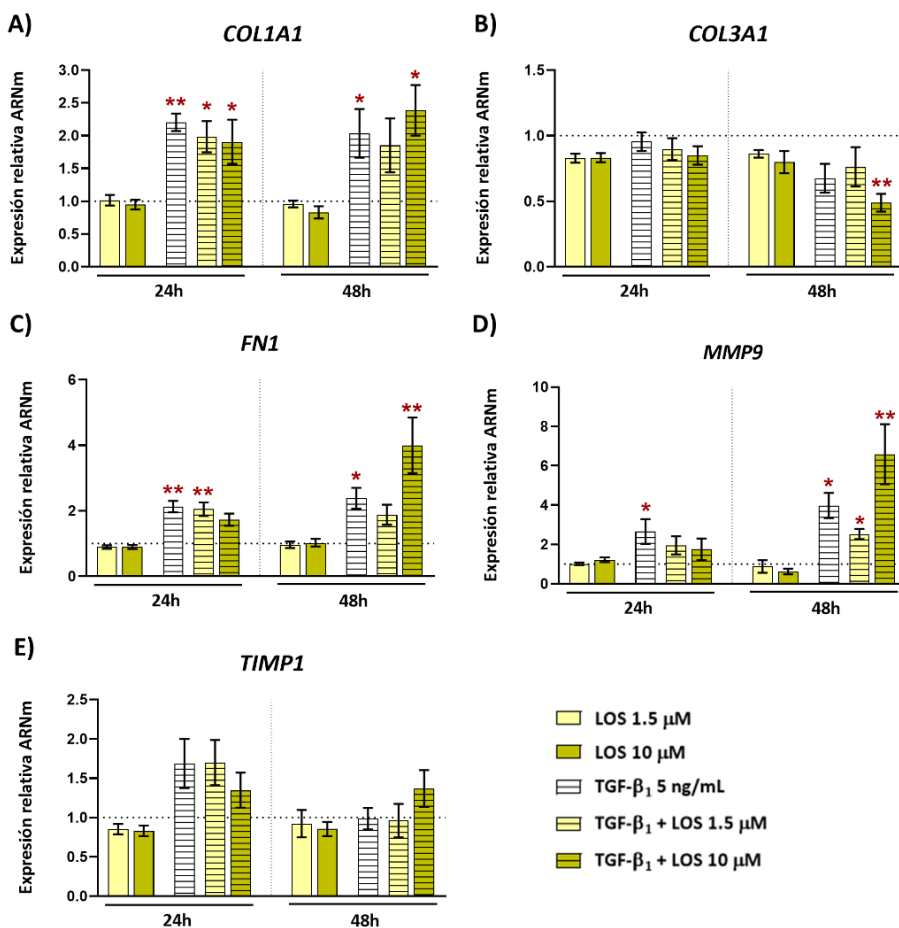


Figura 45. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión génica de componentes y reguladores de la matriz extracelular tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco LOS (1.5 y 10 μM) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) COL1A1**, **B) COL3A1**, **C) FN1**, **D) MMP9** y **E) TIMP1**. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media ± E.E.M. (n=5-6). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR

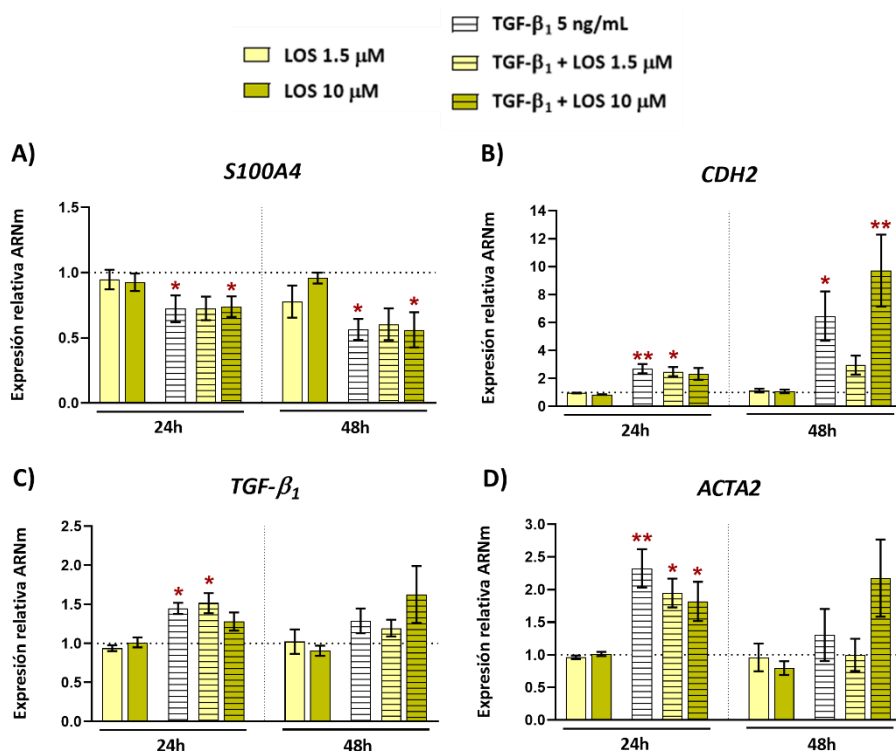


Figura 46. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión génica de marcadores involucrados en diversos procesos celulares tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco LOS (1.5 y 10 μM) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) S100A4**, **B) CDH2**, **C) TGF- β_1** y **D) ACTA2**. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-6). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

RESULTADOS

MARCADORES PROINFLAMATORIOS

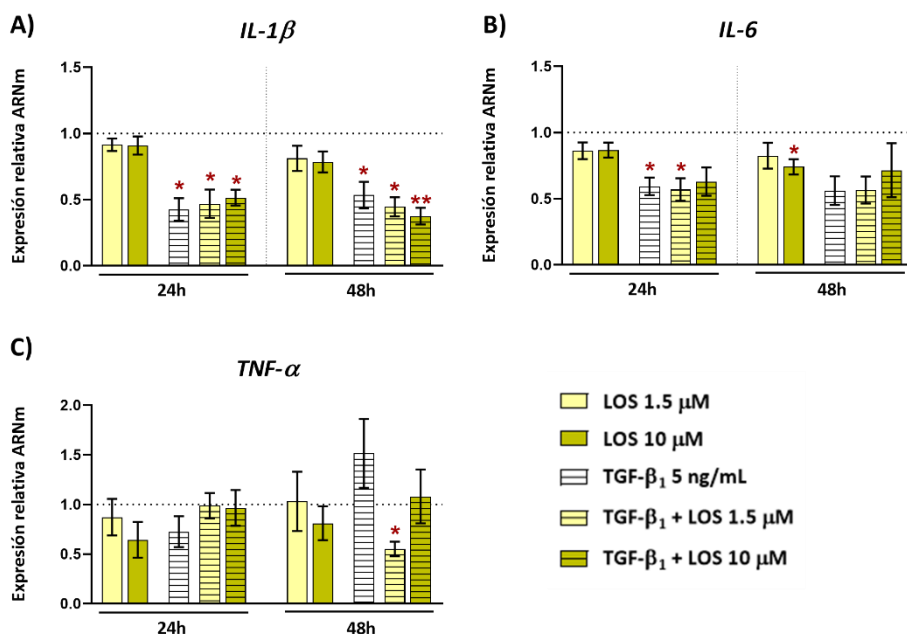
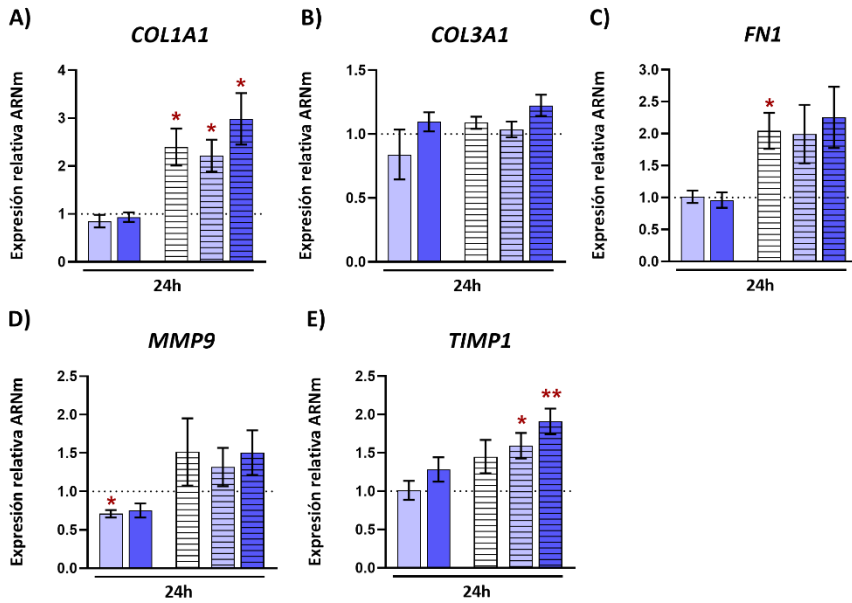
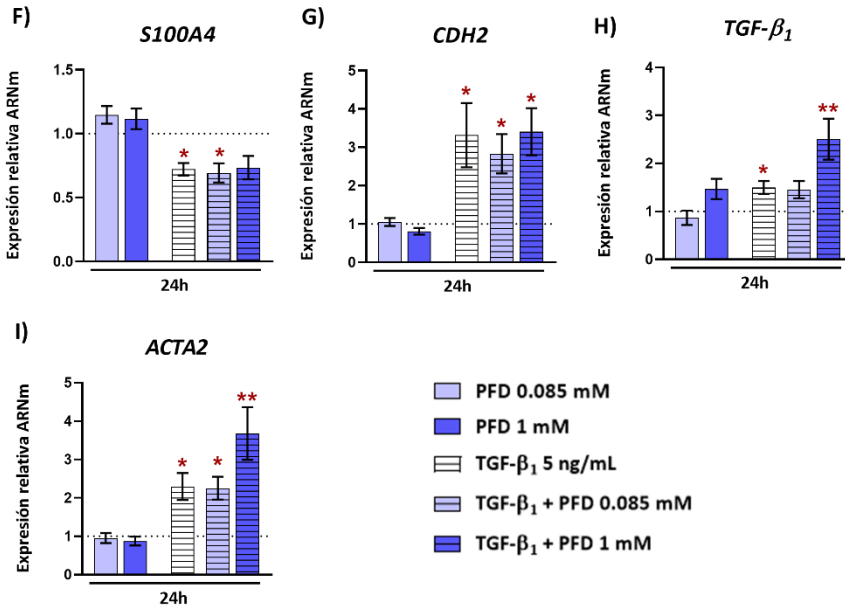


Figura 47. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco LOS (1.5 y 10 μ M) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A)** *IL-1 β* , **B)** *IL-6* y **C)** *TNF- α* . Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-6). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC



REGULACIÓN, SEÑALIZACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR



RESULTADOS

MARCADORES PROINFLAMATORIOS

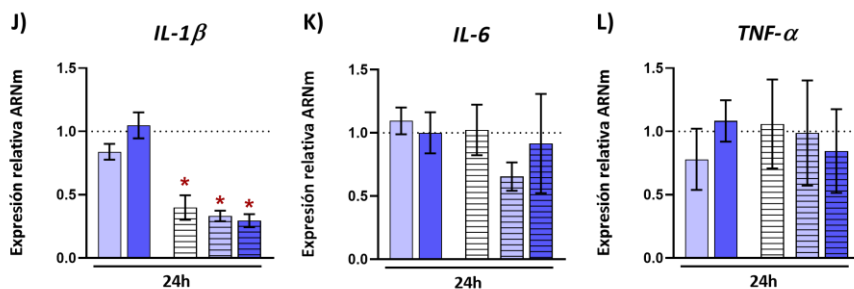
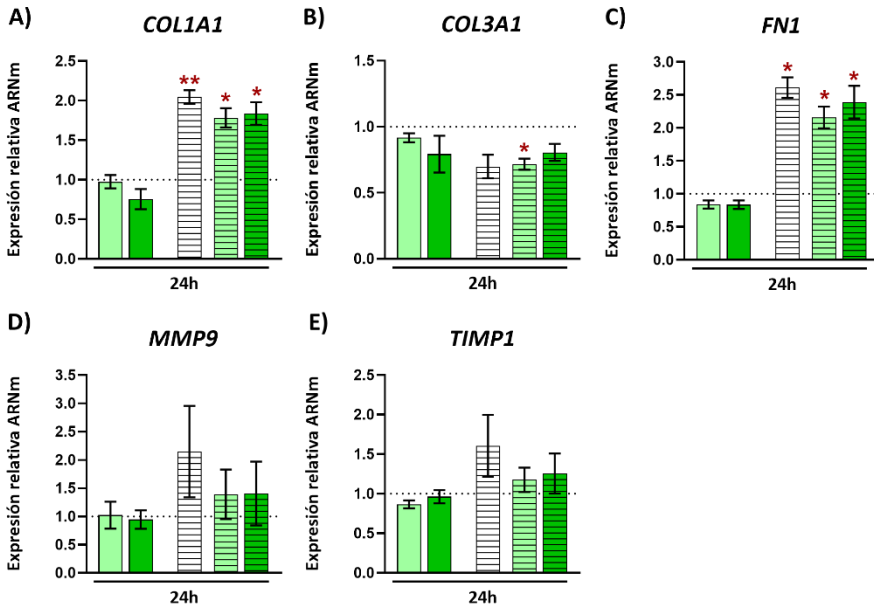
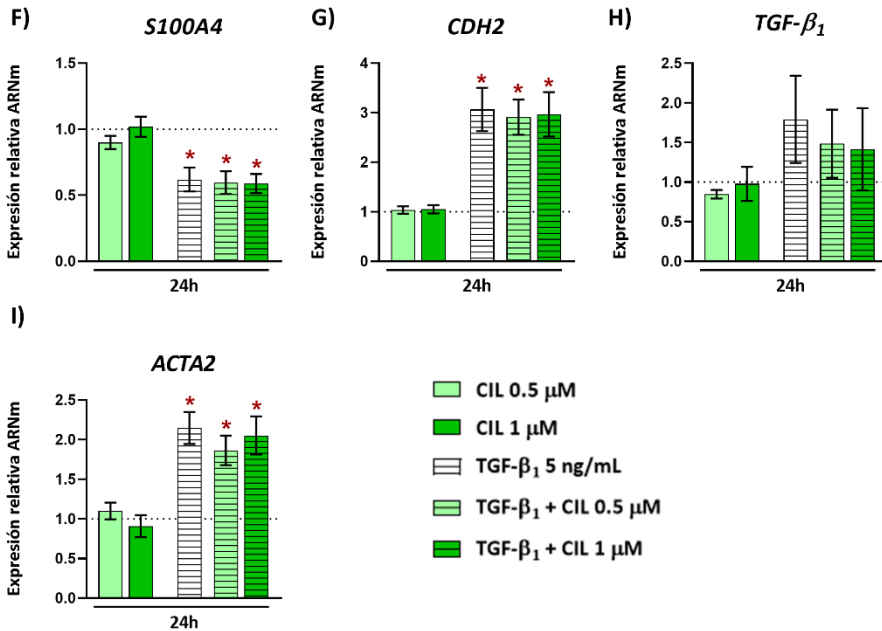


Figura 48. Efecto del fármaco Pirfenidona sobre la expresión génica de diversos marcadores involucrados en el proceso fibrótico tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco PFD (0.085 y 1 mM) únicamente durante 24h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) COL1A1**, **B) COL3A1**, **C) FN1**, **D) MMP9**, **E) TIMP1**, **F) S100A4**, **G) CDH2**, **H) TGF- β_1** , **I) ACTA2**, **J) IL-1 β** , **K) IL-6** y **L) TNF- α** . Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC



REGULACIÓN, SEÑALIZACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR



RESULTADOS

MARCADORES PROINFLAMATORIOS

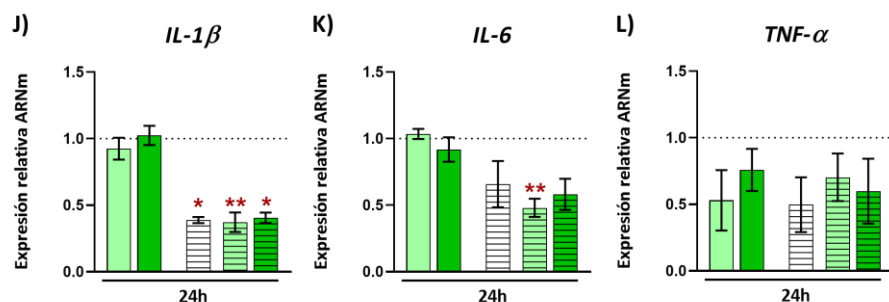


Figura 49. Efecto del fármaco Cilengitide sobre la expresión génica de diversos marcadores involucrados en el proceso fibrótico tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco CIL (0.5 y 1 μ M) únicamente durante 24h. Tras el tratamiento, se procedió al análisis mediante qPCR de los genes **A) COL1A1**, **B) COL3A1**, **C) FN1**, **D) MMP9**, **E) TIMP1**, **F) S100A4**, **G) CDH2**, **H) TGF- β_1** , **I) ACTA2**, **J) IL-1 β** , **K) IL-6** y **L) TNF- α** . Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa con respecto al vehículo. Los datos obtenidos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

Analizada la expresión génica de los distintos marcadores involucrados en el proceso fibrótico, el fármaco NTB (2 μ M) fue el único capaz de mostrar un efecto significativo en la modulación de la expresión génica. A continuación, y a modo aclaratorio, se muestra una tabla resumen con los resultados obtenidos tras el tratamiento de los CFs humanos primarios con el fármaco NTB (**Tabla 26**).

Tabla 26. Tabla resumen del efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión génica de marcadores profibróticos en los CFs humanos primarios.

EXPRESIÓN GENICA MARCADORES PROFIBRÓTICOS TRAS EL TRATAMIENTO CON NTB				
GENES		TGF- β_1 5 ng/mL	NTB 2 μ M	TGF- β_1 + NTB 2 μ M
		24h / 48h tto.	24h / 48h tto.	24h / 48h tto.
COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC	<i>COL1A1</i>	$\uparrow^* / \uparrow^{**}$	$= / \downarrow^*$	$= / \downarrow^\#$
	<i>COL3A1</i>	$= / \downarrow$	$= / \downarrow^*$	$= / =$
	<i>FN</i>	$\uparrow^* / \uparrow^{**}$	$\downarrow^* / \downarrow^{**}$	$\downarrow^\# / \downarrow^{###}$
	<i>MMP9</i>	$\uparrow / \uparrow^{**}$	$= / =$	$= / \downarrow^{####}$ (la dosis de 0.02 μ M $\downarrow^{####}$)
	<i>TIMP1</i>	$= / =$	$= / =$	$= / =$
SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR	<i>S100A4</i>	$\downarrow^* / \downarrow^{**}$	$\uparrow^{**} / =$	$\uparrow^{###} / \uparrow^\#$
	<i>CDH2</i>	$\uparrow^{**} / \uparrow^{**}$	$\downarrow^* / =$	$= / \downarrow^{##}$ (la dosis de 0.02 μ M $\downarrow^\#$)
	<i>TGF-β_1</i>	$\uparrow^* / \uparrow$	$\downarrow^* / =$	$= / =$
	<i>ACTA2</i>	$\uparrow^{**} / \uparrow$	$\uparrow^{***} / =$	$\uparrow^{####} / \uparrow^\#$
REGULA. CRECI. Y PROLIF.	<i>PDGFRα</i>	$= / \downarrow$	$= / \downarrow^*$	$= / =$
	<i>PDGFRβ</i>	$= / =$	$\uparrow^{**} / =$	$\uparrow / =$
INFLAM.	<i>IL-1β</i>	$\downarrow^{**} / \downarrow^{**}$	$= / =$	$= / =$
	<i>IL-6</i>	$\downarrow^{**} / \downarrow^*$	$\uparrow^* / =$	$\uparrow^\# / =$
	<i>TNF-α</i>	$= / =$	$= / =$	$= / =$

MEC: matriz extracelular; $\uparrow$: aumento de la expresión; $\downarrow$: disminución de la expresión; $=$: sin aumento en la expresión; $^*p\leq 0.05$; $^{**}p\leq 0.01$; $^{***}p\leq 0.001$ respecto al vehículo; $^\#p\leq 0.05$; $^{##}p\leq 0.01$; $^{####}p\leq 0.0001$ respecto al TGF- β_1 ; **NTB:** nintedanib; *col1a1*: colágeno de tipo I; *col3a1*: colágeno tipo III, *fn1*: fibronectina; *mmp9*: metaloproteínasa 9; *timp1*: inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1; *fsp1*: proteína específica de fibroblastos 1; *cdh2*: cadherina 2 o N-cadherina; *tgf- β_1* : factor de crecimiento transformante beta 1; *acta2* (α -SMA): alfa actina del músculo liso; *il-*: interleucina; *tnf- α* : factor de necrosis tumoral alfa; *gapdh*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

RESULTADOS

1.2.3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL PROCESO FIBRÓTICO

Se analizó la expresión de ciertas proteínas que conforman la MEC, como son el colágeno tipo I y tipo III, la fibronectina y α -SMA. El fármaco NTB (0.02 y 2 μ M) “*per se*” no fue capaz de reducir la expresión de ninguna de las proteínas analizadas a ninguno de los dos tiempos analizados (24 y 48h). Sin embargo, la concentración de 2 μ M fue capaz de revertir la expresión proteica de colágeno tipo I (**Figura 50-A**) y fibronectina (**Figura 50-C**) inducido por TGF- β_1 tras 24h y 48h de tratamiento, respectivamente.

En el caso de la proteína α -SMA, el fármaco NTB (2 μ M) fue capaz de revertir el efecto del TGF- β_1 sobre la expresión de esta proteína, únicamente a las 48h de tratamiento.

Por el contrario, el resto de los fármacos (LOS, PFD y CIL) no fueron capaces de provocar cambios en la expresión de ninguna de las proteínas (datos no mostrados).

En resumen, el fármaco NTB fue capaz de modular la expresión de determinadas proteínas involucradas en el proceso fibrótico.

COMPONENTES DE LA MEC

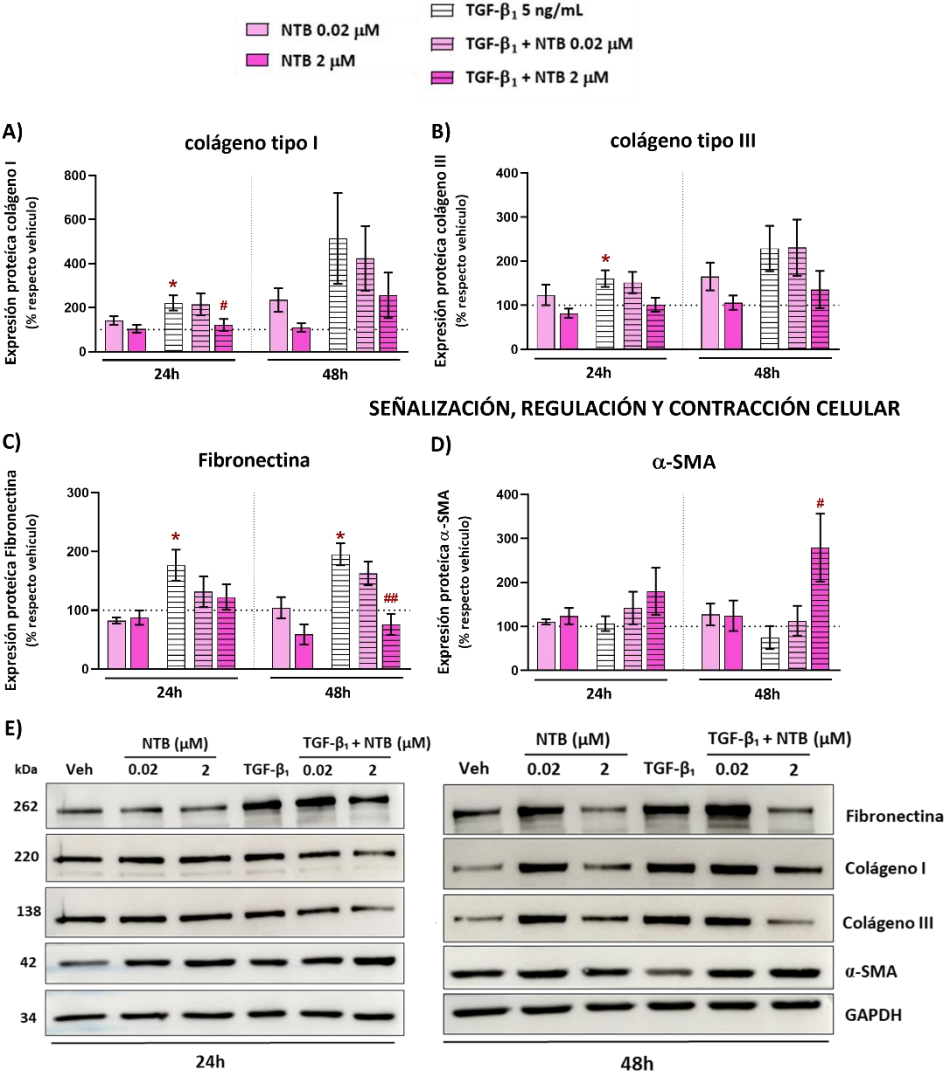


Figura 50. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión de diversas proteínas implicadas en el proceso fibrótico tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs fueron tratados con el fármaco NTB (0.02 y 2 μ M) durante 24 y 48h. Tras el tratamiento, se analizaron mediante *Western Blot* las proteínas de **A)** colágeno tipo I, **B)** colágeno tipo III, **C)** fibronectina y **D)** α -SMA. Los resultados obtenidos fueron relativizados al control de carga (GAPDH) y expresados en porcentaje con respecto al vehículo (100%, línea punteada). Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5). * $p\leq 0.05$ respecto al vehículo; # $p\leq 0.05$; ## $p\leq 0.01$ respecto al TGF- β_1 . Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico); **E)** Membranas representativas de las proteínas analizadas tras 24 y 48h de tratamiento de los CFs con el fármaco NTB, detectadas mediante quimioluminiscencia.

RESULTADOS

1.2.3.1. Análisis de la expresión de las moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1

El fármaco NTB (2 μ M) “*per se*” provocó un aumento en la expresión tanto de la molécula ICAM-1 (CD54) (**Figura 51-A**) como de VCAM-1 (CD106) (**Figura 51-B**), en los CFs humanos tras 24h de tratamiento, siendo similar al efecto producido por el estímulo positivo de inflamación (TNF- α). El NTB (2 μ M) fue capaz de potenciar significativamente el aumento inducido por el estímulo proinflamatorio de ambas moléculas (**Figura 51**). Sin embargo, el fármaco LOS no fue capaz de producir efectos “*per se*” ni de potenciar la expresión de dichas moléculas (datos no mostrados).

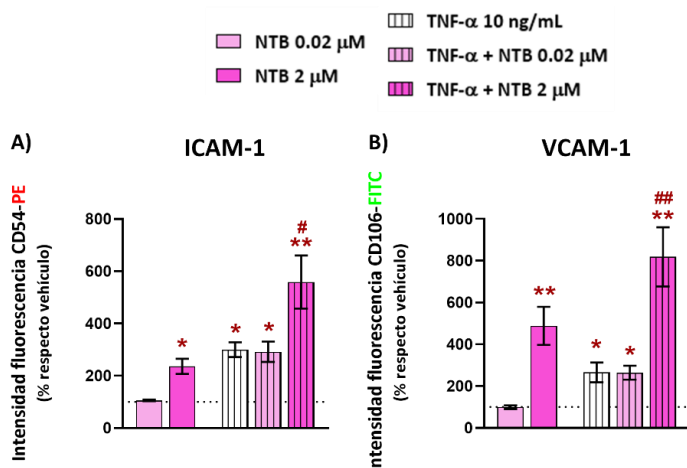


Figura 51. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 tras el tratamiento de los CFs humanos primarios. Los CFs se trataron durante 24h con el fármaco NTB (0.02 y 2 μ M), y 4h antes de que finalizara el tratamiento se adicionó el estímulo proinflamatorio, TNF- α (10 ng/mL). Transcurrido el tiempo de tratamiento, los CFs se recogieron, se lavaron y se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad con los anticuerpos **A)** ICAM-1 [CD54-PE] y **B)** VCAM-1 [CD106-FITC]. Finalizado el tratamiento se analizaron 10.000 eventos/muestra mediante el citómetro de flujo. Los resultados obtenidos fueron normalizados y expresados en porcentaje como intensidad de fluorescencia con respecto al vehículo (línea punteada). Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=4). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al vehículo (línea punteada); # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ respecto al TNF- α . Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

1.2.4. EFECTO DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

Se realizaron estudios funcionales de los efectos “*per se*” de los fármacos NTB (0.02 y 2 μ M), LOS (1.5 y 10 μ M), PFD (0.085 y 1 mM) y CIL (0.5 y 1 μ M) sobre la migración de los CFs humanos primarios.

Como se observa en las **Figuras 52-55**, en estos ensayos de migración, en los CFs control (tratados con vehículo), el área de apertura de la herida generada se va cerrando progresivamente a lo largo del tiempo (0, 8, 24 y 48h) debido a la propia migración de los CFs humanos primarios. Así, a las 8h de tratamiento se ha cerrado aproximadamente un 40% de la herida, observándose el cierre prácticamente completo a las 24h.

El tratamiento de los CFs humanos primarios con el fármaco NTB (2 μ M), fue capaz de impedir el cierre de la herida de manera significativa tanto a las 8h como a las 24h de tratamiento, llegando incluso a permanecer la herida abierta hasta las 48h (**Figura 52**). Sin embargo, concentraciones más bajas de NTB (0.02 μ M) no fueron capaces de reproducir dichos efectos, cerrándose la herida transcurrida 24h (**Figura 52**).

Sin embargo, los fármacos LOS (**Figura 53**), PFD (**Figura 54**) y CIL (**Figura 55**) no tuvieron efectos por sí mismos sobre el proceso de migración de los CFs, cerrándose progresivamente la herida de modo similar al control (vehículo).

En resumen, el fármaco NTB volvió a mostrar efectos significativos sobre el proceso de migración de los CFs únicamente a la concentración de 2 μ M.

RESULTADOS

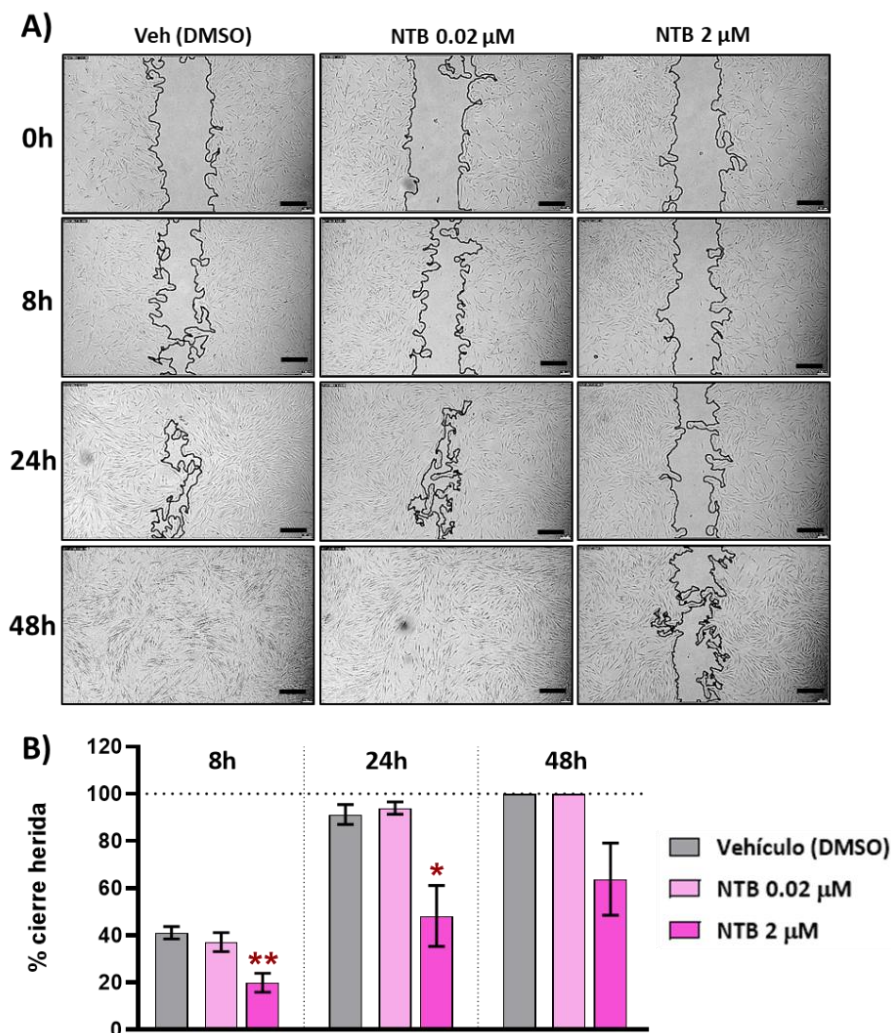


Figura 52. Efecto del fármaco Nintedanib sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios. Tras generar la herida en el cultivo de CFs y posterior tratamiento con el fármaco NTB (0.02 y 2 μ M), se realizó un seguimiento a diferentes tiempos (0, 8, 24 y 48h). Se tomaron tres fotos en la misma zona de la herida y el área de la herida generada se cuantificó con el programa ImageJ 1.48v; **A)** Imágenes representativas del ensayo de migración celular tras el tratamiento con NTB tomadas a tiempo 0, 8, 24 y 48h con un microscopio óptico de fluorescencia Leica® DMI8 con un aumento de 4X y empleando el software Cell® v.2.8. (Barra= 100 μ m); **B)** Tras la cuantificación de las imágenes, los resultados obtenidos fueron relativizados al tiempo 0h de cada tratamiento (100% abierto) y expresados en porcentaje. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5). * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo vehículo (DMSO). Se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la corrección Geisser-Greenhouse. (línea punteada: 100% de cierre de la herida).

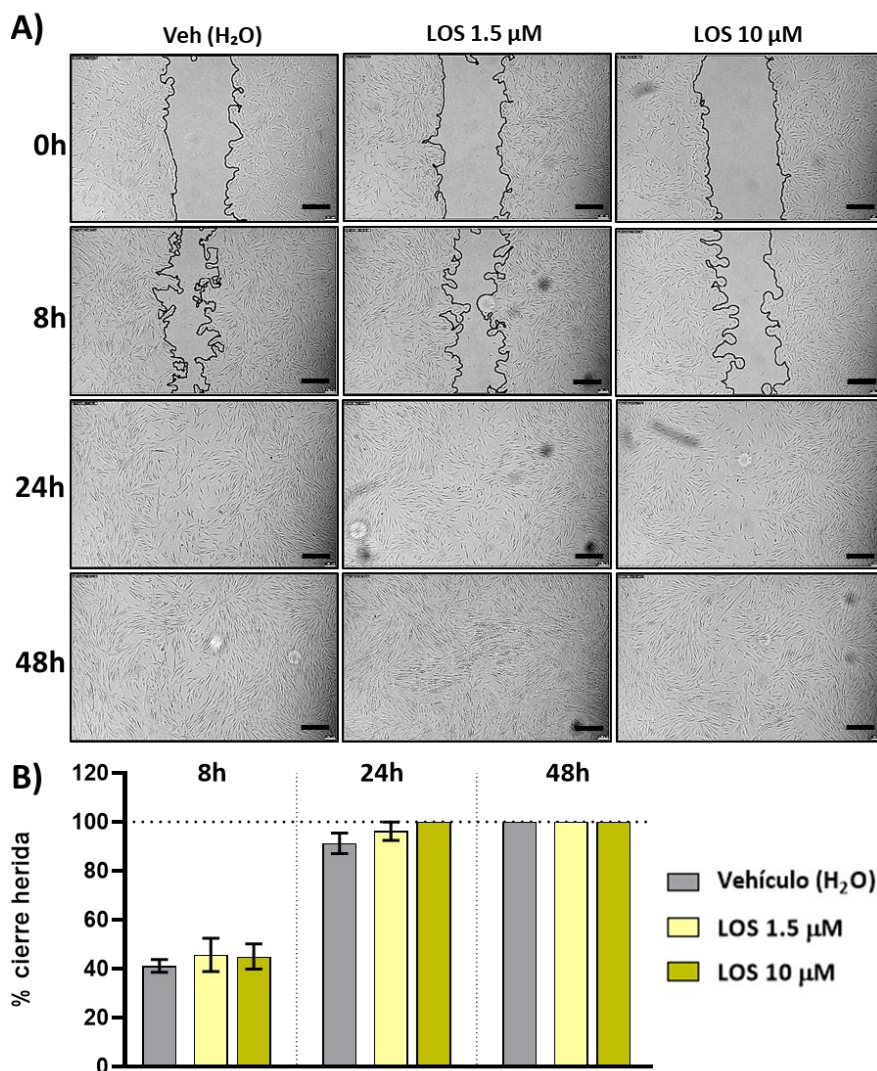


Figura 53. Efecto del fármaco Losartán sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios. Tras generar la herida en el cultivo de CFs y posterior tratamiento con el fármaco LOS (1.5 y 10 μ M), se realizó un seguimiento a diferentes tiempos (0, 8, 24 y 48h). Se tomaron tres fotos en la misma zona de la herida y el área de la herida generada se cuantificó con el programa ImageJ 1.48v; **A)** Imágenes representativas del ensayo de migración celular tras el tratamiento con LOS tomadas a tiempo 0, 8, 24 y 48h con un microscopio óptico de fluorescencia Leica® DMI8 con un aumento de 4X y empleando el software CellR v.2.8. (Barra= 100 μ m); **B)** Tras la cuantificación de las imágenes, los resultados obtenidos fueron relativizados al tiempo 0h de cada tratamiento (100% abierto) y expresados en porcentaje. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5). Se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la corrección Geisser-Greenhouse. (línea punteada: 100% de cierre de la herida).

RESULTADOS

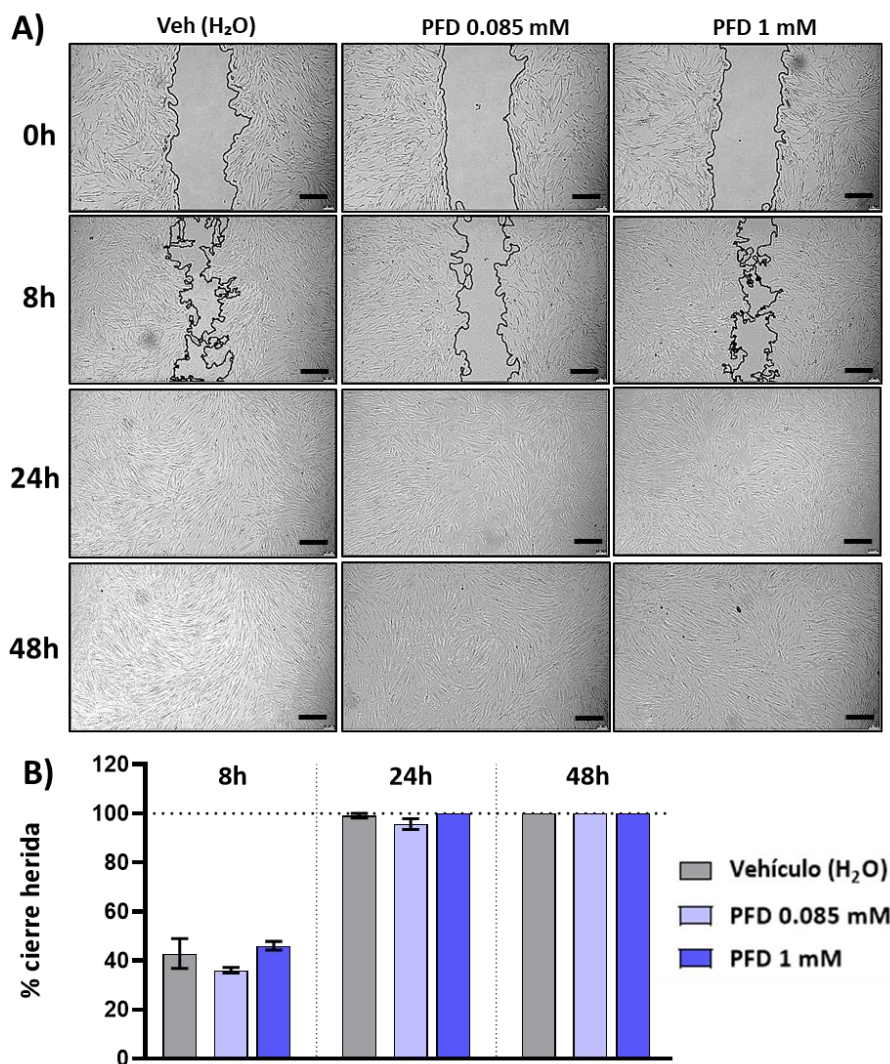


Figura 54. Efecto del fármaco Pirfenidona sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios. Tras generar la herida en el cultivo de CFs y posterior tratamiento con el fármaco PFD (0.085 y 1 mM), se realizó un seguimiento a diferentes tiempos (0, 8, 24 y 48h). Se tomaron tres fotos en la misma zona de la herida y el área de la herida generada se cuantificó con el programa ImageJ 1.48v; **A)** Imágenes representativas del ensayo de migración celular tras el tratamiento con PFD tomadas a tiempo 0, 8, 24 y 48h con un microscopio óptico de fluorescencia Leica® DMI8 con un aumento de 4X y empleando el software Cell® v.2.8. (Barra= 100 μ m); **B)** Tras la cuantificación de las imágenes, los resultados obtenidos fueron relativizados al tiempo 0h de cada tratamiento (100% abierto) y expresados en porcentaje. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=3). Se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la corrección Geisser-Greenhouse. (línea punteada: 100% de cierre de la herida).

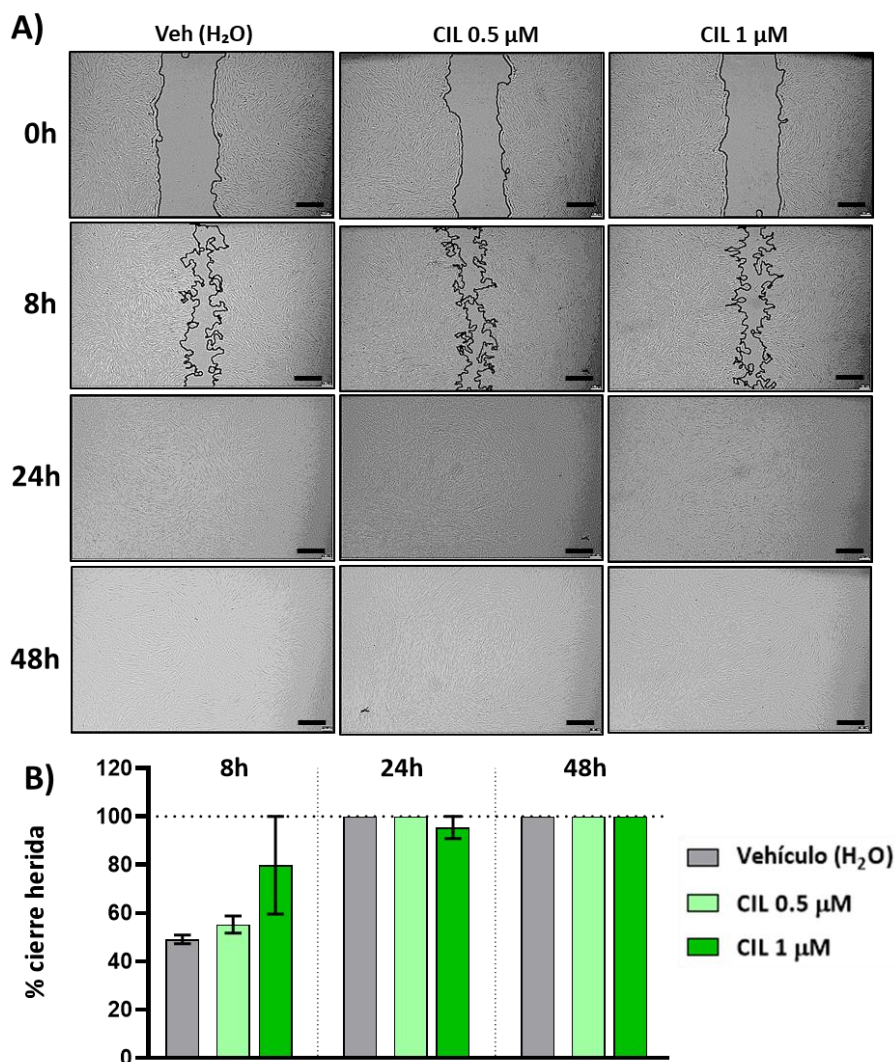


Figura 55. Efecto del fármaco Cilengitide sobre el proceso de migración celular realizado en los CFs humanos primarios. Tras generar la herida en el cultivo de CFs y posterior tratamiento con el fármaco CIL (0.5 y 1 μ M), se realizó un seguimiento a diferentes tiempos (0, 8, 24 y 48h). Se tomaron tres fotos en la misma zona de la herida y el área de la herida generada se cuantificó con el programa ImageJ 1.48v; **A)** Imágenes representativas del ensayo de migración celular tras el tratamiento con CIL tomadas a tiempo 0, 8, 24 y 48h con un microscopio óptico de fluorescencia Leica® DMI8 con un aumento de 4X y empleando el software Cell® v.2.8. (Barra= 100 μ m); **B)** Tras la cuantificación de las imágenes, los resultados obtenidos fueron relativizados al tiempo 0h de cada tratamiento (100% abierto) y expresados en porcentaje. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=3). Se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de la corrección Geisser-Greenhouse. (línea punteada: 100% de cierre de la herida).

RESULTADOS

2. SANGRE DE DONANTES SANOS

2.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN LEUCOCITARIAS: CD11b Y CD18

Se analizó el efecto de los fármacos sobre la expresión de las dos subunidades que conforman la molécula leucocitaria Mac-1: CD11b y CD18. Ninguno de los fármacos analizados [NTB (**Figura 56**), LOS (**Figura 57**), PFD y CIL (datos no mostrados)] produjo efectos “*per se*” sobre la expresión de las moléculas CD11b y CD18 a ninguna de las dos concentraciones de fármaco empleadas, en ninguna de las poblaciones leucocitarias analizadas (neutrófilos y monocitos).

Como era de esperar, el estímulo proinflamatorio TNF- α produjo un aumento significativo de ambas moléculas.

El fármaco NTB (2 μ M) fue capaz de revertir significativamente el aumento inducido por TNF- α tanto de CD11b (**Figura 56-A**) como de CD18 (**Figura 56-B**), en la población de monocitos, pero no en la de neutrófilos. La concentración de 0.02 μ M también fue capaz de revertir el aumento inducido de CD18 en la población de monocitos (**Figura 56-B**). Sin embargo, el fármaco LOS, no fue capaz de revertir el aumento inducido por el estímulo TNF- α de ninguna de las dos moléculas analizadas (**Figura 57**).

En definitiva, tras el análisis de las moléculas de adhesión CD11b y CD18 [Mac-1] en sangre entera, el NTB (2 μ M) volvió a ser el único fármaco capaz de provocar cambios significativos.

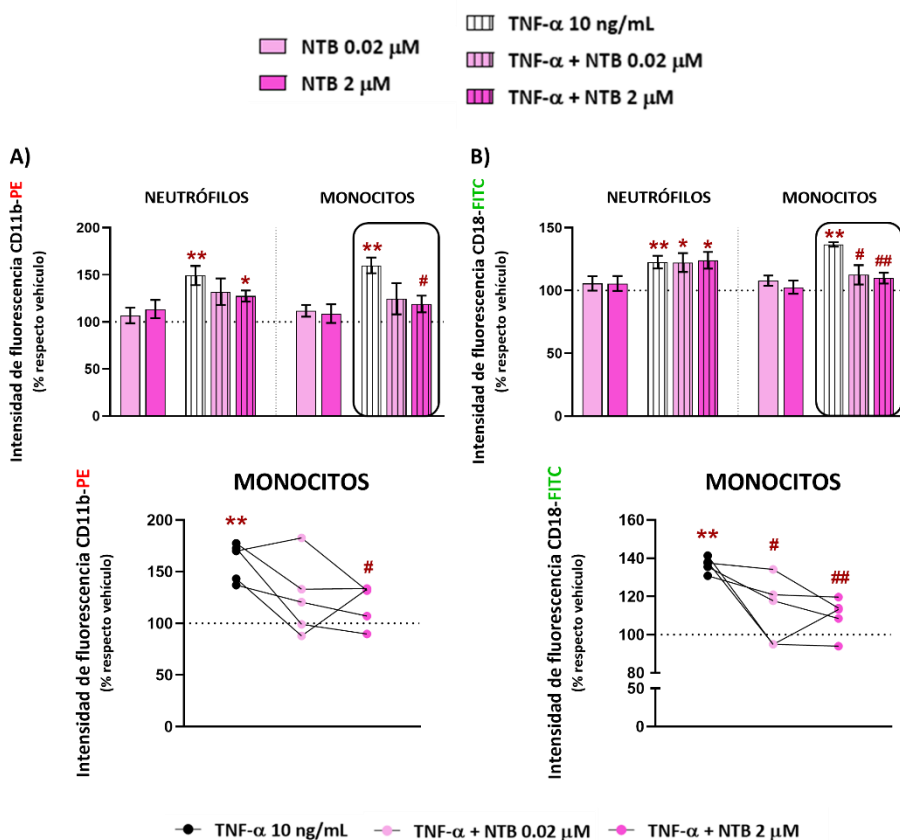


Figura 56. Efecto del fármaco Nintedanib sobre la expresión de las moléculas de adhesión CD11b y CD18 tras el tratamiento de la sangre entera. La sangre entera procedente de donantes sanos se trató durante 4h a 37°C con el fármaco NTB (0.02 y 2 μM) o con el TNF- α 10 ng/mL. En algunos casos, NTB y TNF- α se administraron conjuntamente. Transcurrido el tiempo de tratamiento, la sangre se incubó durante 30 min con los anticuerpos **A) CD11b-PE** y **B) CD18-FITC** a 4°C y en oscuridad. Finalizado el tratamiento se analizaron 10.000 eventos/muestra mediante el citómetro de flujo. Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje como intensidad de fluorescencia con respecto al vehículo (100%). Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-7). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al vehículo (línea punteada); # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ respecto al TNF- α . Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

RESULTADOS

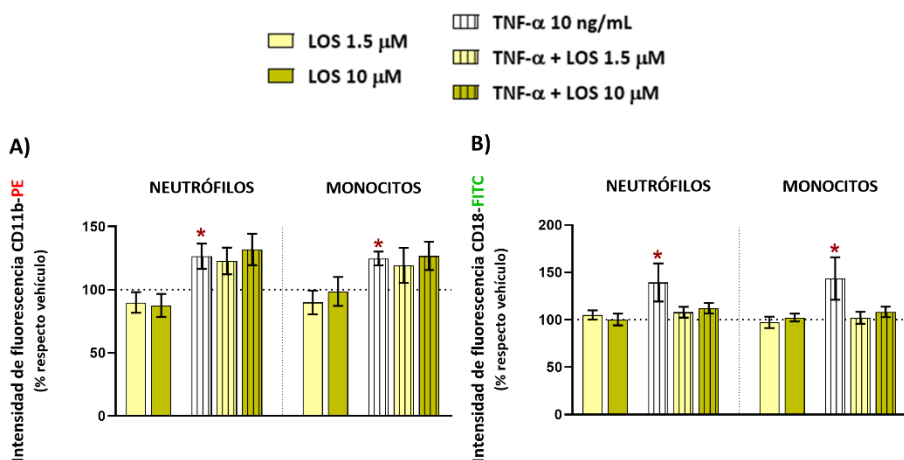


Figura 57. Efecto del fármaco Losartán sobre la expresión de las moléculas de adhesión CD11b y CD18 tras el tratamiento de la sangre entera. La sangre entera procedente de donantes sanos se trató durante 4h a 37°C con el fármaco LOS (1.5 y 10 μM) o con el TNF- α 10 ng/mL. En algunos casos, NTB y TNF- α se administraron conjuntamente. Transcurrido el tiempo de tratamiento, la sangre se incubó durante 30 min con los anticuerpos **A)** CD11b-PE y **B)** CD18-FITC a 4°C y en oscuridad. Finalizado el tratamiento se analizaron 10.000 eventos/muestra mediante el citómetro de flujo. Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje como intensidad de fluorescencia con respecto al vehículo (100%). Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M (n=5-7). * $p \leq 0.05$ respecto al vehículo (línea punteada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

Tras los significativos resultados obtenidos *in vitro* sobre el cultivo primario de CFs humanos, el fármaco NTB fue estudiado en el modelo animal junto con el fármaco LOS, que se escogió con respecto al resto de fármacos evaluados (PFD y CIL) ya que forma parte de la terapia farmacológica actual para el tratamiento de la IC.

BLOQUE II: RESULTADOS EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*. MODELO MURINO DE LIGADURA TRANSITORIA DE LA ARTERIA CORONARIA

1. EFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA SUPERVIVENCIA, PESO CORPORAL Y PESO DEL CORAZÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales sometidos al procedimiento quirúrgico basado en la ligadura de la arteria coronaria (**LAD+vehículo**) presentaron una mortalidad significativa del 33.33% en comparación con los animales sometidos a la operación simulada sin ligadura (**SHAM**). Los animales sometidos a la cirugía tratados con los fármacos, NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**), no presentaron una mortalidad significativamente diferente al grupo **LAD+vehículo**. Sin embargo, la mortalidad en el grupo **LAD+NTB** fue ligeramente superior al grupo **LAD+vehículo** (50.00% vs. 33.33% vehículo) (**Figura 58**).

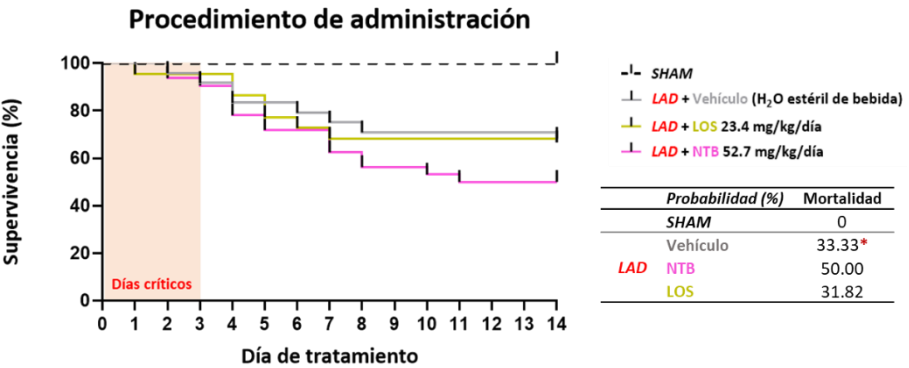


Figura 58. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la supervivencia de los animales de experimentación durante 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: vehículo (H₂O estéril de bebida), NTB (52.7 mg/kg/día) y LOS (23.4 mg/kg/día). La figura muestra la curva de supervivencia tipo Kaplan-Meier de los distintos grupos experimentales, expresado en porcentaje, respecto a los animales iniciales durante los 14 días de procedimiento, resaltándose los días críticos postcirugía (zona sombreada). Se realizó la correlación Mantel-Cox. * $p \leq 0.05$ respecto al grupo SHAM. [SHAM (n=11) (línea discontinua); LAD+vehículo (n=17) (línea gris); LAD+NTB (n=16) (línea fucsia); LAD+LOS (n=15) (línea amarilla).

RESULTADOS

Durante los tres primeros días postcirugía (días críticos), todos los grupos experimentales perdieron peso debido al estrés quirúrgico que fueron recuperaron a lo largo de los 14 días de procedimiento (**Figura 59-A**). El grupo experimental **LAD+NTB** mostró un aspecto más débil que el resto de los grupos experimentales en el momento del sacrificio (**Figura 59-B**).

Con respecto al peso de los corazones, no se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, pero los corazones del grupo tratado con NTB (**LAD+NTB**) pesaban ligeramente menos que el resto, pero sin llegar a ser significativo. Cabe señalar, que los corazones de los ratones sometidos al procedimiento quirúrgico (**LAD+vehículo**, **LAD+NTB** y **LAD+LOS**) presentaban una zona isquémica ('blanquecina') y delgada, como consecuencia de la ligadura generada en la arteria coronaria descendente (**Figura 59-C**). Adicionalmente, los corazones del grupo tratado con NTB (**LAD+NTB**) mostraban un aspecto deforme y, en ocasiones rugoso, perdiendo la arquitectura normal del corazón.

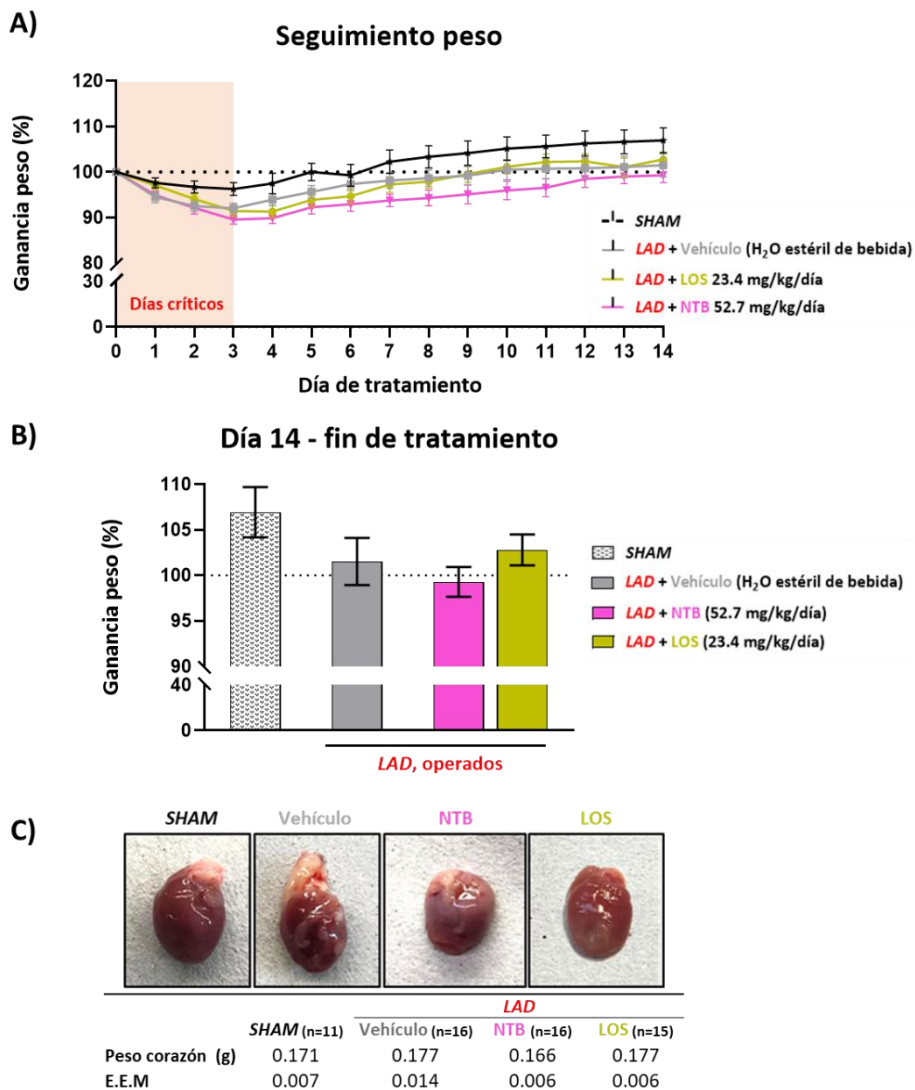


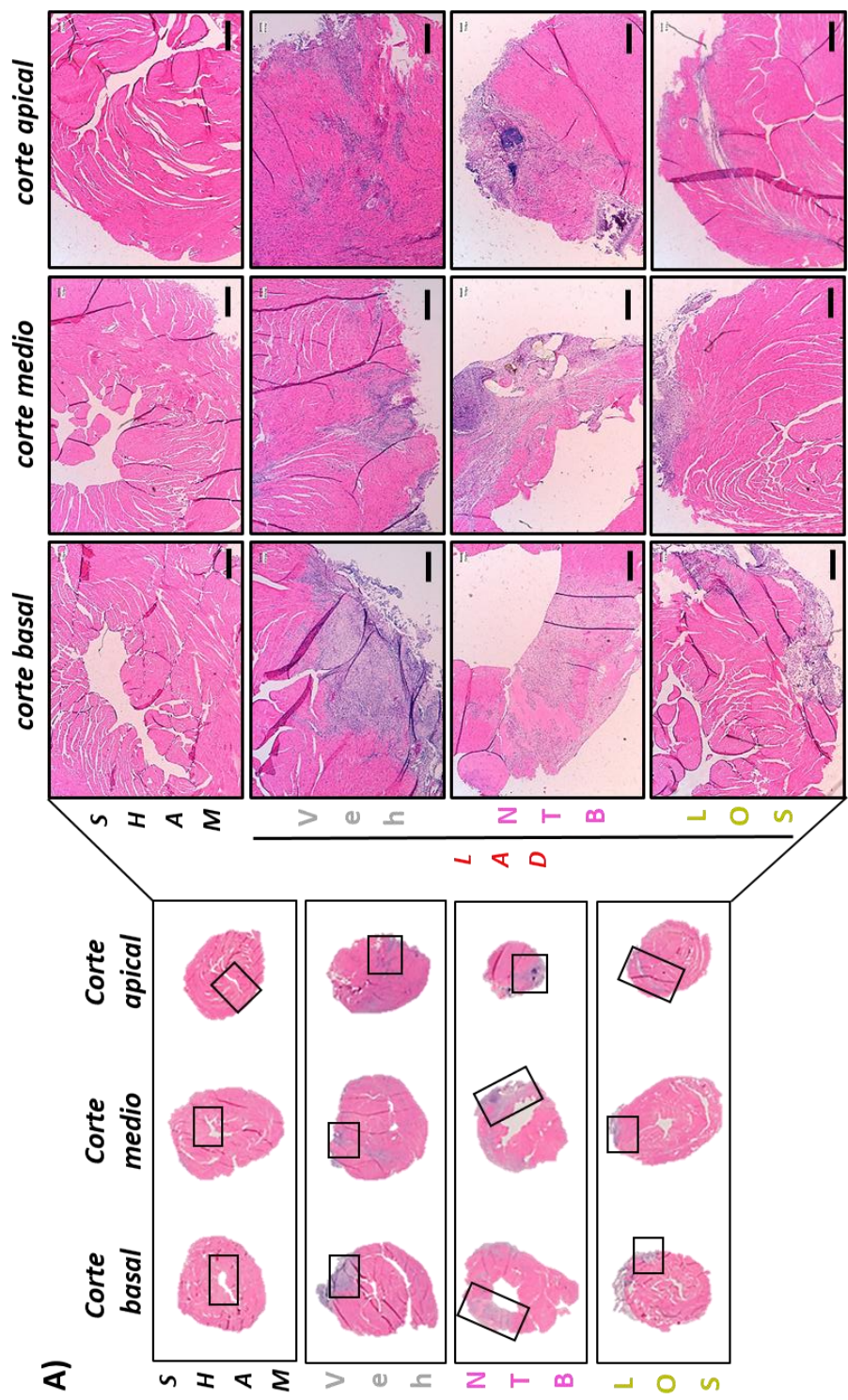
Figura 59. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre el peso corporal y el peso del corazón durante los 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: **vehículo** (H_2O estéril de bebida), **NTB** (52.7 mg/kg/día) y **LOS** (23.4 mg/kg/día); **A)** Seguimiento diario del peso de los ratones durante los 14 días de administración; **B)** Se representan los resultados del día 14 de procedimiento. Los datos fueron expresados como porcentaje de la ganancia de peso respecto al peso inicial (100%, línea punteada) y representados como la media $\pm$ E.E.M [**SHAM** ($n=11$), **LAD+vehículo** ($n=17$), **LAD+NTB** ($n=16$) y **LAD+LOS** ($n=15$)]. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico); **C)** Imágenes representativas de los corazones junto con su peso, tras el sacrificio.

RESULTADOS

2. EFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA EN EL TEJIDO CARDÍACO

Los corazones de los ratones pertenecientes al grupo **SHAM** eran macroscópicamente normales y presentaban una arquitectura tisular preservada sin infiltraciones leucocitarias. Por el contrario, el grupo **LAD+vehículo** mostró un aumento significativo en las infiltraciones leucocitarias (mayor acúmulo de células inmunitarias – leucocitos) (**Figura 60-A,B**).

Por lo que respecta a los corazones de los grupos tratados farmacológicamente con NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**), mostraron un grado de inflamación similar al grupo **LAD+vehículo** (**Figura 60-A,B**).



RESULTADOS

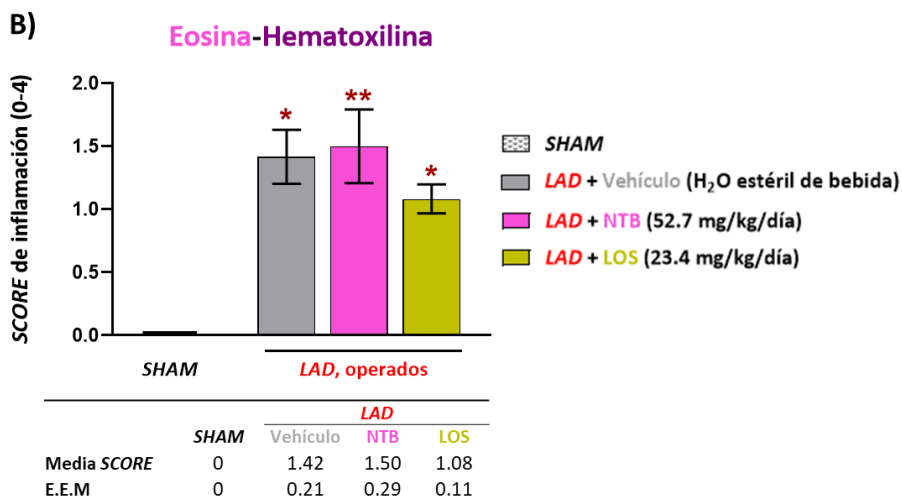
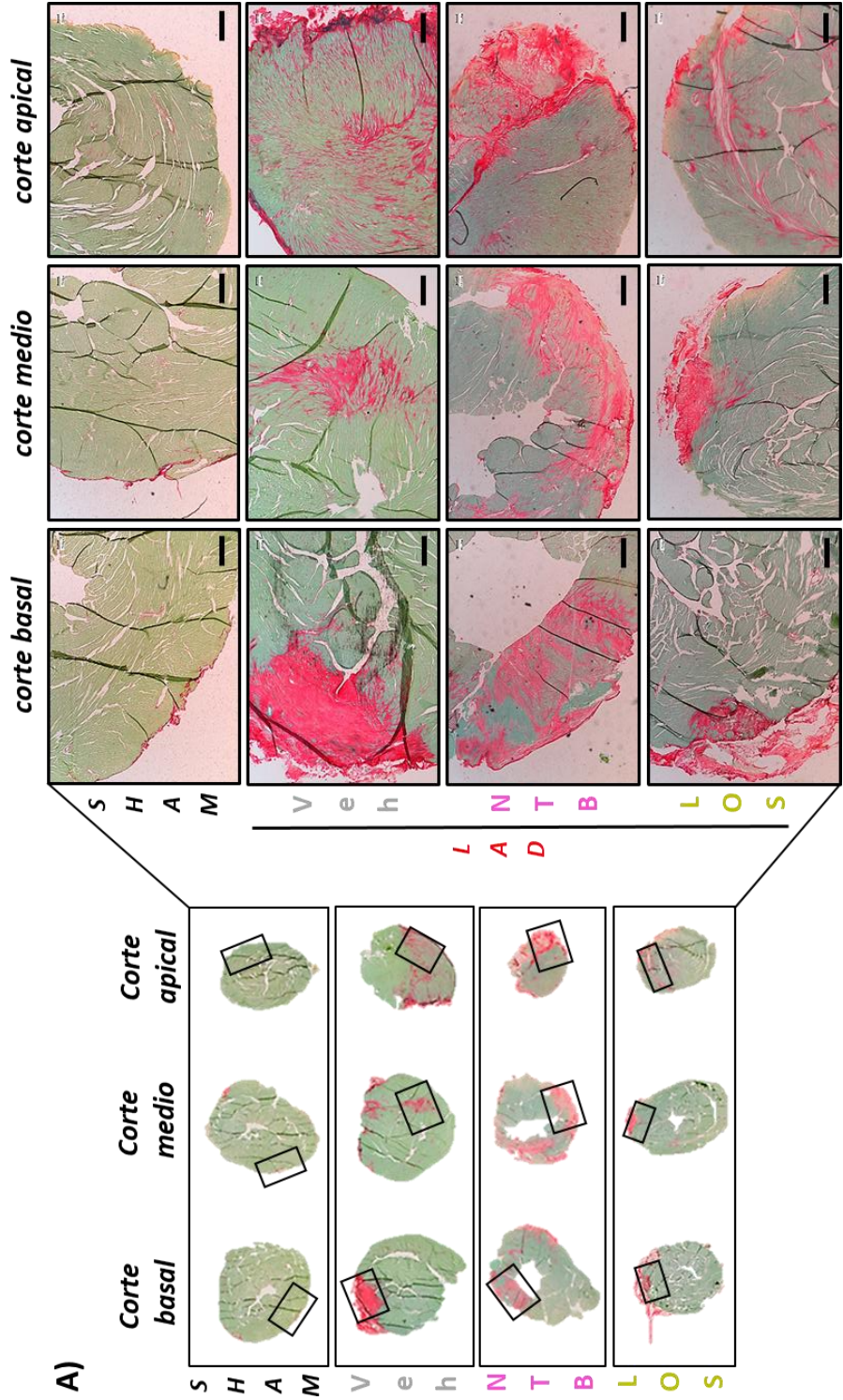


Figura 60. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre el grado de infiltración leucocitaria en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo **SHAM** (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: **vehículo** (H₂O estéril de bebida), **NTB** (52.7 mg/kg/día) y **LOS** (23.4 mg/kg/día); **A**) Imágenes representativas de la tinción eosina-hematoxilina de los cortes transversales de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales de ratones (Barra=100 µm); **B**) Los resultados obtenidos tras la asignación de la puntuación **SCORE** a cada uno de los tres cortes transversales de los diferentes grupos experimentales de ratones fue representado como la media del **SCORE**±E.E.M [**SHAM** (n=5), **LAD+vehículo** (n=6), **LAD+NTB** (n=6) y **LAD+LOS** (n=6)]. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al grupo **SHAM** (operación simulada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

3. EFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA FIBROSIS GENERADA EN EL TEJIDO CARDÍACO

Los corazones de los ratones pertenecientes al grupo experimental **SHAM** parecían macroscópicamente normales y presentaban una arquitectura tisular preservada con ausencia de depósitos de colágeno (ausencia de coloración roja) en el tejido cardíaco. Sin embargo, los corazones del grupo **LAD+vehículo** mostraron un aumento significativo en el colágeno tisular (**Figura 61-A,B**).

Los corazones de los ratones tratados con los fármacos NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**) no presentaron reducción en el acúmulo de colágeno inducido por el procedimiento quirúrgico de isquemia-reperfusión, obteniéndose valores similares a los del grupo **LAD+vehículo**. (**Figura 61-A,B**).



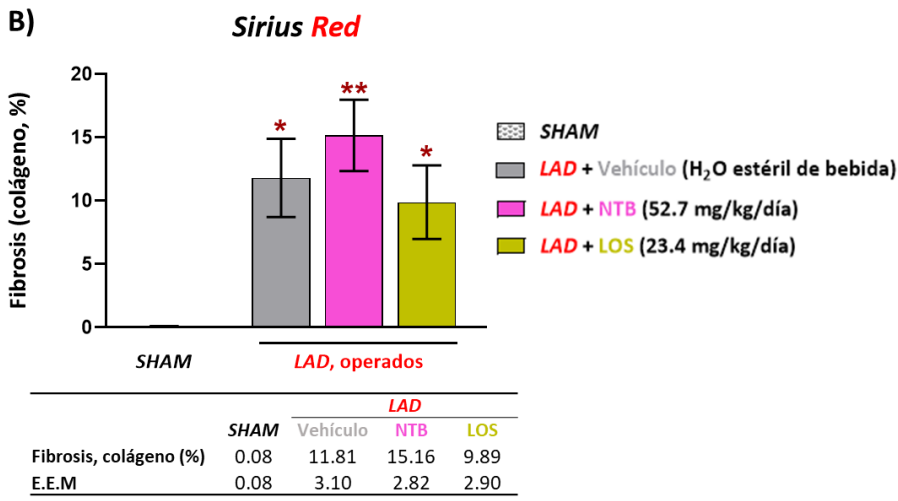


Figura 61. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre el grado de fibrosis generado en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo *SHAM* (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: **vehículo** (H_2O estéril de bebida), **NTB** (52.7 mg/kg/día) y **LOS** (23.4 mg/kg/día); **A**) Imágenes representativas de la tinción “*Sirius Red*” de los cortes transversales de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales (Barra=100 μm). **B**) Los resultados obtenidos tras la cuantificación de los cortes fueron expresados como porcentaje de infarto generado (depósito de colágeno) con respecto al área total del ventrículo izquierdo. Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M [*SHAM* (n=5), *LAD+vehículo* (n=6), *LAD+NTB* (n=6) y *LAD+LOS* (n=6)]. * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo *SHAM* (operación simulada). Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

Se analizó la relación entre el grado de infiltración leucocitaria y el grado de fibrosis generada en los cortes de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales sometidos al procedimiento quirúrgico (*LAD+vehículo*, *LAD+NTB* y *LAD+LOS*).

Se obtuvo una correlación positiva y significativa entre el grado de infiltración y fibrosis en los grupos experimentales *LAD+vehículo* (Figura 62-A) y el grupo *LAD+NTB* (Figura 62-B) Sin embargo, el grupo experimental *LAD+LOS* no mostró ninguna correlación entre ambos parámetros (Figura 62-C).

RESULTADOS

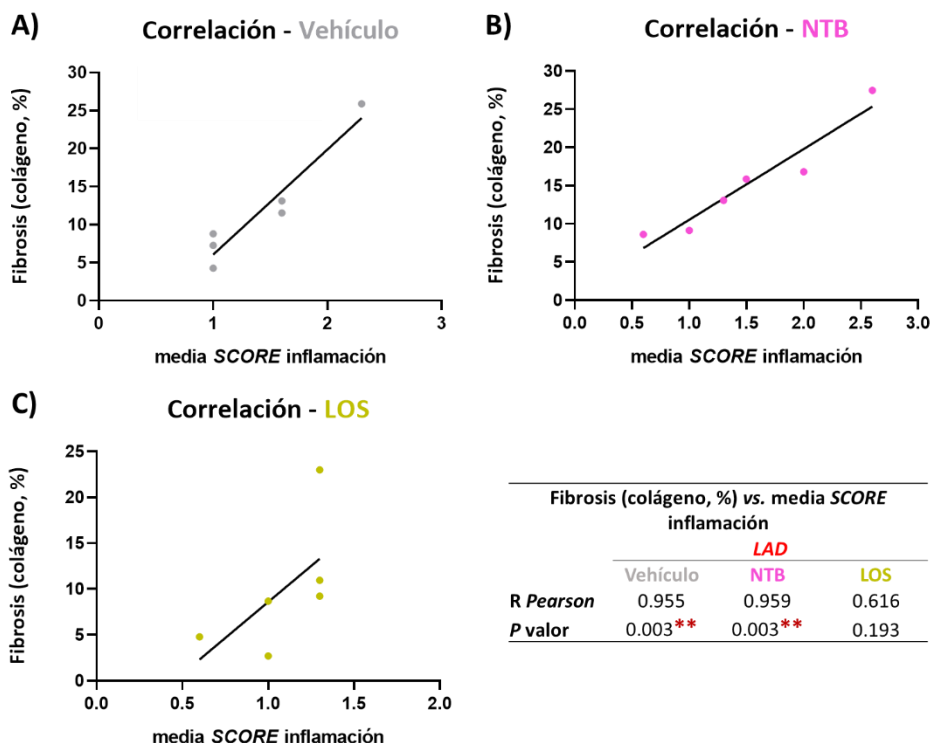


Figura 62. Análisis de correlación entre el grado de infiltración leucocitaria y el grado de fibrosis generado en los cortes de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: **vehículo** (H₂O estéril de bebida), **NTB** (52.7 mg/kg/día) y **LOS** (23.4 mg/kg/día). La figura muestra el estudio de la correlación existente entre el grado de infiltración leucocitaria (inflamación, SCORE) y el grado de fibrosis, expresado como porcentaje de colágeno, de los grupos experimentales **A) LAD+vehículo** (n=6), **B) LAD+NTB** (n=6) y **C) LAD+LOS** (n=6). El valor de R fue determinado mediante el análisis de correlación Pearson, tras realizar el correspondiente análisis de normalidad, entre ambas variables. ** $p \leq 0.01$.

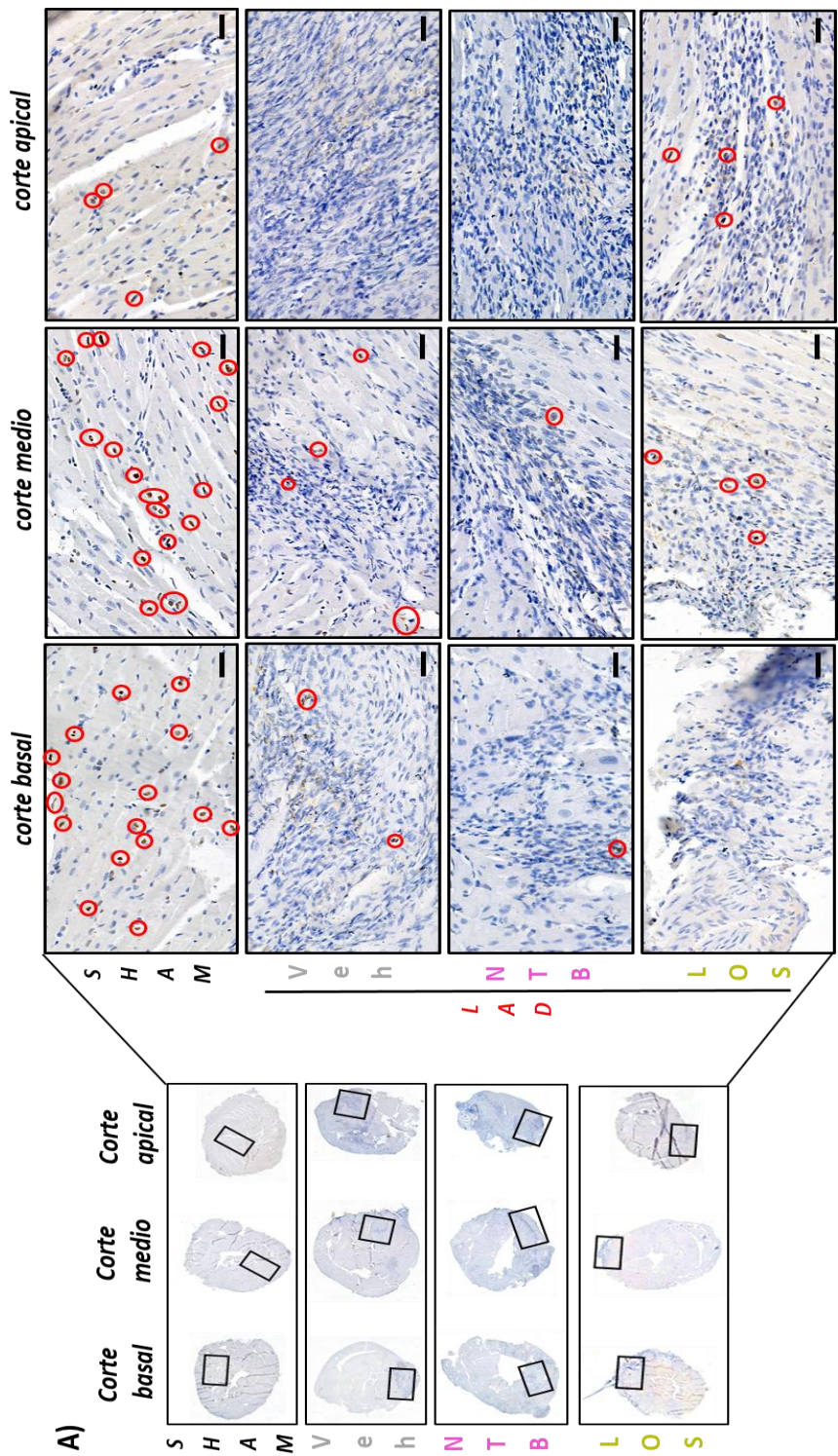
4. EFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS

La proliferación celular en los cortes de corazón de los diferentes grupos experimentales se cuantificó mediante la expresión de Ki67. En el grupo experimental sometido al procedimiento quirúrgico (**LAD+vehículo**) se observó una reducción significativa de la proliferación celular con respecto al grupo **SHAM** (Figura 63-A,B). Tras la cuantificación de los cortes se observó que en las zonas infartadas la tasa de proliferación celular era menor que en las zonas no infartadas.

Tras analizar los cortes de los grupos experimentales tratados con los fármacos, NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**), se determinó que ninguno de ellos afectó a la tasa de proliferación celular reducida por el procedimiento quirúrgico de isquemia-reperusión, **LAD+vehículo** (Figura 63-A,B).

Con respecto al proceso de angiogénesis, se observó una tendencia al alza (↑proceso de angiogénesis), pero sin llegar a ser significativa, en el grupo experimental **LAD+vehículo**, con respecto al grupo **SHAM** (Figura 64-A,B). Tras analizar los cortes de los grupos experimentales tratados con los fármacos, NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**), se observó que el grupo **LAD+NTB** presentó una tendencia al alza en el proceso de angiogénesis similar a la del grupo experimental **LAD+vehículo** (Figura 64-A,B). Sin embargo, el grupo experimental **LAD+LOS** mostró una tendencia, cercana a la significatividad, a revertir el efecto generado en el grupo **LAD+vehículo** (Figura 64-A,B).

En resumen, ninguno de los fármacos fue capaz de mostrar un efecto beneficioso sobre el proceso de angiogénesis.



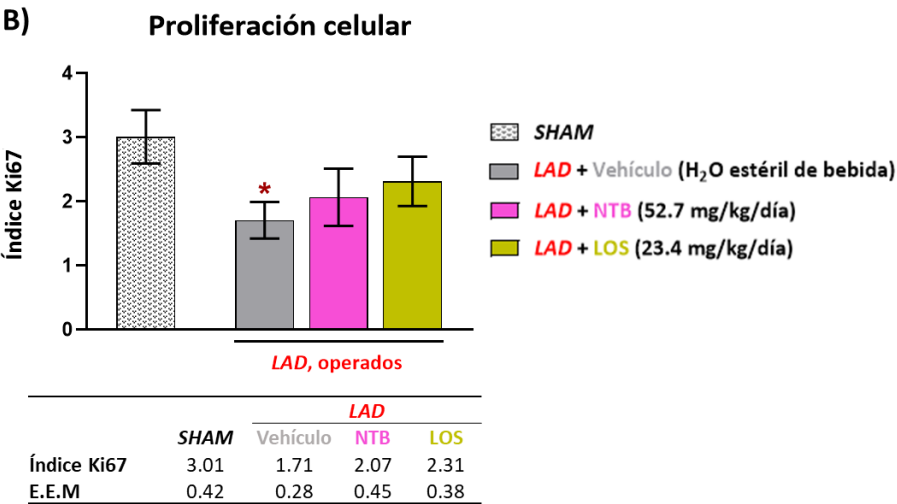
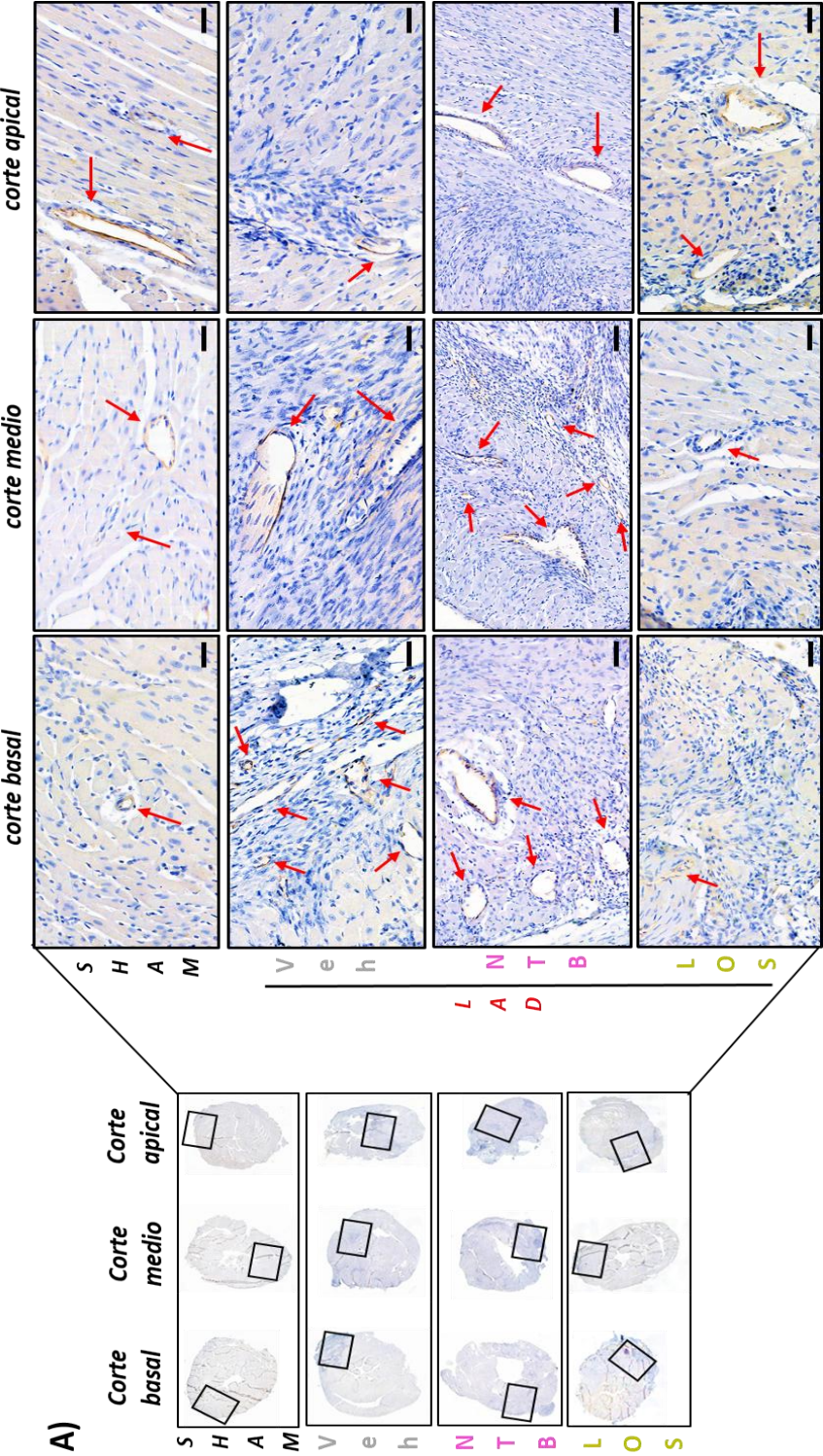


Figura 63. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la proliferación celular en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo *SHAM* (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: *vehículo* (H₂O estéril de bebida), *NTB* (52.7 mg/kg/día) y *LOS* (23.4 mg/kg/día); **A)** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica realizada para la detección de Ki67 en los cortes transversales de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales (las imágenes muestran las zonas infartadas) (Barra = 100 μ m). Los **círculos rojos** rodean a las células positivas para Ki67; **B)** Los resultados absolutos obtenidos tras la cuantificación mediante el programa QuPath™, fueron expresados como índice de Ki67 (nº células Ki67+ / nº total células detectadas x 100). Los datos fueron representados como la media $\pm$ E.E.M [*SHAM* (n=5), *LAD+vehículo* (n=6), *LAD+NTB* (n=6) y *LAD+LOS* (n=6)]. * $p\leq 0.05$ respecto al grupo *SHAM*. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).



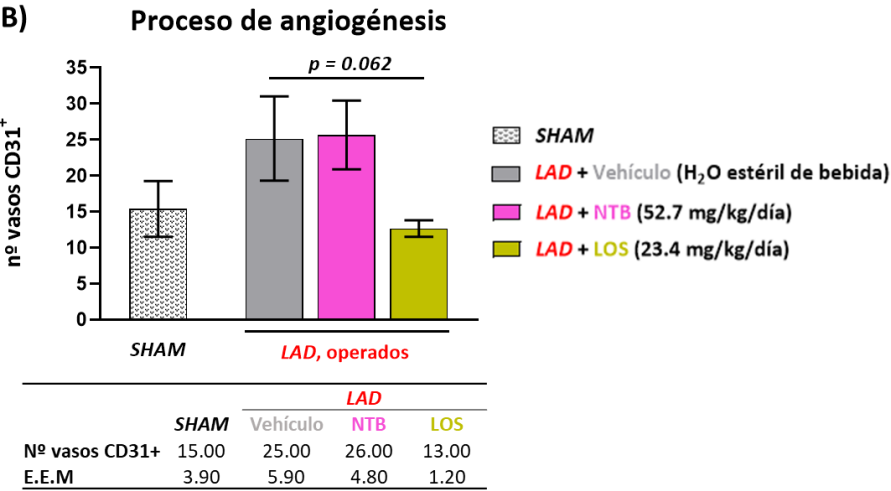


Figura 64. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión de CD31 en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: **vehículo** (H₂O estéril de bebida), **NTB** (52.7 mg/kg/día) y **LOS** (23.4 mg/kg/día); **A**) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica realizada para la detección de CD31 en los cortes transversales de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales (las imágenes muestran las zonas infartadas) (Barra = 100 µm). Las **flechas rojas** indican los vasos presentes en el tejido cardíaco positivos para CD31; **B**) Los resultados absolutos obtenidos tras la cuantificación mediante el programa QuPath™, fueron expresados como el nº total de vasos positivos para CD31 presentes en los cortes de tejido cardíaco, después de realizar la media de los valores obtenidos en cada uno de los tres cortes transversales. Los datos fueron representados como la media±E.E.M [**SHAM** (n=5), **LAD+vehículo** (n=6), **LAD+NTB** (n=6) y **LAD+LOS** (n=6)]. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

5. EFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE DAÑO CARDÍACO

No se obtuvieron cambios significativos en ninguno de los biomarcadores cardíacos analizados [troponina I (**Figura 65-A**), el péptido BNP (**Figura 65-B**) y la GAL-3 (**Figura 65-C**)] en el grupo experimental **LAD+vehículo**. Sin embargo, el grupo experimental tratado con NTB (**LAD+NTB**) presentó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de troponina I cardíaca (**Figura 65-A**), sin

RESULTADOS

verse afectado ningún otro biomarcador. Por el contrario, el grupo experimental tratado con LOS (**LAD+LOS**) no presentó ningún cambio en ninguno de los biomarcadores cardíacos (**Figura 65**).

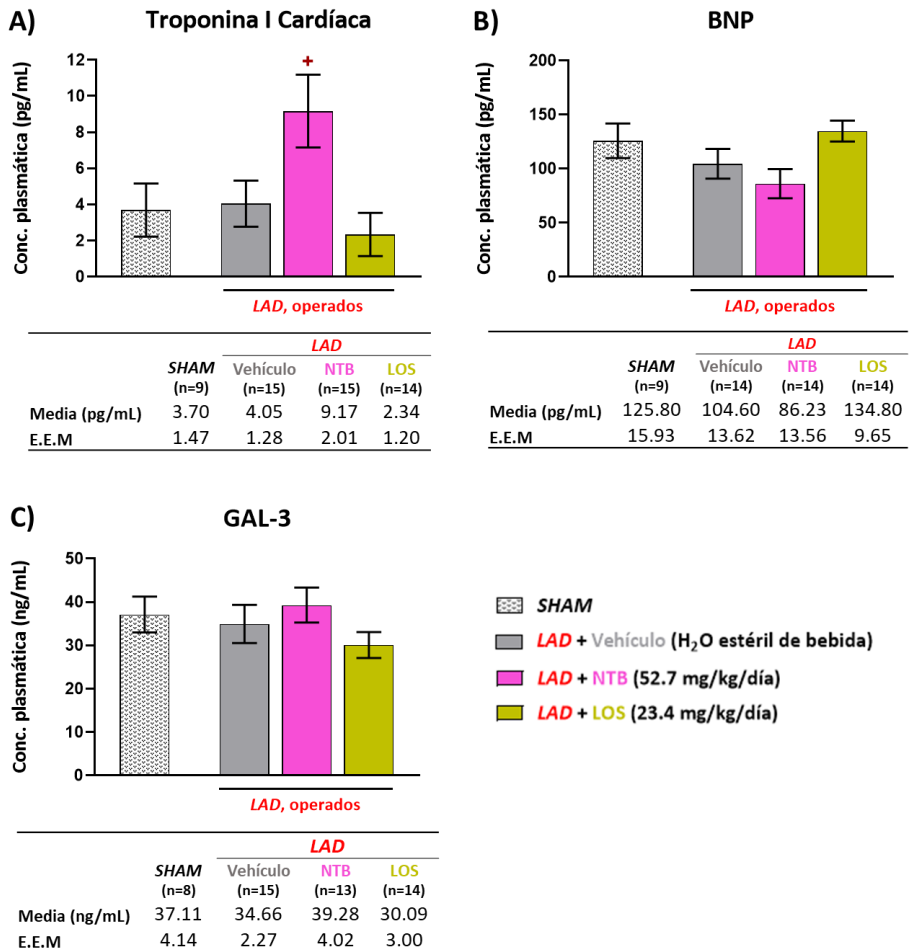


Figura 65. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre los biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: **vehículo** (H₂O estéril de bebida), **NTB** (52.7 mg/kg/día) y **LOS** (23.4 mg/kg/día). Se detectaron mediante *ELISA* los biomarcadores plasmáticos **A)** troponina I cardíaca, **B)** el péptido BNP y **C)** la proteína GAL-3. Los resultados absolutos obtenidos fueron expresados en los valores de concentración plasmática correspondientes. Los datos fueron representados como la media±E.E.M (n: indicado en la tabla). **+p**≤0.05 respecto grupo **LAD+vehículo**. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

6. EFECTO DEL NINTEDANIB Y LOSARTÁN SOBRE LA EXPRESIÓN DE GÉNICA DE MARCADORES PROFIBRÓTICOS Y PROINFLAMATORIOS

Realizados los análisis histológicos correspondientes y analizados los biomarcadores en plasma, se procedió a analizar la expresión génica de determinados marcadores proinflamatorios y profibróticos en los cortes de tejido cardíaco.

Análisis de los genes proinflamatorios

Se analizaron los genes inflamatorios *il-1 β* , *il-6* y *tnf- α* , empleando muestras de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales. Como cabría esperar, el grupo **SHAM** mostró niveles bajos de las citocinas proinflamatorias analizadas. Sin embargo, a pesar de obtener una tendencia al alza en los genes *il-1 β* (**Figura 66-A**) e *il-6* (**Figura 66-B**) tras el procedimiento quirúrgico (**LAD+vehículo**), los cambios no fueron significativos. Por otro lado, el gen de *tnf- α* no se vio modificado, obteniéndose un valor similar en ambos grupos (**SHAM** y **LAD+vehículo**) (**Figura 66-C**).

Por lo que respecta al grupo experimental tratado con el fármaco NTB (**LAD+NTB**) se observó un aumento significativo de la expresión de la *il-6* (**Figura 66-B**) con respecto al grupo experimental **LAD+vehículo**. Mientras que el tratamiento con el fármaco LOS (**LAD+LOS**), no produjo cambios significativos con respecto al grupo **LAD+vehículo** en ninguno de los genes proinflamatorios analizados (**Figura 66**).

RESULTADOS

MARCADORES PROINFLAMATORIOS

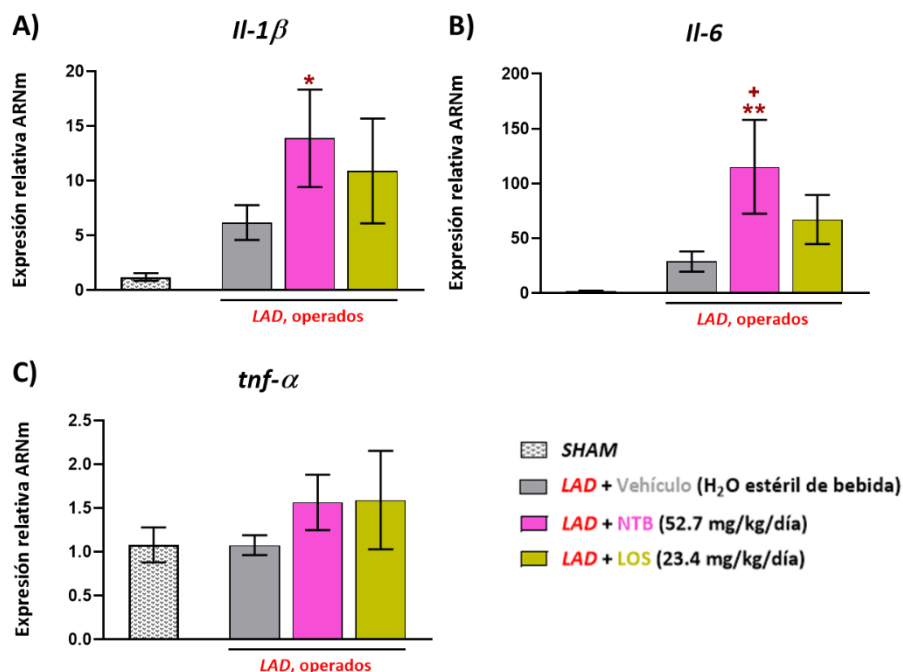


Figura 66. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión génica de marcadores proinflamatorios en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: vehículo (H₂O estéril de bebida), NTB (52.7 mg/kg/día) y LOS (23.4 mg/kg/día). Tras 14 días de procedimiento se analizó la expresión génica de los marcadores proinflamatorios A) $il-1\beta$, B) $il-6$ y C) $tnf-\alpha$ en el tejido cardíaco de ratón, mediante qPCR. Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto a la media del grupo SHAM y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa. Los resultados fueron representados como la media±E.E.M [SHAM (n=5), LAD+vehículo (n=7-9), LAD+NTB (n=7-9) y LAD+LOS (n=7-9)]. * $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$ respecto al grupo SHAM; + $p\leq 0.05$ respecto al grupo LAD+vehículo. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

Análisis de los genes profibróticos

Se analizaron genes que codifican para componentes y reguladores de la MEC (*col1a1*, *col3a1*, *fn1*, *mmp9* y *timp1*) y, genes implicados en varios procesos celulares (*s100a4*, *cdh2*, *tgf- β_1* y *acta2*) empleando muestras de tejido cardíaco de los diferentes grupos experimentales.

Como cabría esperar, el grupo **SHAM** mostró niveles bajos de los genes analizados. Sin embargo, los ratones del grupo **LAD+vehículo** mostraron aumentos significativos en los genes de *col1a1* (Figura 67-A), *col3a1* (Figura 67-B), *fn1* (Figura 67-C) y *timp1* (Figura 67-E), por lo que respecta a los genes que constituyen y participan en el remodelado de la MEC; y aumentos en los genes *s100a4* (Figura 68-A) y *tgf- β_1* (Figura 68-C), responsables de la señalización, regulación y contracción celular. Los aumentos en la expresión génica de los colágenos (*col1a1* y *col3a1*) concuerdan con el aumento obtenido en el depósito de colágeno en el tejido cardíaco del grupo experimental **LAD+vehículo**, tras la tinción “Sirius Red” (Figura 61-A,B).

Por lo que respecta a los grupos experimentales tratados con NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**), ninguno de ellos fue capaz de revertir la expresión de los genes profibróticos analizados. El grupo experimental **LAD+NTB** presentó valores significativamente aumentados en determinados genes que constituyen y regulan la MEC, como el *col1a1* (Figura 67-A), *fn1* (Figura 67-C) y *timp1* (Figura 67-E), con respecto al grupo **LAD+vehículo**.

RESULTADOS

COMPONENTES Y REGULADORES DE LA MEC

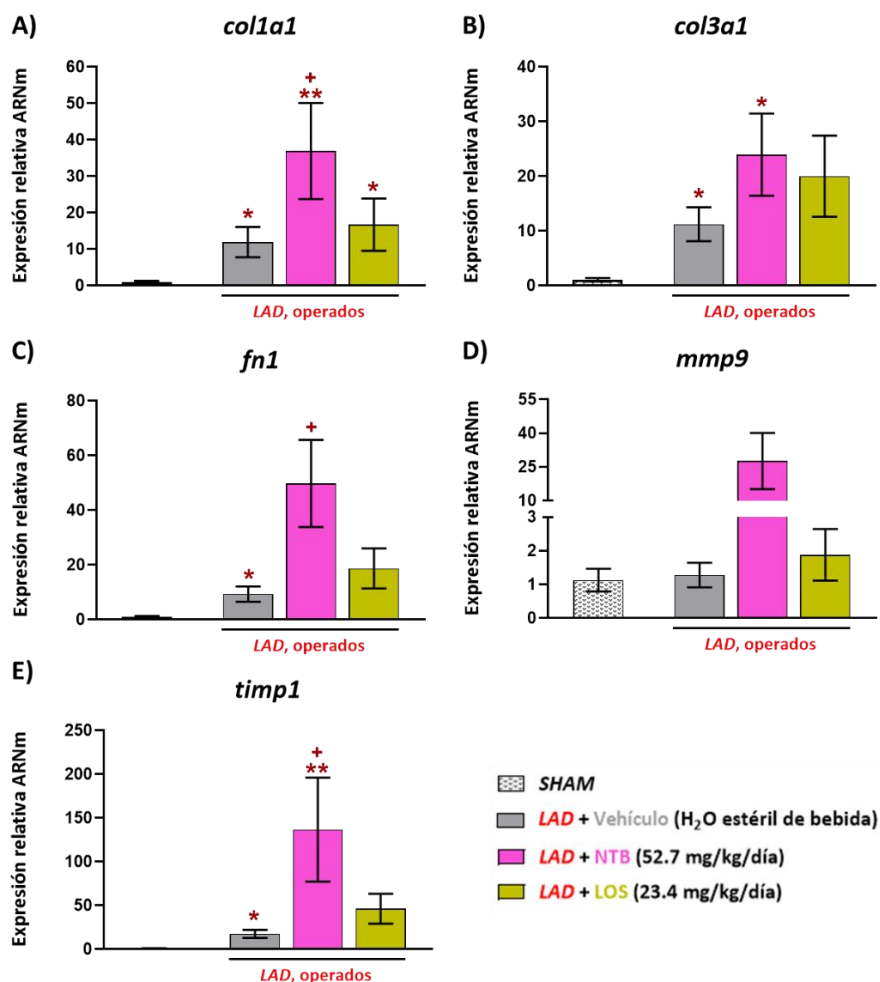


Figura 67. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión génica de marcadores que constituyen y regulan la matriz extracelular en el tejido cardíaco tras 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: vehículo (H₂O estéril de bebida), NTB (52.7 mg/kg/día) y LOS (23.4 mg/kg/día). Tras 14 días de procedimiento se analizó la expresión génica A) *col1a1*, B) *col3a1*, C) *fn1*, D) *mmp9* y E) *timp1* en tejido cardíaco de ratón mediante qPCR. Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto a la media del grupo SHAM y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa. Los resultados fueron representados como la media±E.E.M [SHAM (n=5), LAD+vehículo (n=7-9), LAD+NTB (n=7-9) y LAD+LOS (n=7-9)]. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ respecto al grupo SHAM; + $p \leq 0.05$ respecto al grupo LAD+vehículo. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico).

SEÑALIZACIÓN, REGULACIÓN Y CONTRACCIÓN CELULAR

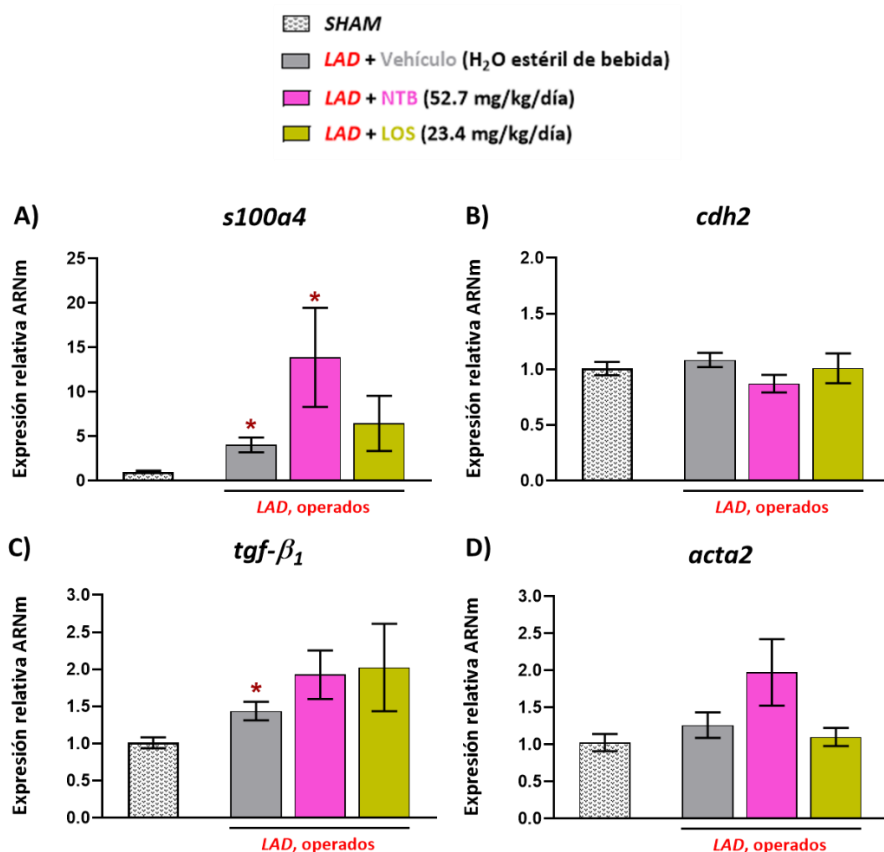


Figura 68. Efecto de los diferentes grupos experimentales sobre la expresión génica de marcadores involucrados en diversos procesos celulares en el tejido cardíaco 14 días de procedimiento. Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Todos ellos fueron sometidos al procedimiento quirúrgico, a excepción del grupo SHAM (no ligadura). Posteriormente, los animales fueron tratados durante 14 días ininterrumpidos con: vehículo (H₂O estéril de bebida), NTB (52.7 mg/kg/día) y LOS (23.4 mg/kg/día). Tras 14 días de procedimiento se analizó la expresión génica A) *s100a4*, B) *cdh2*, C) *tgf-β₁* y D) *acta2* en tejido cardíaco de ratón, mediante qPCR. Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto a la media del grupo SHAM y expresados en tanto por uno como cambios en la expresión génica relativa. Los datos fueron representados como la media ± E.E.M [SHAM (n=5), LAD+vehículo (n=7-9), LAD+NTB (n=7-9) y LAD+LOS (n=7-9)]. * $p < 0.05$ respecto al grupo SHAM. Se realizó el análisis Kruskal-Wallis (distribución no normal, no paramétrico), o de una vía (distribución normal, paramétrico), según el análisis de normalidad correspondiente.

RESULTADOS

Obtenidos los resultados del análisis de expresión génica se analizó la posible relación entre los distintos genes profibróticos y los biomarcadores plasmáticos cardíacos medidos en los diferentes grupos experimentales de ratones. El grupo experimental **LAD+vehículo** obtuvo correlaciones negativas y significativas entre el biomarcador plasmático, GAL-3, y cada uno de los genes profibróticos *col1a1*, *col3a1*, *fn1*, *timp1* y *tgf-β₁*. Además, en este grupo experimental, la troponina I cardíaca mostró una correlación positiva y significativa con el gen *col3a1*. Por lo que respecta a los grupos experimentales que recibieron tratamiento farmacológico, los ratones tratados con NTB (**LAD+NTB**) mostraron correlaciones positivas y significativas entre el gen *mmp9* y los biomarcadores troponina I y BNP medidos en el plasma de los ratones. Sin embargo, el grupo que recibió LOS (**LAD+LOS**) como tratamiento, no mostró correlación entre los biomarcadores y los genes profibróticos analizados (**Tabla 27**).

Tabla 27. Correlaciones significativas obtenidas entre los biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco medidos en plasma con los distintos genes profibróticos analizados en los distintos grupos experimentales de ratones.

GRUPO EXPERIMENTAL	BIOMARCADOR	GEN	r Pearson, p valor
LAD+VEHÍCULO	GAL-3	<i>col1a1</i>	r = -0.777; p = 0.023*
		<i>col3a1</i>	r = -0.865; p = 0.005**
		<i>fn1</i>	r = -0.858; p = 0.007**
		<i>timp1</i>	r = -0.846; p = 0.008**
		<i>tgf-β₁</i>	r = -0.809; p = 0.015*
	Troponina I	<i>col3a1</i>	r = 0.706; p = 0.050*
	BNP		n.s
LAD+NTB	GAL-3		n.s
	Troponina I	<i>mmp9</i>	r = 0.843; p = 0.017*
	BNP	<i>mmp9</i>	r = 0.935; p = 0.006**

LAD: ligadura de la arteria coronaria descendente; **NTB:** nintedanib; **GAL-3:** galectina-3; **BNP:** péptido natriurético cerebral; **col1a1:** colágeno tipo I; **col3a1:** colágeno tipo 3; **timp1:** inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1; **mmp9:** metaloproteínasa 9; **tgf-β₁:** factor de crecimiento transformante beta 1; **p*≤0.05; ***p*≤0.01; n.s: no significativo.

7. NIVELES PLASMÁTICOS DE FÁRMACO

Se midieron las concentraciones plasmáticas en el grupo de ratones que recibió el fármaco NTB como tratamiento (**LAD+NTB**) 24h después de la última administración (día 15 postcirugía). Las concentraciones plasmáticas obtenidas se encontraban dentro de los rangos normales obtenidos en humanos ($C_{\text{máx. humanos}} = 20 - 30 \text{ ng/mL}$) (**266**), obteniendo un valor medio de **$26.02 \pm 7.70 \text{ ng/mL}$** , descartandose la presencia de una concentración excesivamente alta a ese tiempo.



DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La elevada morbilidad y mortalidad de las cardiopatías isquémicas en su mayoría se asocian a un proceso fibrótico que compromete la funcionalidad del corazón (23,116). Esto, sumado a la falta de fármacos específicos para el tratamiento de la fibrosis cardíaca, hacen urgente la necesidad de realizar investigaciones acerca de fármacos capaces de actuar sobre las distintas vías y células efectoras del proceso fibrótico con el objetivo de prevenir o evitar la progresión de la enfermedad.

En la presente Tesis Doctoral estudiamos la efectividad de cuatro fármacos con potencial efecto antifibrótico (PFD, CIL, NTB y LOS) en el territorio CV, de los cuales cabe destacar los resultados significativos obtenidos con el fármaco NTB que mostró efectos antifibróticos y, por tanto, beneficiosos, en el cultivo primario de CFs humanos al reducir la expresión de determinados genes y proteínas profibróticas, así como también fue capaz de inhibir el proceso de migración de los CFs. Sin embargo, los datos obtenidos en el modelo *in vivo* de generación de fibrosis mediante la inducción de un IM (modelo *LAD*) no fueron satisfactorios, ya que mostraron un aumento en la expresión de determinados genes profibróticos junto con un aumento en la concentración plasmática de troponina I, indicativo de daño cardíaco. Estos resultados demostraron un mecanismo complejo por parte del fármaco dependiendo del contexto en el cual nos encontremos (cultivo *in vitro* u organismo completo). Por otro lado, no se obtuvieron resultados significativos con los fármacos PFD, CIL y LOS.

Cabe recordar, que los CFs son los responsables de la producción y mantenimiento de la MEC, siendo las principales células efectoras de la fibrosis, junto con los MioFBs. Los CFs desempeñan un papel crucial en la respuesta al daño y al remodelado cardíaco y son objeto de estudio para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas (29,90,94,267). Es por ello, que son seleccionados como células diana para llevar a cabo los experimentos *in vitro* de

DISCUSIÓN

la presente Tesis Doctoral. El proceso fibrótico se inicia tras un estímulo patológico en el tejido cardíaco, siendo el estímulo TGF- β el regulador clave de este proceso, ya que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis tras sufrir un IM (25,34,268). En los CFs humanos primarios empleados en el presente trabajo, únicamente el estímulo TGF- β_1 fue capaz de producir cambios a nivel de la expresión génica y proteica de determinados marcadores involucrados en el proceso fibrótico, provocando su diferenciación a MioFBs, responsables del remodelado y de la formación del tejido cicatricial reparativo (29,108,113). Es por ello, que el TGF- β_1 fue seleccionado como estímulo profibrótico. Los estímulos Ang.II e hipoxia (1%O₂) no tuvieron efectos profibróticos significativos en los CFs humanos primarios empleados. Esto a pesar de que la Ang.II se ha relacionado con la patogénesis de la fibrosis cardíaca tanto en CFs murinos (269,270) como en humanos (271,272) promoviendo la hipertrofia a nivel cardíaco y vascular (54). El único gen [S100A4 (FSP1)] aumentado por la hipoxia, bajo nuestras condiciones experimentales, podría estar relacionado con la regulación de procesos inflamatorios o de remodelado del tejido, lo que podría tener implicaciones en las ECV (273). Ante los resultados obtenidos, cabe la posibilidad de que la respuesta tisular en células humanas sea distinta de las células de origen animal o, que los CFs humanos primarios empleados hayan generado una resistencia adaptativa frente al estrés inducido por estos estímulos, ya que las concentraciones empleadas y el tiempo de tratamiento establecido, son los adecuados para generar daño en modelos experimentales murinos (274–277).

Uno de los fármacos seleccionados y estudiados fue la pirfenidona, PFD, (Esbriet®, Pirespa®, Etuary®), un fármaco antifibrogénico y antiinflamatorio eficaz para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática y, actualmente, en investigación para su aplicación en otras enfermedades fibróticas, como el síndrome de Hermansky-Pudlak con fibrosis pulmonar asociada (278). Se trata de uno de los pocos fármacos que se encuentran en fase II de investigación

clínica para la fibrosis cardíaca (**Figura 19**). Estudios preclínicos existentes han demostrado que el fármaco PFD puede inhibir la fibrosis miocárdica y proteger al corazón. En el año 2022, se inició un ensayo clínico en pacientes que habían sufrido un IM, evaluándose el uso de este fármaco como tratamiento adicional al estándar para inhibir la fibrosis miocárdica en las áreas no afectadas por el infarto (NCT05531955). Sin embargo, a día de hoy, se desconocen datos acerca del ensayo. En fibroblastos pulmonares humanos y murinos, se ha demostrado que el fármaco PFD es capaz de reducir la inflamación al disminuir la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), el reclutamiento de células inflamatorias y la activación de fibroblastos, lo que resulta en un menor depósito de colágeno (**279,280**). Actualmente, se están llevando a cabo ensayos clínicos con el fármaco PFD para confirmar estos efectos en otros órganos, ya que se ha sugerido como una opción segura de tratamiento para retrasar o inhibir la progresión de las lesiones fibróticas y prevenir la formación de otras nuevas tras sufrir una lesión tisular (**281**). En CFs murinos, este fármaco es capaz de inhibir la expresión de α -SMA, impidiendo la diferenciación a MioFBs y contribuyendo al proceso fibrótico (**235**). También se han realizado ensayos en modelos experimentales murinos donde se ha demostrado que es capaz de inhibir la progresión de la fibrosis a nivel cardíaco (**215–218,282,283**), pero, actualmente se desconoce cómo actúa el fármaco PFD sobre los CFs humanos.

En el presente trabajo, tras validar que las concentraciones plasmáticas utilizadas no fueran tóxicas mediante un ensayo de viabilidad celular, los resultados obtenidos con el fármaco PFD no fueron muy alentadores. Así, no fue capaz de mostrar ningún efecto antifibrótico, ni antiinflamatorio ni antimigratorio en los CFs humanos primarios empleados, a excepción, de un efecto puntual sobre la expresión génica de *MMP9*, donde el fármaco PFD (0.085 mM) disminuyó significativamente la expresión de este gen. Esta metaloproteinasa, junto con la MMP2, destaca por su papel crítico en el remodelado cardíaco y en la degradación de la MEC, cuya desregulación

DISCUSIÓN

contribuye a procesos patológicos profibróticos en el corazón. Se ha demostrado en modelos animales de lesión cardíaca (284) y en pacientes con IC (285), que la expresión de MMP9 se incrementa, influyendo en los procesos de migración, diferenciación y secreción de citocinas (286) y, que, su eliminación atenúa el remodelado miocárdico en ratones (287), diferenciación y secreción de citocinas. A pesar de que existe una fuerte evidencia de que el fármaco PFD tiene efectos antifibróticos durante el remodelado cardíaco en diferentes estudios llevados a cabo en modelos experimentales, apenas existen estudios en CFs humanos aislados.

En el presente trabajo y bajo nuestras condiciones experimentales, el fármaco PFD mostró no ser un fármaco antifibrótico prometedor. No obstante, no podemos descartar que, en la respuesta fibrótica generada *in vivo*, pueda ejercer dichos efectos antifibrogénicos.

Otro de los campos investigados para el posible tratamiento de patologías cardíacas son los inhibidores de integrinas, unas proteínas involucradas en procesos celulares como la adhesión celular, el proceso de migración, la angiogénesis y la supervivencia (288). El fármaco cilengitide (CIL), es un inhibidor específico de las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ que inicialmente fue investigado como un posible tratamiento contra el cáncer (289), pero quedó relegado en fase III debido a la falta de eficacia contra los glioblastomas, investigándose más a fondo en enfermedades fibróticas (290,291). Las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ (ambas expresadas en el corazón), están involucradas en procesos como la angiogénesis, la migración de los CFs y en la fibrosis cardíaca, ya que son capaces de activar el factor profibrótico, TGF- β (231,236,292). En un modelo porcino de fibrosis ventricular derecha (ligadura bilateral de las venas pulmonares) y en condiciones de cultivo profibróticas (presencia TGF- β_1) empleando CFs ventriculares (ventrículo derecho) humanos primarios, estas integrinas promueven la diferenciación de los CFs a MioFBs (236). Al bloquearlas, se interfiere en la

señalización y los mecanismos que conducen al proceso fibrótico ya que las integrinas que median la interacción entre los CFs y la MEC, inhiben la activación del TGF- β y son capaces de disminuir la migración y la proliferación de los CFs hacia zonas lesionadas del corazón, lo que podría frenar la acumulación de colágeno y la rigidez del tejido cardíaco, tal y como se ha demostrado en modelos experimentales murinos (290,292–294). En modelos de rata donde se ha empleado la doxorubicina (antitumoral que genera cardiotoxicidad) para inducir fibrosis cardíaca, se ha demostrado que el fármaco CIL es capaz de ejercer un efecto cardioprotector contra la fibrosis y mejorar la función cardíaca al bloquear las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$, así como también el TGF- β_1 (230).

En el presente trabajo, donde se han empleado CFs humanos primarios (no específicamente ventriculares), y tras demostrar que las concentraciones empleadas no generaban toxicidad, se observó que el fármaco CIL no mostró ningún efecto antifibrótico, ni antiinflamatorio ni antimigratorio. No obstante, consideramos la necesidad de estudiar los efectos de ambos fármacos (PFD y CIL), en modelos *in vivo* de fibrosis basado en la ligadura (LAD), para investigaciones futuras.

El fármaco NTB (Ofev®, Vergatef®) pertenece a la familia de los inhibidores de tirosina quinasa y está aprobado para el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática y otras enfermedades fibrosantes, por sus efectos antifibróticos y antiinflamatorios (295,296). Además de sus aplicaciones a nivel pulmonar, se encuentra en fase II-III de desarrollo clínico para varios tipos de cánceres debido a sus propiedades antiangiogénicas (NCT00805194, NCT00806819 y NCT01015118). Existen estudios experimentales llevados a cabo en modelos animales donde se ha demostrado el posible efecto beneficioso de otros fármacos inhibidores de la tirosina quinasa sobre la fibrosis cardíaca, entre ellos el desatinib (297) y el imatinib (298). El fármaco NTB actúa inhibiendo varios receptores de tirosina quinasa (VEGFR, FGFR, PDGFR) involucrados en el proceso

DISCUSIÓN

de angiogénesis y en la proliferación celular, sobre todo, de los fibroblastos (299,300). Actualmente, se está investigando su aplicación para otras enfermedades fibróticas con afectación en otros órganos, entre ellos el corazón (225,226) (Figura 19). Dado que aún se desconoce el efecto antifibrótico de este fármaco a nivel cardíaco, existen estudios en modelos experimentales realizados en ratas hipertensas donde se ha demostrado su efecto beneficioso al reducir significativamente la fibrosis en el ventrículo derecho, sugiriendo un beneficio sobre la función cardíaca en condiciones de hipertensión pulmonar (226).

En el presente trabajo y, tras demostrar que el fármaco NTB no generó efectos tóxicos sobre los CFs humanos primarios a ninguna de las concentraciones empleadas (0.02 y 2 μ M), se observó que, únicamente la concentración de 2 μ M fue capaz de mostrar efectos significativos en los CFs humanos primarios empleados. El fármaco por sí mismo fue capaz de reducir la expresión de genes que constituyen la MEC (*COL1A1*, *COL3A1* y *FN1*) y genes involucrados en diversos procesos fibróticos celulares (*CDH2*, *TGF- β_1* y *PDGFR α*), resultando beneficioso ya que la producción y secreción de colágeno es un evento crítico que confiere rigidez a los tejidos. Además, el fármaco NTB fue capaz de normalizar la expresión de determinados genes profibróticos incrementados por el TGF- β_1 (condiciones estimuladas), tales como [*COL1A1*, *ACTA2* (α -SMA), *CDH2* (N-cadherina)] y revertir la expresión de *MMP9*. Estos resultados van en concordancia con los resultados publicados en fibroblastos pulmonares humanos, donde empleando concentraciones de 1 μ M de NTB se redujo la expresión de estos marcadores, estimulados por el TGF- β_1 (226,240). Además, el hecho de que, bajo nuestras condiciones experimentales, el fármaco NTB tuviera la capacidad de revertir la expresión génica de *MMP9* en el cultivo primario de CFs humanos en presencia del TGF- β_1 , indica que estaría reduciendo la degradación de la MEC y posiblemente controlando la inflamación generada y el remodelado patológico, lo cual resulta beneficioso en el proceso de fibrosis (301).

Además, los resultados obtenidos en la disminución de la expresión de *CDH2* (N-cadherina), sugiere una menor activación de los CFs humanos primarios y, por tanto, una menor actividad de estos. La N-cadherina se trata de una proteína clave en las uniones adherentes entre células, siendo crucial en la regulación de procesos celulares como la adhesión, la señalización intracelular y la mecano-transducción, todos ellos importantes para la migración de los CFs (302,303). Si las uniones mediadas por la N-cadherina se ven alteradas, podría favorecerse un entorno de desorganización tisular y promover una mayor activación de los MioFBs, lo que agravaría el proceso fibrótico (304). Al estar involucrada en los procesos de mecano-transducción, su reducción por parte del fármaco NTB puede hacer que el tejido se vuelva más susceptible a las lesiones y empeorar el remodelado patológico, con lo que su disminución sería perjudicial, pudiendo exacerbar la fibrosis en algunos casos. Por tanto, una reducción a la baja de esta molécula no siempre tiene efectos beneficiosos para el proceso fibrótico. Además, esta reducción en la expresión de N-cadherina, junto con la reducción en la mayoría de las vías profibróticas inducidas por el NTB, también explicaría el resultado obtenido en el ensayo funcional de migración celular donde pudimos demostrar, en el presente trabajo, que el fármaco NTB impidió la migración de los CFs humanos primarios evitando el progreso de la fibrosis reactiva y el remodelado patológico del tejido cardíaco. En definitiva, dependiendo del contexto patológico, la reducción de *CDH2* (N-cadherina) podría significar una mejora en la función cardíaca, pero no queda claro si su reducción en los CFs podría afectar a la estabilidad del tejido.

En el proceso de migración, los receptores PDGFR son fundamentales durante el proceso de reparación tisular y en la fibrosis. Los receptores PDGFR α y PDGFR β juegan roles críticos y complementarios en el proceso de migración celular. Por un lado, el PDGFR α está más implicado en la migración de células mesenquimales y fibroblastos, con especial relevancia en el proceso de cicatrización y en el desarrollo; mientras que, el PDGFR β regula principalmente

DISCUSIÓN

la migración de células vasculares y fibroblastos asociados a la formación de vasos sanguíneos y a la fibrosis. En los CFs humanos primarios empleados en el presente trabajo, el fármaco NTB fue capaz de actuar sobre dichos receptores, reduciendo la expresión génica de *PDGFRα* y aumentando la expresión de *PDGFRβ*. La disminución de *PDGFRα* suele estar asociada a una reducción en la activación de MioFBs y, por tanto, una reducción en la secreción de la MEC y fibrosis (305), ya que estaría logrando inhibir las vías de señalización claves en la migración y, posiblemente, en la formación de una fibrosis reactiva, evidenciando su resultado obtenido en el proceso de migración celular. Mientras que el aumento de *PDGFRβ* podría reflejar un mecanismo compensatorio por parte de los CFs con el objetivo de mantener su capacidad de proliferación o migración. Con estos resultados obtenidos, se podría indicar que el fármaco NTB previene de manera significativa el exceso de MEC y el daño generado ejerciendo un potencial efecto antifibrótico sobre el cultivo primario de CFs humanos empleado.

Sin embargo, es de destacar el aumento significativo e inesperado obtenido en el cultivo primario de CFs humanos empleado en el presente trabajo causado por el propio fármaco y en condiciones estimuladas (presencia de $TGF-β_1$), de la expresión génica de *S100A4* (FSP1) y *ACTA2* ($α$ -SMA), ambos considerados como marcadores profibróticos relacionados con la activación de los CFs. Estos resultados podrían indicar que el fármaco NTB podría no ser completamente antifibrótico en el cultivo primario de CFs humanos empleado, o bien es posible que el fármaco esté inhibiendo otras funciones importantes de estas células contrarrestando la disminución de otros genes profibróticos que sí han sido reducidos por el propio fármaco (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *CDH2*, $TGF-β_1$).

Debido a la escasez de estudios realizados en CFs humanos primarios se dificulta la explicación de este efecto, ya que existen estudios realizados en fibroblastos pulmonares humanos, donde el fármaco NTB (1 $μ$ M) atenuó la diferenciación a

MioFbs ($\downarrow\alpha$ -SMA) impulsada por el estímulo TGF- β_1 (240), resultado opuesto al obtenido en el presente trabajo. Es de destacar que las células empleadas para la realización de la presente Tesis Doctoral proceden de un órgano distinto (corazón vs. pulmón), y que la diferenciación a MioFBs puede resultar diferente dependiendo del tejido. Respecto al *S100A4* (FSP1), un aumento en la expresión podría reflejar un intento del tejido cardíaco de compensar la inhibición de la fibrosis, activando los CFs a través de otras vías (306,307). Es por ello por lo que, dependiendo del contexto patológico, el aumento en *S100A4* puede tener un papel dual dependiendo de los mecanismos específicos involucrados y el entorno celular.

Por lo que respecta al proceso inflamatorio éste se encuentra estrechamente relacionado con el proceso de fibrosis. Respecto a los marcadores proinflamatorios, el fármaco NTB se comportó de forma dual a nivel tisular y sistémico. En el cultivo primario de CFs humanos empleados en el presente trabajo, el propio fármaco ejerció un efecto proinflamatorio aumentando significativamente la expresión génica de *IL-6*, viéndose revertido en condiciones estimuladas (presencia TGF- β_1). Cabe señalar que, en el contexto inflamatorio, el TGF- β_1 puede tener un comportamiento dual dependiendo del contexto celular y de la vía de señalización implicada. En situaciones de inflamación crónica o fibrosis, el TGF- β_1 puede activar vías que inducen la expresión de citocinas proinflamatorias, como la *IL-6* y el *TNF- α* , a través de células residentes como los CFs y las células epiteliales, exacerbando la inflamación y el daño tisular mediante rutas como JAK/STAT y MAPK. Por otro lado, en procesos de curación de heridas y regulación inmunitaria, el TGF- β_1 puede actuar como un factor antiinflamatorio, regulando la proliferación celular y limitando la inflamación, especialmente mediante la vía SMAD (308). La *IL-6* es una de las principales citocinas implicadas en la inflamación tanto aguda como crónica y, se ha demostrado que sus niveles circulantes están asociados con una mayor morbilidad y mortalidad en el IM agudo y crónico, así como también se ha

DISCUSIÓN

demostrado en modelos experimentales de IM llevados a cabo en animales (309,310). La IL-6 está involucrada en la fisiopatología del IM y en el remodelado cardíaco, pero su papel en el proceso de adaptación ventricular a largo plazo es discutido. Algunos estudios sugieren que la inhibición de esta citocina no afecta ni al tamaño del infarto, ni al remodelado, ni a la función ventricular, ni a la mortalidad a largo plazo en modelos experimentales de IM. Esto sugiere que la IL-6 podría no ser determinante en el remodelado ventricular prolongado (309). Pero es de señalar que, si sus niveles aumentan, podría agravar la inflamación en tejidos afectados, lo que resultaría contraproducente en enfermedades donde la fibrosis y la inflamación ya son problemáticas de por sí. Por tanto, el hecho de que el fármaco sea capaz de aumentar esta citocina, bajo nuestras condiciones experimentales, podría resultar ser perjudicial. En otros tipos celulares, sobre todo, en fibroblastos pulmonares, se ha demostrado que el fármaco NTB es capaz de reducir mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-6) y regular la respuesta del sistema inmune (300,311), pero es importante destacar que estamos ante tipos celulares distintos (pulmonares vs. cardíacos). Sin embargo, en nuestro cultivo primario de CFs humanos, el fármaco NTB por sí mismo provocó un aumento de las moléculas de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1. Además, estos efectos se vieron potenciados de manera significativa por la administración conjunta con el estímulo proinflamatorio, TNF- α , en los CFs humanos. Por el contrario, a nivel sistémico, el fármaco fue capaz de revertir el aumento de la expresión inducido por TNF- α de la molécula de adhesión leucocitaria, Mac-1, únicamente en la población de monocitos. La reducción de su expresión sugiere que el fármaco NTB podría inhibir la activación de monocitos, traducándose en una menor migración de estas células al tejido cardíaco, reduciendo así la inflamación local. Esta dualidad presentada por el fármaco NTB podría suponer que, a pesar de haber menos monocitos circulantes activados (efecto antiinflamatorio a nivel sistémico), el tejido cardíaco puede seguir

experimentando inflamación debido a una mayor adhesión de otras células leucocitarias, lo que podría contribuir al daño en el tejido o al remodelado CV.

En definitiva, bajo nuestras condiciones experimentales, pudimos observar algunos de los efectos antifibróticos descritos del fármaco NTB para otras patologías (sobre todo, la fibrosis pulmonar idiopática). Es por ello por lo que realizamos estudios complementarios en un modelo *in vivo*.

Por último, otro de los fármacos estudiados fue el LOS, un fármaco ampliamente estudiado en el campo de las ECV perteneciente a la familia de los ARA-II indicado por las guías clínicas actuales para pacientes con HTA y en pacientes con IC (dosis recomendada: 150 mg/día). En estudios clínicos se ha demostrado que el fármaco es capaz de reducir la sobrecarga de presión al inhibir el SRAA e impedir los efectos de la Ang.II, ya que actúa bloqueando el receptor AT-1 (presente en las células vasculares y cardíacas) (312). El bloqueo del receptor AT-1 ha demostrado tener efectos significativos sobre los CFs y en la reducción de la fibrosis cardíaca. Esta acción inhibe la activación de vías profibróticas esenciales, como ERK1/2, MAPK y TGF- β /SMAD, las cuales son fundamentales para la proliferación de CFs y la producción de colágeno (tipo I y tipo III), así como de otros componentes de la MEC cardíaca, como la FN1 (313). Investigaciones realizadas en modelos experimentales murinos han evidenciado que LOS disminuye el estrés del retículo endoplásmico en células cardíacas y renales, lo que contribuye a mitigar el daño celular y la fibrosis (314). Además, inhibe la secreción de factores de crecimiento (TGF- β_1), y citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), creando un entorno menos propenso a la inflamación crónica y a la fibrosis en el tejido cardíaco (315). Asimismo, también se ha descrito que el fármaco LOS es capaz de afectar al proceso de migración de los CFs, lo cual puede influir en el proceso de reparación y cierre de las heridas en el tejido cardíaco. Al bloquear el receptor AT-1 se inhiben ciertos efectos de la Ang.II como la proliferación, migración y activación de los CFs, lo cual resultaría beneficioso en

DISCUSIÓN

el contexto de remodelado patológico o fibrosis, tal y como se ha demostrado en otros modelos experimentales de fibrosis (**316,317**). También ha demostrado prevenir el desarrollo de fibrosis inducida por ejercicio intenso prolongado, reducir la rigidez y el engrosamiento del ventrículo izquierdo, así como también atenuar la hipertrofia y fibrosis ventricular en casos de miocardiopatía hipertrófica (**318–320**). En conjunto, estos hallazgos subrayan el potencial efecto del fármaco LOS no solo como un fármaco antihipertensivo que reduce la sobrecarga cardíaca, sino también como un agente antifibrótico efectivo capaz de modular respuestas celulares y moleculares clave en diversas enfermedades cardíacas y prevenir la progresión de la fibrosis y el daño estructural del miocardio.

A pesar de haber resultados beneficiosos publicados sobre este fármaco, cabe señalar que la mayoría de ellos se han obtenido en modelos experimentales murinos y, que la escasa información publicada sobre los efectos en los CFs humanos aislados dificulta la comprensión sobre este tipo celular. En el presente trabajo y, tras demostrar que las concentraciones empleadas de fármaco no eran tóxicas, no se observó ningún efecto antifibrótico, ni antiinflamatorio ni antimigratorio que pudiera apuntar a ser utilizado como un fármaco útil para el tratamiento de la fibrosis cardíaca. Es posible que su efecto sea más a nivel sistémico y en los CFs aislados no responda a esta vía de señalización debido a que necesita otro tipo celular para llevar a cabo su efecto, al igual que en el caso de la señalización de Ang.II, que no fue capaz de responder en los CFs humanos primarios cuando se quiso caracterizar el estímulo profibrótico para inducir daño en estas células. A pesar de la ausencia de resultados en célula aislada (CFs primarios humanos), se seleccionó para estudiar sus efectos en un modelo *in vivo* porque es un fármaco ampliamente utilizado en la clínica en pacientes con IC y no podemos descartar un efecto farmacológico.

Tras los resultados obtenidos en el cultivo primario de CFs humanos, los fármacos NTB y LOS fueron los estudiados en el modelo *in vivo* de IM basado en la ligadura transitoria de la arteria coronaria (*LAD*), seguido de un período de reperfusión, con el objetivo de generar fibrosis en el tejido cardíaco y, desde una perspectiva clínica, emular el escenario clínico de un paciente con estas características. Dado que la mayoría de los infartos en humanos reciben algún tipo de tratamiento de reperfusión, este modelo es más relevante clínicamente para simular eventos isquémicos que reciben intervención temprana (321).

El modelo de IM llevado a cabo en este estudio es altamente agresivo y requiere un manejo especializado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Presenta limitaciones importantes, como la posición de la ligadura (322) y el tiempo de isquemia (249), los cuales son factores críticos que determinan tanto el tamaño de la lesión como la tasa de supervivencia (323). No obstante, un desafío crítico en este modelo es la aparición de arritmias letales, como la taquicardia o la fibrilación ventricular, especialmente durante o después de la reperfusión, las cuales afectan significativamente a la supervivencia. En nuestra experiencia, la mortalidad obtenida tras 14 días postinfarto fue significativa (33.33% *LAD+vehículo* vs. 0% *SHAM*), siendo críticos los primeros 2-3 días postcirugía. Esta observación es consistente con la severidad del modelo de generación de IM, ya que induce un daño cardíaco considerable. A pesar de la mortalidad, cabe mencionar que los modelos de oclusión transitoria proporcionan una mayor supervivencia que los de oclusión permanente debido a la menor extensión de daño tisular y al potencial de recuperación tras la reperfusión. Respecto a los fármacos empleados en el modelo, las dosis de NTB (30-50 mg/kg/día) han mostrado eficacia y seguridad en estudios de fibrosis pulmonar y cáncer en protocolos de 28 días de duración (295,311). Mientras que el fármaco LOS, se ha empleado en modelos de ratones para estudiar efectos en las ECV a las dosis seguras de 10-30 mg/kg/día (314,324). Teniendo en cuenta dichas consideraciones, las dosis administradas a los ratones fueron seguras

DISCUSIÓN

durante el tiempo del estudio. Tras el tratamiento y durante los 14 días de procedimiento, la pérdida de peso debido al estrés quirúrgico fue recuperándose progresivamente en todos los animales, pero es de señalar que los ratones pertenecientes al grupo **LAD+NTB** se mostraron más débiles y tardaron más tiempo en recuperarse que el resto de los grupos experimentales. Es posible que esta debilidad esté relacionada con una falta de apetito provocada por el propio fármaco (reacción adversa), aumentando la tasa de mortalidad observada en este grupo experimental (50% mortalidad) (**325,326**). De hecho, los ratones pertenecientes al grupo NTB mostraron un peso del corazón ligeramente menor que el resto de los grupos experimentales y, presentaron un aspecto deforme y rugoso, perdiendo la morfología de un corazón normal.

El modelo *in vivo* de IM llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral provocó un aumento significativo en la infiltración leucocitaria (tinción eosina-hematoxilina), lo cual es consistente con estudios publicados donde se demuestra una infiltración temprana tras sufrir un IM (**327**). Asimismo, también se observó un aumento en el depósito de colágeno (tinción “*Sirius Red*”) en el tejido cardíaco de los ratones que estuvo en concordancia con un aumento significativo en la expresión de determinados genes profibróticos como el *col1a1*, *col3a1*, *fn1*, *timp1*, *s100a4* (FSP1) y *tgf-β₁* en el grupo **LAD+vehículo**, sugiriendo un proceso fibrótico activo en el tejido cardíaco. También se observó una reducción significativa en el proceso de proliferación celular, lo que indica una menor capacidad regenerativa del tejido en respuesta al daño, debido a la limitada proliferación de las células cardíacas tras 14 días postinfarto. Este resultado obtenido era esperable puesto que, debido a la muerte de los cardiomiocitos y a la formación de la cicatriz fibrótica (fibrosis reparativa o de reemplazo típica tras un IM), el tejido se vuelve disfuncional y las células dejan de proliferar debido a su estado necrótico. Es de destacar que la disminución de la proliferación fue más acentuada en la zona infartada que en las zonas remotas al infarto, lo cual era esperable dado el carácter fibrótico y disfuncional de las

células en las áreas más gravemente dañadas. Esta disminución en la proliferación celular observada en el grupo **LAD+vehículo** vino acompañado de una ligera tendencia al alza del proceso de angiogénesis en el tejido cardíaco. La angiogénesis es un proceso fundamental para mantener el suministro de oxígeno y nutrientes al tejido dañado, ya que la formación de nuevos vasos contribuye a la supervivencia de los cardiomiocitos y a la preservación de la viabilidad del tejido cardíaco afectado. En un tejido fibrótico, donde la proliferación celular se encuentra disminuida, el aumento de la expresión de CD31 (es decir, de vasos CD31 positivos) indica que el organismo intenta aumentar el flujo sanguíneo en estas áreas para mitigar la hipoxia inducida por la isquemia y reducir el estrés en las células cardíacas aún funcionales. En nuestro modelo de IM llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral, observamos un aumento en el número de vasos positivos para CD31, lo que indicaría una mayor vascularización en la zona infartada. En el contexto de un IM, este resultado podría reflejar un intento de reparación o angiogénesis en áreas dañadas, aunque la capacidad proliferativa se encuentra disminuida y sugiere que la regeneración es limitada y probablemente insuficiente para una completa reparación del tejido. En un estudio donde se determinó la expresión de vasos CD31 positivos en un modelo murino de IM demostraron que a partir del día 4 postinfarto, la expresión de CD31 se incrementó (328).

A nivel sistémico, se analizaron los biomarcadores plasmáticos cardíacos como la troponina I, el péptido BNP (329) y la GAL-3 (330), todos ellos utilizados para evaluar la función cardíaca, en particular en el contexto de la IC y el daño en el miocardio. Tras el análisis, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los biomarcadores analizados entre los grupos **SHAM** y **LAD+vehículo** tras 14 días de procedimiento lo que sugiere que, a nivel sistémico, los marcadores plasmáticos de daño cardíaco se han normalizado y el proceso patológico se ha cronificado. Esto podría sugerir que, aunque el daño inicial inducido por la cirugía realizada fue considerable (no lo pudimos observar), los niveles plasmáticos de

DISCUSIÓN

lesión miocárdica se estabilizaron con el tiempo, alcanzándose los valores basales.

A pesar de que ambos fármacos poseen propiedades antiinflamatorias descritas, el tratamiento con los fármacos NTB (**LAD+NTB**) y LOS (**LAD+LOS**), no modificaron los parámetros de infiltración leucocitaria, pudiendo indicar que la inflamación ocasionada tras el IM inducido es resistente a los mecanismos de acción de los fármacos empleados, o que la dosis y/o tiempo de tratamiento no fueron suficientes para lograr el efecto deseado en el animal de experimentación. A pesar de que la infiltración leucocitaria es esencial para iniciar el proceso de eliminación de células dañadas y el proceso de cicatrización, este resultado obtenido resulta alarmante ya que una inflamación excesiva puede provocar un daño tisular y un peor pronóstico en el contexto del IM, contribuyendo a la disfunción cardíaca crónica (31). De hecho, el NTB (**LAD+NTB**), en contra de mejorar, mostró un aumento en la infiltración leucocitaria, acompañado de un incremento significativo en la expresión génica de *il-6* con respecto a grupo **LAD+vehículo**, sugiriendo que podría agravar el proceso inflamatorio en el tejido cardíaco, indicando que el tratamiento con el fármaco NTB no favorece un ambiente de resolución inflamatoria o reparación tisular efectiva. La IL-6 es una citocina que, tras sufrir un IM, se regula positivamente, demostrándose mediante estudios *in vivo* que la pérdida de esta citocina puede ser importante para la curación del IM, ya que se atenúa el proceso inflamatorio (309). El resultado obtenido en el presente trabajo sugiere que podría estar agravando la respuesta inflamatoria como consecuencia de una interferencia con las vías implicadas en el proceso de reparación tisular perpetuando el daño en el corazón. Este aumento obtenido en la expresión de *il-6* en el tejido cardíaco del ratón, también se obtuvo cuando se trataron los CFs humanos primarios con el fármaco NTB, junto con un aumento en las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Por lo que respecta al depósito del colágeno aumentado tras el procedimiento quirúrgico (**LAD+vehículo**), este no se vio

modificado tras el tratamiento farmacológico. De hecho, el grupo tratado con el fármaco NTB (**LAD+NTB**) mostró un depósito de colágeno ligeramente aumentado en comparación con el grupo **LAD+vehículo**. Este resultado, al igual que en el proceso inflamatorio, sugiere que el fármaco NTB podría estar agravando el remodelado fibrótico, posiblemente al interferir con vías moleculares involucradas en la reparación del tejido cardíaco, mostrando una correlación positiva y significativa entre ambos parámetros (inflamación vs. fibrosis). Dicho resultado fue reforzado por un incremento significativo en la expresión de genes clave que conforman y regulan la MEC, como *col1a1*, *fn1*, y *timp1*, sugiriendo que el fármaco NTB podría estar promoviendo un aumento en el depósito de proteínas de la MEC al inhibir la degradación del colágeno ($\downarrow timp1$) (331).

Actualmente, existen escasos estudios publicados sobre la indicación del fármaco NTB para el tratamiento de la fibrosis cardíaca. De hecho, un estudio publicado recientemente (año 2021) ha demostrado los efectos antifibróticos y antiinflamatorios del fármaco NTB en el tejido cardíaco, además de mejorar la función del corazón, sugiriendo un potencial efecto protector sobre el miocardio (225). Dado que este fármaco ya está aprobado para el tratamiento de otras enfermedades fibróticas (sobre todo, a nivel pulmonar), su eficacia en el remodelado cardíaco patológico respalda su posible reposicionamiento para otras condiciones como la ICfEp o la fibrosis postinfarto. Cabe señalar que en el estudio mencionado se usó un modelo de generación de fibrosis (modelo TAC) distinto al realizado en la presente Tesis Doctoral (modelo LAD), lo cual podría suponer que el fármaco NTB actúe a través de diferentes vías antifibróticas, según el modelo utilizado para generar daño a nivel cardíaco, ya que el tipo de fibrosis generada es distinto según el estímulo o daño que inicia el proceso fibrótico (isquemia, HTA, diabetes, etc.).

DISCUSIÓN

Tampoco se observaron efectos beneficiosos en los procesos de proliferación y angiogénesis en el tejido cardíaco tras 14 días de tratamiento con los fármacos NTB y LOS. Esto sugiere que, tras el tiempo de tratamiento, el daño generado ha sido tan grande que los fármacos fueron insuficientes para revertirlo. Una de las limitaciones atribuibles a este resultado obtenido es que se realizaron mediciones a punto final (día 15 postinfarto), cuando el tejido está fibrótico y el proceso de cicatrización ya está resuelto. Se sugiere realizar dichas determinaciones a diferentes tiempos tras inducir el IM para valorar el grado de proliferación, ya que este proceso es particularmente relevante en las fases iniciales de la cicatrización, donde hay actividad celular significativa para reparar el tejido.

A pesar de no haber tenido aumentos en los biomarcadores plasmáticos de daño cardíaco en el grupo sometido al procedimiento quirúrgico (**LAD+vehículo**), el grupo experimental **LAD+NTB** aumentó significativamente los niveles de troponina I tras 14 días de tratamiento, lo que podría sugerir que el fármaco NTB podría estar asociado con un mayor daño miocárdico en los ratones, lo cual podría ser un dato preocupante dada la función de la troponina I cardíaca como indicador de necrosis celular en el corazón (**332**). Este biomarcador se libera al torrente sanguíneo cuando hay daño en el músculo cardíaco (daño en los cardiomiocitos), especialmente en situaciones de lesión o estrés, como ocurre en el IM (**333**). En este contexto y, bajo nuestras condiciones experimentales, un aumento en la troponina I inducido por el fármaco NTB indicaría que podría estar generando efectos adversos en el corazón de manera directa (cardiotoxicidad), o a mecanismos relacionados con la inflamación y estrés oxidativo. La troponina I guarda una estrecha relación con la *mmp9*, ya que este también es importante en el contexto de daño y reparación cardíaca, especialmente tras un IM. Un aumento simultáneo de troponina I y *mmp9* (correlación) podría indicar un daño extenso que no solo afecta el tejido miocárdico, sino que también desencadena un remodelado que puede empeorar la función cardíaca a largo plazo (**Tabla 27**).

En el presente trabajo, el tratamiento con el fármaco NTB podría no estar reduciendo eficazmente la activación de *mmp9*, tal y como se observó en los resultados obtenidos mediante qPCR en el tejido cardíaco de ratón, lo que implica que, a pesar del tratamiento, la respuesta inflamatoria y el remodelado tisular continúan activas. Por el contrario, el resto de los biomarcadores plasmáticos no se vieron modificados tras el tratamiento con los fármacos NTB y LOS.

Ante los resultados obtenidos con respecto al tratamiento con el fármaco NTB (**LAD+NTB**) en el modelo *in vivo*, se sospechó de un posible efecto cardiotoxico del fármaco. Para ello, se determinaron las concentraciones plasmáticas en los ratones una vez finalizado el período de administración del fármaco (día 15 postinfarto), obteniendo valores dentro del rango normal de concentraciones plasmáticas (266). No obstante, cabe señalar que, aunque las concentraciones plasmáticas estaban dentro del rango terapéutico, no se puede descartar que el propio mecanismo de acción del fármaco pueda estar contribuyendo a los efectos negativos observados. También cabe considerar que la medición de los niveles plasmáticos de fármaco fue tomada únicamente a punto final, desconociéndose si en cualquier otro momento los valores plasmáticos pueden haber superado la concentración mínima tóxica y encontrarse fuera del rango terapéutico.

Por todo ello, la fibrosis cardíaca es una respuesta fisiopatológica a diversos estímulos de daño que, hoy en día, no tiene terapias farmacológicas dirigidas comercializadas directamente sobre las vías y células efectoras de este proceso. La dificultad de desarrollar fármacos específicos para el tratamiento de la fibrosis cardíaca radica en que muchos fármacos que inhiben la fibrosis también pueden afectar a la actividad normal de los CFs que son esenciales para la función estructural del corazón. Si estas células se inhiben de manera excesiva, pueden debilitar la estructura del tejido cardíaco, aumentando el riesgo de disfunción

DISCUSIÓN

cardíaca y arritmias. Por otro lado, alcanzar el tejido cardíaco de manera eficaz es otro desafío, ya que el corazón tiene una red vascular densa y activa. La administración de un fármaco debe asegurar que alcance de manera precisa las áreas de fibrosis sin interferir con otras áreas del corazón que están funcionando adecuadamente. Además, la fibrosis cardíaca puede variar según la enfermedad subyacente. Esto implica que un enfoque único podría no ser eficaz en todos los tipos de fibrosis cardíaca. Y, por último, faltan modelos preclínicos específicos, tanto animales como celulares, donde no siempre se reproducen los procesos de fibrosis humana en el corazón, lo cual se dificulta bastante el hecho de poder evaluar la efectividad de los fármacos. Es por todo ello, la dificultad de desarrollar fármacos efectivos contra la fibrosis cardíaca.

Hoy en día, el fármaco LOS es uno de los fármacos recomendados por las guías clínicas actuales (208) empleado para el tratamiento de la IC debido a su capacidad para reducir la presión arterial, prevenir el remodelado y el engrosamiento del músculo cardíaco y, disminuir la inflamación y el estrés oxidativo, pudiendo reducir el riesgo de fibrilación auricular en pacientes con HTA y diabetes. Estos efectos en conjunto lo convierten en un fármaco clave para mejorar la salud CV y prevenir complicaciones en enfermedades cardíacas y vasculares. A pesar de la existencia de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde demuestran el beneficio del fármaco LOS sobre la fibrosis cardíaca en diversos modelos experimentales (318,324,334,335), es de destacar que existen escasos estudios donde han comprobado los efectos del fármaco en el modelo LAD de generación de IM, así como en CFs humanos primarios. De los escasos estudios *in vivo* publicados, cuatro de ellos están realizados en rata y, en todos ellos no se concluye el beneficio postinfarto del fármaco, sugiriendo más estudios. Está demostrado que el fármaco LOS muestra beneficios frente a la protección CV tras sufrir un IM, pero su efectividad depende del momento de administración y la dosis (336). Bajo nuestra experiencia y empleando el modelo LAD en ratones, no pudimos demostrar que el fármaco LOS fuese efectivo para

el tratamiento de la fibrosis cardíaca tras generarse un daño agudo en el tejido cardíaco. Es de mención comentar, que el modelo *in vivo* empleado para inducir fibrosis en la presente Tesis Doctoral exhibe una fibrosis de reemplazo o reparativa típica tras sufrir un IM. Este tipo de fibrosis generada es distinto a la fibrosis generada por estímulos más crónicos como es el caso de pacientes con HTA. La acción de fármacos potencialmente antifibróticos como es el caso del fármaco LOS, no tiene por qué ser la misma en estos dos escenarios y es posible que el modelo de fibrosis seleccionado en el presente trabajo sea demasiado agudo para observar los efectos propios del fármaco.

Respecto al fármaco NTB, al tratarse de un fármaco indicado para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, existen escasos estudios donde evalúen su efecto sobre CFs humanos primarios. Asimismo, los resultados obtenidos en el presente trabajo con el fármaco NTB no mostraron ser claros. En un primer momento, los resultados obtenidos en el cultivo primario de CFs humanos llegaron a demostrar su posible efecto antifibrótico, obteniendo resultados prometedores en cuanto a la reducción de determinados genes profibróticos, así como también en los ensayos de migración, tal y como se llegó a demostrar en algunos estudios publicados realizados en otro tipo celular (226,240,242,337). Pudimos demostrar su posible capacidad de reducción en la expresión de determinadas moléculas de adhesión implicadas en el proceso inflamatorio (Mac-1), sobre todo, en la población de monocitos. Pero dicho resultado no fue concluyente ya que también se obtuvo aumentos significativos en la expresión de las moléculas ICAM-1 y VCAM-1 en los CFs, implicadas en procesos de adhesión celular y cuyo aumento resulta contraproducente si se busca reducir la inflamación. Sin embargo, el estudio realizado en el modelo *in vivo* no mostró el mismo beneficio, obteniéndose resultados completamente contradictorios, llegando incluso a ser perjudiciales en la supervivencia de los animales de experimentación. Cabe señalar que los experimentos *in vitro* llevados a cabo en el cultivo primario de CFs humanos no reproducen exactamente una situación de fibrosis aguda

DISCUSIÓN

generada por la falta de oxígeno (isquemia) como es el caso del modelo *in vivo*, donde se forma un colágeno de reemplazo con el objetivo de formar una cicatriz que evite la ruptura cardíaca. Esto podría justificar la dualidad entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, ya que no se reproducen exactamente los mismos escenarios.

A pesar de la escasez de estudios acerca del efecto del fármaco NTB sobre la fibrosis cardíaca, existe un estudio publicado realizado en un modelo *in vivo* en el que se evalúa la posible aplicación de este fármaco sobre el proceso de fibrosis cardíaca inducido por HTA (modelo TAC), demostrando sus efectos beneficiosos en el contexto de las enfermedades cardíacas al frenar el avance de la fibrosis y el remodelado en el corazón (225). Sin embargo, no existen estudios donde evalúen el efecto de dicho fármaco sobre la fibrosis cardíaca inducida por el modelo LAD, siendo este estudio el primero de todos. Es por ello, que a pesar de haber obtenido resultados poco concluyentes acerca de la posible utilización del NTB como fármaco con capacidad antifibrótica a nivel cardíaco, existen investigaciones donde se estudia el posible reposicionamiento del fármaco como opción terapéutica para manejar el remodelado cardíaco patológico y mejorar los resultados en pacientes con disfunción cardíaca (Figura 19).

Adicionalmente, a pesar de todos los factores mencionados anteriormente que dificultan el desarrollo de fármacos con potencial antifibrótico a nivel cardíaco, se sugieren más estudios para la búsqueda de dianas ‘específicas’ para cada tipo de fibrosis, puesto que se trata de un proceso bastante complejo y muy variable dependiendo del estímulo desencadenante, del tejido u órgano y de la propia especie afectada.



CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. En la caracterización de la respuesta fibrótica en los cardiofibroblastos humanos primarios, de los tres estímulos profibróticos seleccionados (TGF- β_1 , Ang.II e hipoxia), únicamente el **estímulo TGF- β_1** incrementó la expresión de genes profibróticos [*COL1A1*, *COL3A1*, *ACTA2* (α -SMA), *CDH2* (N-cadherina) y *MMP9*].

2. En el **cultivo primario de CFs humanos**, el fármaco **nintedanib** “*per se*” demostró mayoritariamente un efecto antifibrótico ya que redujo tanto la expresión de diversos marcadores génicos involucrados en el proceso fibrótico (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *CDH2*, TGF- β_1 y *PDGFR α*), como también la migración celular de los cardiofibroblastos. Este efecto antifibrótico fue reforzado por la capacidad del fármaco **nintedanib** de normalizar [*COL1A1*, *FN1*, *CDH2* (N-cadherina)] o revertir (*MMP9*), la expresión de marcadores fibróticos inducidos por el estímulo TGF- β_1 . No obstante, nintedanib presentó un perfil fibrótico respecto al incremento del gen *ACTA2* (α -SMA).

3. El fármaco **nintedanib** se comportó de manera dual respecto a la inflamación. Así, ejerció un efecto ‘proinflamatorio’ en los cardiofibroblastos humanos primarios aumentando significativamente la expresión génica de *IL-6* y la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Sin embargo, a nivel sistémico, tuvo una acción ‘antiinflamatoria’ puesto que fue capaz de revertir el aumento de la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1 inducida por TNF- α en monocitos.

4. En el modelo ***in vivo*** de fibrosis cardíaca basado en la generación de un infarto de miocardio mediante la ligadura transitoria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (modelo *LAD*), el fármaco **nintedanib** no tuvo un efecto antifibrótico ya que no modificó la infiltración leucocitaria, ni el depósito de colágeno, ni la proliferación celular ni la angiogénesis en el tejido cardíaco de

CONCLUSIONES

los animales de experimentación. De hecho, el fármaco **nintedanib** produjo un efecto profibrótico incrementando significativamente la expresión génica de marcadores como el *col1a1*, *fn1* y *timp1*, y proinflamatorios como la *il-6* en el tejido cardíaco. Además, provocó un aumento en la concentración plasmática de troponina I, indicativo de daño cardíaco.

5. El fármaco **losartán**, no tuvo ningún efecto relevante sobre la expresión génica y proteica de marcadores profibróticos, ni sobre el proceso de migración celular en el **cultivo primario de cardiofibroblastos humanos**, así como tampoco sobre la expresión de las moléculas de adhesión. Asimismo, en el modelo *in vivo* de infarto de miocardio inducido por la ligadura transitoria de la arteria coronaria (modelo *LAD*), al igual que el fármaco nintedanib, tampoco mejoró ni fue capaz de prevenir el daño fibrótico e inflamatorio generado.

6. El resto de los fármacos evaluados (**pirfenidona** y **cilengitide**) no tuvieron ningún efecto relevante sobre la expresión génica y proteica de marcadores profibróticos, ni sobre el proceso de migración celular en el **cultivo primario de cardiofibroblastos humanos**, así como tampoco sobre la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria Mac-1.



BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. **2023**;147(8):e93-621.
2. Dattani S, Roser M. What are the different types of cardiovascular diseases, and how many deaths do they cause? Our World Data [Internet]. **2023** [citado 3 de agosto de 2024]; Disponible en: <https://ourworldindata.org/cardiovascular-diseases-types-and-death-tolls>
3. Vaduganathan M, Mensah GA, Turco JV, Fuster V, Roth GA. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk: A Compass for Future Health. *J Am Coll Cardiol*. **2022**;80(25):2361-71.
4. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. **2015**;5(4):1841-75.
5. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud **2022** [Internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad; [citado 10 de agosto de 2024] p. 293. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmninnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/InfAnualSNS2022/INFORME_ANUAL_2022.pdf
6. Fundación Española del Corazón. [citado 3 de agosto de 2024]. Cardiopatía isquémica. Disponible en: <https://fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/cardiopatia-isquemica.html>
7. Bragazzi NL, Zhong W, Shu J, Abu Much A, Lotan D, Grupper A, et al. Burden of heart failure and underlying causes in 195 countries and territories from 1990 to 2017. *Eur J Prev Cardiol*. **2021**;28(15):1682-90.

BIBLIOGRAFÍA

8. Liu Z, Li Z, Li X, Yan Y, Liu J, Wang J, et al. Global trends in heart failure from 1990 to 2019: An age-period-cohort analysis from the Global Burden of Disease study. *ESC Heart Fail.* **2024**;11(5):3264-78.
9. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* **2018**;137(12):e67-492.
10. Seferović PM, Vardas P, Jankowska EA, Maggioni AP, Timmis A, Milinković I, et al. The Heart Failure Association Atlas: Heart Failure Epidemiology and Management Statistics 2019. *Eur J Heart Fail.* **2021**;23(6):906-14.
11. Jones NR, Roalfe AK, Adoki I, Hobbs FDR, Taylor CJ. Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail.* **2019**;21(11):1306-25.
12. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev.* **2017**;3(1):7-11.
13. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* **2019**;139(10):e56-528.
14. Shao C, Wang J, Tian J, Tang Y da. Coronary Artery Disease: From Mechanism to Clinical Practice. *Adv Exp Med Biol.* **2020**;1177:1-36.
15. Tamis-Holland JE, Jneid H, Reynolds HR, Agewall S, Brilakis ES, Brown TM, et al. Contemporary Diagnosis and Management of Patients With Myocardial Infarction in the Absence of Obstructive Coronary Artery Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* **2019**;139(18):e891-908.

16. Caballero-Borrego J, Hernández-García JM, Sanchis-Fores J. Complicaciones mecánicas en el infarto agudo de miocardio. ¿Cuáles son, cuál es su tratamiento y qué papel tiene el intervencionismo percutáneo? *Rev Esp Cardiol Supl.* **2009**;9(3):62-70.
17. Fu DG. Cardiac Arrhythmias: Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell Biochem Biophys.* **2015**;73(2):291-6.
18. Samsky MD, Morrow DA, Proudfoot AG, Hochman JS, Thiele H, Rao SV. Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction: A Review. *JAMA.* **2021**;326(18):1840-50.
19. Kusumoto FM, Schoenfeld MH, Barrett C, Edgerton JR, Ellenbogen KA, Gold MR, et al. 2018 ACC/AHA/HRS Guideline on the Evaluation and Management of Patients With Bradycardia and Cardiac Conduction Delay: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines, and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol.* **2019**;74(7):932-87.
20. Mazurek JA, Jessup M. Understanding Heart Failure. *Heart Fail Clin.* **2017**;13(1):1-19.
21. Lam CSP, Solomon SD. Classification of Heart Failure According to Ejection Fraction: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* **2021**;77(25):3217-25.
22. Vedin O, Lam CSP, Koh AS, Benson L, Teng THK, Tay WT, et al. Significance of Ischemic Heart Disease in Patients With Heart Failure and Preserved, Midrange, and Reduced Ejection Fraction: A Nationwide Cohort Study. *Circ Heart Fail.* **2017**;10(6):e003875.

BIBLIOGRAFÍA

- 23.** Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med.* **2019**;65:70-99.
- 24.** Kurose H. Cardiac Fibrosis and Fibroblasts. *Cells.* **2021**;10(7):1716.
- 25.** Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* **2021**;117(6):1450-88.
- 26.** Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res.* **2016**;118(6):1021-40.
- 27.** Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl Sci.* **2019**;4(3):449-67.
- 28.** Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* **2014**;71(4):549-74.
- 29.** Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **2012**;5(1):15.
- 30.** Reichardt IM, Robeson KZ, Regnier M, Davis J. Controlling cardiac fibrosis through fibroblast state space modulation. *Cell Signal.* **2021**;79:109888.
- 31.** Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol.* **2014**;11(5):255-65.
- 32.** Czubryt MP. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **2012**;5(1):19.
- 33.** Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res.* **2007**;101(8):755-8.

34. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* **2011**;51(4):600-6.
35. Shi X, Young CD, Zhou H, Wang X. Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules.* **2020**;10(12):1666.
36. Chen PY, Qin L, Simons M. TGF β signaling pathways in human health and disease. *Front Mol Biosci* [Internet]. **2023** [citado 25 de noviembre de 2024];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2023.1113061/full>
37. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* **2003**;116(Pt 2):217-24.
38. Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest.* **1994**;93(2):892-9.
39. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* **1988**;106(5):1659-65.
40. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, et al. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation.* **2007**;116(19):2127-38.
41. Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF, et al. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res.* **2010**;107(3):418-28.

BIBLIOGRAFÍA

42. Kong P, Shinde AV, Su Y, Russo I, Chen B, Saxena A, et al. Opposing Actions of Fibroblast and Cardiomyocyte Smad3 Signaling in the Infarcted Myocardium. *Circulation*. **2018**;137(7):707-24.
43. Villar AV, García R, Llano M, Cobo M, Merino D, Lantero A, et al. BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF- β signaling. *Biochim Biophys Acta*. **2013**;1832(2):323-35.
44. Huang S, Chen B, Su Y, Alex L, Humeres C, Shinde AV, et al. Distinct roles of myofibroblast-specific Smad2 and Smad3 signaling in repair and remodeling of the infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol*. **2019**;132:84-97.
45. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. **2007**;19(2):176-84.
46. Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, et al. Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest*. **2002**;32(5):295-303.
47. Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittie AS, Dembowski K, Jing S, et al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ Res*. **2000**;86(5):571-9.
48. Brooks WW, Conrad CH. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *J Mol Cell Cardiol*. **2000**;32(2):187-95.
49. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. **2002**;106(1):130-5.

50. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* **2004**;18(7):816-27.
51. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol.* **1999**;181(1):153-9.
52. Bhullar SK, Dhalla NS. Angiotensin II-Induced Signal Transduction Mechanisms for Cardiac Hypertrophy. *Cells.* **2022**;11(21):3336.
53. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* **2018**;98(3):1627-738.
54. Kurdi M, Booz GW. New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2011**;57(6):1034-8.
55. AlQudah M, Hale TM, Czubryt MP. Targeting the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Fibrosis. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* **2020**;91-92:92-108.
56. Chatterjee K, Topol EJ. *Fármacos en Cardiología. 2ª. Jaypee-Highlights*; **2017**. 469 p.
57. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, et al. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation.* **1997**;96(11):3954-62.

BIBLIOGRAFÍA

- 58.** Kurisu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H, et al. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2003**;41(1):99-107.
- 59.** Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, et al. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*. **1994**;89(5):2273-82.
- 60.** Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH. Pressure-independent effects of AT1-receptor antagonism on cardiovascular remodeling in aortic-banded rats. *Am J Physiol*. **1997**;272(5 Pt 2):H2131-2138.
- 61.** Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. **1994**;26(7):809-20.
- 62.** Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. **1997**;29(7):1947-58.
- 63.** Lahera V, Cachafeiro V, de Las Heras N. Interplay of hypertension, inflammation, and angiotensin II. *Am J Hypertens*. **2011**;24(10):1059.
- 64.** Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. **1991**;83(6):1849-65.
- 65.** Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. **2000**;32(6):865-79.

66. Somanna NK, Yariswamy M, Garagliano JM, Siebenlist U, Mummidi S, Valente AJ, et al. Aldosterone-induced cardiomyocyte growth, and fibroblast migration and proliferation are mediated by TRAF3IP2. *Cell Signal.* **2015**;27(10):1928-38.
67. Dobaczewski M, Frangogiannis NG. Chemokines and cardiac fibrosis. *Front Biosci Sch Ed.* **2009**;1(2):391-405.
68. Xia Y, Frangogiannis NG. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm Allergy Drug Targets.* **2007**;6(2):101-7.
69. Bujak M, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Xia Y, Leucker T, Zymek P, et al. Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. *Circ Res.* **2009**;105(10):973-83.
70. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, et al. Interleukin-1 receptor type 1 signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* **2008**;173(1):57-67.
71. Duerrschmid C, Crawford JR, Reineke E, Taffet GE, Trial J, Entman ML, et al. TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* **2013**;57:59-67.
72. Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv Wound Care.* **2020**;9(4):184-98.
73. Peng H, Sarwar Z, Yang XP, Peterson EL, Xu J, Janic B, et al. Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2015**;66(3):582-9.

BIBLIOGRAFÍA

- 74.** Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* **2001**;194(6):809-21.
- 75.** Kolodsick JE, Toews GB, Jakubzick C, Hogaboam C, Moore TA, McKenzie A, et al. Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts. *J Immunol Baltim Md 1950.* **2004**;172(7):4068-76.
- 76.** Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol Baltim Md.* **1996**;10(9):1077-83.
- 77.** Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2001**;280(1):C53-60.
- 78.** Zymek P, Bujak M, Chatila K, Cieslak A, Thakker G, Entman ML, et al. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol.* **2006**;48(11):2315-23.
- 79.** Gallini R, Lindblom P, Bondjers C, Betsholtz C, Andrae J. PDGF-A and PDGF-B induces cardiac fibrosis in transgenic mice. *Exp Cell Res.* **2016**;349(2):282-90.
- 80.** Pontén A, Folestad EB, Pietras K, Eriksson U. Platelet-derived growth factor D induces cardiac fibrosis and proliferation of vascular smooth muscle cells in heart-specific transgenic mice. *Circ Res.* **2005**;97(10):1036-45.
- 81.** Liu C, Zhao W, Meng W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, et al. Platelet-derived growth factor blockade on cardiac remodeling following infarction. *Mol Cell Biochem.* **2014**;397(1-2):295-304.

82. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* **2010**;106(11):1675-80.
83. Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Mano T, Nishikawa N, Kondo H, et al. Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in development of diastolic heart failure in hypertensive hearts. *Cardiovasc Res.* **2000**;47(2):274-83.
84. Kulasekaran P, Scavone CA, Rogers DS, Arenberg DA, Thannickal VJ, Horowitz JC. Endothelin-1 and transforming growth factor- β 1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2009**;41(4):484-93.
85. Mueller EE, Momen A, Massé S, Zhou YQ, Liu J, Backx PH, et al. Electrical remodelling precedes heart failure in an endothelin-1-induced model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* **2011**;89(3):623-33.
86. Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation.* **2001**;103(2):319-24.
87. Chen C, Li R, Ross RS, Manso AM. Integrins and integrin-related proteins in cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* **2016**;93:162-74.
88. Shimojo N, Hashizume R, Kanayama K, Hara M, Suzuki Y, Nishioka T, et al. Tenascin-C may accelerate cardiac fibrosis by activating macrophages via the integrin α V β 3/nuclear factor- κ B/interleukin-6 axis. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2015**;66(4):757-66.

BIBLIOGRAFÍA

- 89.** Murray IR, Gonzalez ZN, Baily J, Dobie R, Wallace RJ, Mackinnon AC, et al. α v integrins on mesenchymal cells regulate skeletal and cardiac muscle fibrosis. *Nat Commun.* **2017**;8(1):1118.
- 90.** Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res.* **2016**;118(3):400-9.
- 91.** Lafuse WP, Wozniak DJ, Rajaram MVS. Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells.* **2020**;10(1):51.
- 92.** Sakuta M. [One hundred books which build up neurology--Rudolf Ludwig Carl Virchow «Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre»]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo.* **2011**;63(2):184-5.
- 93.** Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* **2009**;105(12):1164-76.
- 94.** Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol.* **2010**;225(3):631-7.
- 95.** Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol.* **1994**;72(3):283-92.
- 96.** Lie-Venema H, van den Akker NMS, Bax NAM, Winter EM, Maas S, Kekalainen T, et al. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal.* **2007**;7:1777-98.

97. Olivey HE, Mundell NA, Austin AF, Barnett JV. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* **2006**;235(1):50-9.
98. Norris RA, Borg TK, Butcher JT, Baudino TA, Banerjee I, Markwald RR. Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Ann N Y Acad Sci.* **2008**;1123:30-40.
99. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* **2007**;13(8):952-61.
100. Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation.* **2012**;125(14):1795-808.
101. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **2006**;126(4):663-76.
102. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* **2010**;463(7284):1035-41.
103. Kohl P. Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circ Res.* **2003**;93(5):381-3.
104. Kolditz DP, Wijffels MCEF, Blom NA, van der Laarse A, Hahurij ND, Lie-Venema H, et al. Epicardium-derived cells in development of annulus fibrosis and persistence of accessory pathways. *Circulation.* **2008**;117(12):1508-17.

BIBLIOGRAFÍA

- 105.** Rohr S. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc Res.* **2004**;62(2):309-22.
- 106.** Lillo MA, Muñoz M, Rhana P, Gaul-Muller K, Quan J, Shirokova N, et al. Remodeled connexin 43 hemichannels alter cardiac excitability and promote arrhythmias. *J Gen Physiol.* **2023**;155(7):e202213150.
- 107.** Severs NJ, Dupont E, Coppén SR, Halliday D, Inett E, Baylis D, et al. Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* **2004**;1662(1-2):138-48.
- 108.** Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* **2009**;123(2):255-78.
- 109.** Moore L, Fan D, Basu R, Kandalam V, Kassiri Z. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev.* **2012**;17(4-5):693-706.
- 110.** Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* **1997**;386(6626):671-4.
- 111.** Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med.* **2007**;13(8):962-9.
- 112.** Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* **2005**;65(1):40-51.
- 113.** van den Borne SWM, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* **2010**;7(1):30-7.

- 114.** Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2002**;39(2):258-63.
- 115.** Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*. **2007**;257:143-79.
- 116.** Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. **2008**;214(2):199-210.
- 117.** Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. **2003**;112(12):1776-84.
- 118.** Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2002**;3(5):349-63.
- 119.** Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. **2007**;170(6):1807-16.
- 120.** Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. **2011**;57(4):376-9.
- 121.** Calderone A, Bel-Hadj S, Drapeau J, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, et al. Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol*. **2006**;207(1):165-73.
- 122.** Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *Int J Mol Sci*. **2022**;23(5):2617.
- 123.** Howard CM, Baudino TA. Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. **2014**;70:19-26.

BIBLIOGRAFÍA

- 124.** Ballard-Croft C, White DJ, Maass DL, Hybki DP, Horton JW. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac myocyte secretion of the inflammatory cytokine TNF-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2001**;280(5):H1970-1981.
- 125.** Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation.* **1998**;97(14):1375-81.
- 126.** Frangogiannis NG. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circ Res.* **2019**;125(1):117-46.
- 127.** Bowers SLK, Baudino TA. Cardiac myocyte-fibroblast interactions and the coronary vasculature. *J Cardiovasc Transl Res.* **2012**;5(6):783-93.
- 128.** Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* **2023**;548:117487.
- 129.** Mathew DT, Peigh G, Lima JAC, Bielinski SJ, Larson NB, Allison MA, et al. Associations of Circulating Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 With Long-Term Cardiac Function. *J Am Heart Assoc.* **2024**;13(6):e032213.
- 130.** Lino DOC, Freitas IA, Meneses GC, Martins AMC, Daher EF, Rocha JHC, et al. Interleukin-6 and adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 as biomarkers of post-acute myocardial infarction heart failure. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* **2019**;52(12):e8658.
- 131.** Troncoso MF, Ortiz-Quintero J, Garrido-Moreno V, Sanhueza-Olivares F, Guerrero-Moncayo A, Chiong M, et al. VCAM-1 as a predictor biomarker in

- cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **2021**;1867(9):166170.
- 132.** Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, et al. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci.* **2012**;91(13-14):651-7.
- 133.** Widyanoro B, Emoto N, Nakayama K, Anggrahini DW, Adiarto S, Iwasa N, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation.* **2010**;121(22):2407-18.
- 134.** Cheng W, Li X, Liu D, Cui C, Wang X. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Role in Cardiac Fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* **2021**;26(1):3-11.
- 135.** Li Y, Lui KO, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* **2018**;15(8):445-56.
- 136.** Camici PG, Tschöpe C, Di Carli MF, Rimoldi O, Van Linthout S. Coronary microvascular dysfunction in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* **2020**;116(4):806-16.
- 137.** Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* **2001**;104(12):1336-42.
- 138.** Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation.* **2002**;106(7):820-5.
- 139.** Gogiraju R, Bochenek ML, Schäfer K. Angiogenic Endothelial Cell Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Front Cardiovasc Med.* **2019**;6:20.

BIBLIOGRAFÍA

- 140.** Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* **2001**;15(8):1428-30.
- 141.** Frangogiannis NG. The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Vasc Pharmacol.* **2004**;2(2):163-74.
- 142.** Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* **2016**;44(3):450-62.
- 143.** Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res.* **2014**;115(2):284-95.
- 144.** Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell.* **2017**;169(3):510-522.e20.
- 145.** Chen B, Frangogiannis NG. Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirc N Y N 1994.* **2017**;24(1).
- 146.** de Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* **2015**;125(8):3147-62.
- 147.** Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* **2005**;23(4):344-6.
- 148.** Wang JW, Fontes MSC, Wang X, Chong SY, Kessler EL, Zhang YN, et al. Leukocytic Toll-Like Receptor 2 Deficiency Preserves Cardiac Function And Reduces Fibrosis In Sustained Pressure Overload. *Sci Rep.* **2017**;7(1):9193.

- 149.** Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med.* **2009**;13(7):1211-20.
- 150.** Kanse SM, Matz RL, Preissner KT, Peter K. Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the beta2 integrin Mac-1 (alphaMbeta2, CD11b/CD18). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2004**;24(12):2251-6.
- 151.** Kolck UW, Alfter K, Homann J, von Kügelgen I, Molderings GJ. Cardiac mast cells: implications for heart failure. *J Am Coll Cardiol.* **2007**;49(10):1107; author reply 1107-1108.
- 152.** Shiota N, Rysä J, Kovanen PT, Ruskoaho H, Kokkonen JO, Lindstedt KA. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J Hypertens.* **2003**;21(10):1935-44.
- 153.** Nazari M, Ni NC, Lüdke A, Li SH, Guo J, Weisel RD, et al. Mast cells promote proliferation and migration and inhibit differentiation of mesenchymal stem cells through PDGF. *J Mol Cell Cardiol.* **2016**;94:32-42.
- 154.** Nevers T, Salvador AM, Grodecki-Pena A, Knapp A, Velázquez F, Aronovitz M, et al. Left Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure. *Circ Heart Fail.* **2015**;8(4):776-87.
- 155.** Bansal SS, Ismahil MA, Goel M, Patel B, Hamid T, Rokosh G, et al. Activated T Lymphocytes are Essential Drivers of Pathological Remodeling in Ischemic Heart Failure. *Circ Heart Fail.* **2017**;10(3):e003688.
- 156.** Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* **2010**;176(5):2177-87.

BIBLIOGRAFÍA

- 157.** Li C, Sun XN, Zeng MR, Zheng XJ, Zhang YY, Wan Q, et al. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in T Cells Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction Through Modulating T-Cell Activation. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2017**;70(1):137-47.
- 158.** Nevers T, Salvador AM, Velazquez F, Ngwenyama N, Carrillo-Salinas FJ, Aronovitz M, et al. Th1 effector T cells selectively orchestrate cardiac fibrosis in nonischemic heart failure. *J Exp Med*. **2017**;214(11):3311-29.
- 159.** Cieslik KA, Taffet GE, Carlson S, Hermosillo J, Trial J, Entman ML. Immune-inflammatory dysregulation modulates the incidence of progressive fibrosis and diastolic stiffness in the aging heart. *J Mol Cell Cardiol*. **2011**;50(1):248-56.
- 160.** Kallikourdis M, Martini E, Carullo P, Sardi C, Roselli G, Greco CM, et al. T cell costimulation blockade blunts pressure overload-induced heart failure. *Nat Commun*. **2017**;8:14680.
- 161.** Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J*. **2017**;38(3):187-97.
- 162.** Goldsmith EC, Bradshaw AD, Zile MR, Spinale FG. Myocardial fibroblast-matrix interactions and potential therapeutic targets. *J Mol Cell Cardiol*. **2014**;70:92-9.
- 163.** Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. **2007**;87(4):1285-342.

- 164.** Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* **1989**;13(7):1637-52.
- 165.** Dobaczewski M, de Haan JJ, Frangogiannis NG. The extracellular matrix modulates fibroblast phenotype and function in the infarcted myocardium. *J Cardiovasc Transl Res.* **2012**;5(6):837-47.
- 166.** Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol.* **2010**;48(3):474-82.
- 167.** Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest.* **2017**;127(5):1600-12.
- 168.** Linehan KA, Seymour AM, Williams PE. Semiquantitative analysis of collagen types in the hypertrophied left ventricle. *J Anat.* **2001**;198(Pt 1):83-92.
- 169.** Horn MA, Trafford AW. Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *J Mol Cell Cardiol.* **2016**;93:175-85.
- 170.** Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* **1979**;40(3):364-72.
- 171.** Naugle JE, Olson ER, Zhang X, Mase SE, Pilati CF, Maron MB, et al. Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2006**;290(1):H323-330.
- 172.** Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem.* **2004**;279(51):53331-7.

BIBLIOGRAFÍA

- 173.** Lindsey ML, Iyer RP, Jung M, DeLeon-Pennell KY, Ma Y. Matrix metalloproteinases as input and output signals for post-myocardial infarction remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* **2016**;91:134-40.
- 174.** Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* **2013**;229(2):298-309.
- 175.** Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol.* **1998**;142(3):873-81.
- 176.** Tryggvason K. The laminin family. *Curr Opin Cell Biol.* **1993**;5(5):877-82.
- 177.** Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circ Res.* **2001**;88(11):1112-9.
- 178.** Vogel WF. Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur J Dermatol EJD.* **2001**;11(6):506-14.
- 179.** Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol.* **2000**;148(3):399-404.
- 180.** Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* **2012**;92(2):635-88.
- 181.** Zohar R, Zhu B, Liu P, Sodek J, McCulloch CA. Increased cell death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2004**;287(4):H1730-1739.
- 182.** Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med.* **2008**;205(2):295-303.

- 183.** Ahmed MS, Gravning J, Martinov VN, von Lueder TG, Edvardsen T, Czibik G, et al. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2011**;300(4):H1291-1302.
- 184.** Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med.* **2018**;24(8):1234-45.
- 185.** Xie J, Zhang Q, Zhu T, Zhang Y, Liu B, Xu J, et al. Substrate stiffness-regulated matrix metalloproteinase output in myocardial cells and cardiac fibroblasts: implications for myocardial fibrosis. *Acta Biomater.* 2014;10(6):2463-72.
- 186.** Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest.* **2000**;106(7):857-66.
- 187.** Mustonen E, Ruskoaho H, Rysä J. Thrombospondins, potential drug targets for cardiovascular diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2013**;112(1):4-12.
- 188.** Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, et al. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2010**;298(3):H1072-1078.
- 189.** McCurdy SM, Dai Q, Zhang J, Zamilpa R, Ramirez TA, Dayah T, et al. SPARC mediates early extracellular matrix remodeling following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2011**;301(2):H497-505.
- 190.** Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac

BIBLIOGRAFÍA

- remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* **2000**;35(3):569-82.
- 191.** Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol.* **2003**;65:81-101.
- 192.** Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie.* **2005**;87(3-4):353-60.
- 193.** Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* **1999**;79(1):215-62.
- 194.** Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **2002**;91(12):1103-13.
- 195.** Weber KT. From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2004**;43(4):716-9.
- 196.** Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2014**;15(12):786-801.
- 197.** Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, et al. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2003**;284(1):H122-132.
- 198.** Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, et al. Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circ Res.* **1999**;85(11):1046-55.
- 199.** Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiol Oxf Engl.* **2008**;194(1):3-21.

- 200.** Sussman MA, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **2002**;91(10):888-98.
- 201.** Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* **2006**;30(4):604-10.
- 202.** Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **2016**;365(3):563-81.
- 203.** de Boer RA, De Keulenaer G, Bauersachs J, Brutsaert D, Cleland JG, Diez J, et al. Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* **2019**;21(3):272-85.
- 204.** Ieronimakis N, Hays AL, Janebodin K, Mahoney WM, Duffield JS, Majesky MW, et al. Coronary adventitial cells are linked to perivascular cardiac fibrosis via TGFβ1 signaling in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Cell Cardiol.* **2013**;63:122-34.
- 205.** Dai Z, Aoki T, Fukumoto Y, Shimokawa H. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J Cardiol.* **2012**;60(5):416-21.
- 206.** González A, Richards AM, de Boer RA, Thum T, Arfsten H, Hülsmann M, et al. Cardiac remodelling - Part 1: From cells and tissues to circulating biomarkers. A review from the Study Group on Biomarkers of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* **2022**;24(6):927-43.

BIBLIOGRAFÍA

- 207.** Meijers WC, Bayes-Genis A, Mebazaa A, Bauersachs J, Cleland JGF, Coats AJS, et al. Circulating heart failure biomarkers beyond natriuretic peptides: review from the Biomarker Study Group of the Heart Failure Association (HFA), European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail.* **2021**;23(10):1610-32.
- 208.** Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* **2022**;145(18):e895-1032.
- 209.** Berezin AE, Berezin AA. Biomarkers in Heart Failure: From Research to Clinical Practice. *Ann Lab Med.* **2023**;43(3):225-36.
- 210.** Authors/Task Force Members: McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* **2022**;24(1):4-131.
- 211.** Ravassa S, López B, Treibel TA, San José G, Losada-Fuentenebro B, Tapia L, et al. Cardiac Fibrosis in heart failure: Focus on non-invasive diagnosis and emerging therapeutic strategies. *Mol Aspects Med.* **2023**;93:101194.
- 212.** Rossignol P, Hernandez AF, Solomon SD, Zannad F. Heart failure drug treatment. *Lancet Lond Engl.* **2019**;393(10175):1034-44.
- 213.** Fuster-Martínez I, Calatayud S. The current landscape of antifibrotic therapy across different organs: A systematic approach. *Pharmacol Res.* **2024**;205:107245.

- 214.** Lewis GA, Dodd S, Clayton D, Bedson E, Eccleson H, Schelbert EB, et al. Pirfenidone in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized phase 2 trial. *Nat Med.* **2021**;27(8):1477-82.
- 215.** Fu Y, Shi J, Qian H, Qin C, Liu L, Shen J, et al. Alleviation of cardiac fibrosis using acellular peritoneal matrix-loaded pirfenidone nanodroplets after myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol.* **2022**;933:175238.
- 216.** Li N, Hang W, Shu H, Zhou N. Pirfenidone alleviates cardiac fibrosis induced by pressure overload via inhibiting TGF- β 1/Smad3 signalling pathway. *J Cell Mol Med.* **2022**;26(16):4548-55.
- 217.** Chen Z, Zhou H, Huang X, Wang S, Ouyang X, Wang Y, et al. Pirfenidone attenuates cardiac hypertrophy against isoproterenol by inhibiting activation of the janus tyrosine kinase-2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK-2/STAT3) signaling pathway. *Bioengineered.* **2022**;13(5):12772-82.
- 218.** Wang Y, Wu Y, Chen J, Zhao S, Li H. Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 inflammasome formation. *Cardiology.* **2013**;126(1):1-11.
- 219.** See F, Watanabe M, Kompa AR, Wang BH, Boyle AJ, Kelly DJ, et al. Early and delayed tranilast treatment reduces pathological fibrosis following myocardial infarction. *Heart Lung Circ.* **2013**;22(2):122-32.
- 220.** Zhan C, Bai N, Zheng M, Wang Y, Wang Y, Zhang L, et al. Tranilast prevents doxorubicin-induced myocardial hypertrophy and angiotensin II synthesis in rats. *Life Sci.* **2021**;267:118984.
- 221.** Massoud G, Parish M, Hazimeh D, Moukarzel P, Singh B, Cayton Vaught KC, et al. Unlocking the potential of tranilast: Targeting fibrotic signaling pathways for therapeutic benefit. *Int Immunopharmacol.* **2024**;137:112423.

BIBLIOGRAFÍA

- 222.** Li X, Liu J, Shang X. Effect of tranilast on myocardial fibrosis in diabetes rats through TGF- β /Smad pathway. *Minerva Med.* **2021**;112(1):153-4.
- 223.** Chen Y, Huang M, Yan Y, He D. Tranilast inhibits angiotensin II-induced myocardial fibrosis through S100A11/ transforming growth factor- β (TGF- β 1)/Smad axis. *Bioengineered.* **2021**;12(1):8447-56.
- 224.** Ferreira RR, Abreu R da S, Vilar-Pereira G, Degraive W, Meuser-Batista M, Ferreira NVC, et al. TGF- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease. *PLoS Negl Trop Dis.* **2019**;13(7):e0007602.
- 225.** Umbarkar P, Singh AP, Tousif S, Zhang Q, Sethu P, Lal H. Repurposing Nintedanib for pathological cardiac remodeling and dysfunction. *Pharmacol Res.* **2021**;169:105605.
- 226.** Rol N, de Raaf MA, Sun XQ, Kuiper VP, da Silva Gonçalves Bos D, Happé C, et al. Nintedanib improves cardiac fibrosis but leaves pulmonary vascular remodelling unaltered in experimental pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* **2019**;115(2):432-9.
- 227.** Ninagawa K, Kato M, Tsuneta S, Ishizaka S, Ujiie H, Hisada R, et al. Beneficial effects of nintedanib on cardiomyopathy in patients with systemic sclerosis: a pilot study. *Rheumatol Oxf Engl.* **2023**;62(7):2550-5.
- 228.** Ameri P, Tini G, Spallarossa P, Mercurio V, Tocchetti CG, Porto I. Cardiovascular safety of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib. *Br J Clin Pharmacol.* **2021**;87(10):3690-8.
- 229.** Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-

- 22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2014**;15(10):1100-8.
- 230.** Sui S, Hou Y. Dual integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha\text{v}\beta 5$ blockade attenuates cardiac dysfunction by reducing fibrosis in a rat model of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Scand Cardiovasc J SCJ.* **2021**;55(5):287-96.
- 231.** Perrucci GL, Barbagallo VA, Corlianò M, Tosi D, Santoro R, Nigro P, et al. Integrin $\alpha\text{v}\beta 5$ in vitro inhibition limits pro-fibrotic response in cardiac fibroblasts of spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med.* **2018**;16(1):352.
- 232.** Chen YW, Cheng PP, Yin YF, Cai H, Chen JZ, Feng MH, et al. Integrin αV mediated activation of myofibroblast via mechanoparacrine of transforming growth factor $\beta 1$ in promoting fibrous scar formation after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* **2024**;692:149360.
- 233.** Rubino CM, Bhavnani SM, Ambrose PG, Forrest A, Loutit JS. Effect of food and antacids on the pharmacokinetics of pirfenidone in older healthy adults. *Pulm Pharmacol Ther.* **2009**;22(4):279-85.
- 234.** Lehtonen ST, Veijola A, Karvonen H, Lappi-Blanco E, Sormunen R, Korpela S, et al. Pirfenidone and nintedanib modulate properties of fibroblasts and myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* **2016**;17:14.
- 235.** Shi Q, Liu X, Bai Y, Cui C, Li J, Li Y, et al. In vitro effects of pirfenidone on cardiac fibroblasts: proliferation, myofibroblast differentiation, migration and cytokine secretion. *PLoS One.* **2011**;6(11):e28134.
- 236.** Sarrazy V, Koehler A, Chow ML, Zimina E, Li CX, Kato H, et al. Integrins $\alpha\text{v}\beta 5$ and $\alpha\text{v}\beta 3$ promote latent TGF- $\beta 1$ activation by human cardiac fibroblast contraction. *Cardiovasc Res.* **2014**;102(3):407-17.

BIBLIOGRAFÍA

- 237.** Ritzenthaler JD, Zhang M, Torres-Gonzalez E, Roman J. The Integrin Inhibitor Cilengitide and Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis: Cilengitide and Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Lung*. **2020**;198(6):947-55.
- 238.** Kim MD, Baumlin N, Dennis JS, Yoshida M, Kis A, Aguiar C, et al. Losartan reduces cigarette smoke-induced airway inflammation and mucus hypersecretion. *ERJ Open Res*. **2021**;7(1):00394-2020.
- 239.** Kim MD, Baumlin N, Yoshida M, Polineni D, Salathe SF, David JK, et al. Losartan Rescues Inflammation-related Mucociliary Dysfunction in Relevant Models of Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **2020**;201(3):313-24.
- 240.** Joannes A, Voisin T, Morzadec C, Letellier A, Gutierrez FL, Chiforeanu DC, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib on lung fibroblasts derived from patients with Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases (PF-ILDs). *Pulm Pharmacol Ther*. **2023**;83:102267.
- 241.** Yin Y, Liu S, Pu L, Luo J, Liu H, Wu W. Nintedanib prevents TGF- β 2-induced epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. **2023**;161:114543.
- 242.** Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Seidel P, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. **2014**;15(1):157.
- 243.** Lehmann M, Buhl L, Alsafadi HN, Klee S, Hermann S, Mutze K, et al. Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. *Respir Res*. **2018**;19(1):175.

- 244.** Widjaja AA, Viswanathan S, Jinrui D, Singh BK, Tan J, Wei Ting JG, et al. Molecular Dissection of Pro-Fibrotic IL11 Signaling in Cardiac and Pulmonary Fibroblasts. *Front Mol Biosci.* **2021**;8:740650.
- 245.** Brooks RF. Regulation of fibroblast cell cycle by serum. *Nature.* **1976**;260(5548):248-50.
- 246.** Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* **2008**;3(6):1101-8.
- 247.** Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* **1954**;140(5):675-82.
- 248.** Maruyama K, Naemura K, Yoshihara K, Imanaka-Yoshida K, Kurihara H, Miyagawa-Tomita S. Surgical protocol for permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice to generate a model of myocardial infarction. *STAR Protoc.* **2021**;2(3):100775.
- 249.** De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis Model Mech.* **2020**;13(11):dmm046565.
- 250.** Xu Z, McElhanon KE, Beck EX, Weisleder N. A Murine Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* **2018**;1717:145-53.
- 251.** Lv B, Zhou J, He S, Zheng Y, Yang W, Liu S, et al. Induction of Myocardial Infarction and Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *J Vis Exp JoVE.* **2022**;(179).
- 252.** Tarnavski O. Mouse surgical models in cardiovascular research. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* **2009**;573:115-37.

BIBLIOGRAFÍA

- 253.** Meng XM, Yuan JH, Zhou ZF, Feng QP, Zhu BM. Evaluation of time-dependent phenotypes of myocardial ischemia-reperfusion in mice. *Aging*. **2023**;15(19):10627-39.
- 254.** Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovasc Res*. **1998**;40(3):502-7.
- 255.** Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. **2016**;7(2):27-31.
- 256.** European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2011). Guideline on Bioanalytical Method Validation. [Internet]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- 257.** Shukla SK, Kadry H, Bhatt JA, Elbatanony R, Ahsan F, Gupta V. Statistical optimization and validation of a novel ultra-performance liquid chromatography method for estimation of nintedanib in rat and human plasma. *Bioanalysis*. **2020**;12(3):159-74.
- 258.** Kohei T, Kenta F, Kotaro Y, Sumio C, Hitoshi T. FACILE AND SENSITIVE HPLC-UV METHOD FOR DETERMINATION OF NINTEDANIB IN RAT PLASMA. *Int J Pharm Pharm Sci*. **2018**;10(6):133.
- 259.** Lin D, Qiao L man, Zhang Y niao, Liu Y, Liu X she. Simultaneous determination of nintedanib and its metabolite by UPLC-MS/MS in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. **2016**;117:173-7.

260. Zhao L, Zhao Y, Li Q, Chen X, Xiao F, He B, et al. A fast, sensitive, and high throughput method for the determination of cefuroxime lysine in dog plasma by UPLC-MS/MS. *Talanta*. **2012**;89:84-90.
261. El-Gendy HF, Khalifa HK, Omran A, Korany RMS, Selim S, Hussein E, et al. Unveiling the Potential of Silymarin, *Spirulina platensis*, and *Chlorella vulgaris* towards Cardiotoxicity via Modulating Antioxidant Activity, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *Life Basel Switz*. **2024**;14(10):1289.
262. Shamseldean MSM, Attia MM, Korany RMS, Othamn NA, Allam SFM. Insecticidal efficacy of nanomaterials used to control mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 with special reference to their hepatotoxicity in rats. *Biosci Rep*. **2022**;42(7):BSR20220630.
263. Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, Sievers RE, Kapasi NK, Wang Y, et al. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. **2007**;102(6):2104-11.
264. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. **1994**;89(5):397-410.
265. Ruiz-Meana M, Martinson EA, Garcia-Dorado D, Piper HM. Animal ethics in Cardiovascular Research. *Cardiovasc Res*. **2012**;93(1):1-3.
266. Wind S, Schmid U, Freiwald M, Marzin K, Lotz R, Ebner T, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin Pharmacokinet*. **2019**;58(9):1131-47.
267. Litviňuková M, Talavera-López C, Maatz H, Reichart D, Worth CL, Lindberg EL, et al. Cells of the adult human heart. *Nature*. **2020**;588(7838):466-72.

BIBLIOGRAFÍA

- 268.** Frangogiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*. **2020**;217(3):e20190103.
- 269.** Siddesha JM, Valente AJ, Sakamuri SSVP, Yoshida T, Gardner JD, Somanna N, et al. Angiotensin II stimulates cardiac fibroblast migration via the differential regulation of matrixins and RECK. *J Mol Cell Cardiol*. **2013**;65:9-18.
- 270.** Tian B, Liu J, Bitterman P, Bache RJ. Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2003**;285(3):H1105-1112.
- 271.** Zhou Y, Xie Y, Li T, Zhang P, Chen T, Fan Z, et al. P21-activated kinase 1 mediates angiotensin II-induced differentiation of human atrial fibroblasts via the JNK/c-Jun pathway. *Mol Med Rep*. **2021**;23(3):207.
- 272.** Parichatikanond W, Duangrat R, Mangmool S. G α q protein-biased ligand of angiotensin II type 1 receptor mediates myofibroblast differentiation through TGF- β 1/ERK axis in human cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol*. **2023**;951:175780.
- 273.** Qian L, Hong J, Zhang Y, Zhu M, Wang X, Zhang Y, et al. Downregulation of S100A4 Alleviates Cardiac Fibrosis via Wnt/ β -Catenin Pathway in Mice. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. **2018**;46(6):2551-60.
- 274.** Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. **2000**;22(10):709-23.
- 275.** Chen K, Chen J, Li D, Zhang X, Mehta JL. Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone. *Hypertens Dallas Tex* 1979. **2004**;44(5):655-61.

- 276.** Zhang SQ, Bao YN, Lv LY, Du XH, Wang YC. Conophylline Suppresses Angiotensin II-Induced Myocardial Fibrosis In Vitro via the BMP4/JNK Pathway. *Bull Exp Biol Med.* **2021**;171(3):305-11.
- 277.** Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, et al. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Hum Mol Genet.* **2014**;23(8):2176-88.
- 278.** O'Brien KJ, Introne WJ, Akal O, Akal T, Barbu A, McGowan MP, et al. Prolonged treatment with open-label pirfenidone in Hermansky-Pudlak syndrome pulmonary fibrosis. *Mol Genet Metab.* **2018**;125(1-2):168-73.
- 279.** Zhou S, Li W, Tian M, Zhang N, Yang X, Li W, et al. Metabolic Activation of Pirfenidone Mediated by Cytochrome P450s and Sulfotransferases. *J Med Chem.* **2020**;63(15):8059-68.
- 280.** Hisatomi K, Mukae H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Hara S, et al. Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm Med.* **2012**;12:24.
- 281.** Antar SA, Saleh MA, Al-Karmalawy AA. Investigating the possible mechanisms of pirfenidone to be targeted as a promising anti-inflammatory, anti-fibrotic, anti-oxidant, anti-apoptotic, anti-tumor, and/or anti-SARS-CoV-2. *Life Sci.* **2022**;309:121048.
- 282.** Mirkovic S, Seymour AML, Fenning A, Strachan A, Margolin SB, Taylor SM, et al. Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* **2002**;135(4):961-8.

BIBLIOGRAFÍA

- 283.** Nguyen DT, Ding C, Wilson E, Marcus GM, Olgin JE. Pirfenidone mitigates left ventricular fibrosis and dysfunction after myocardial infarction and reduces arrhythmias. *Heart Rhythm*. **2010**;7(10):1438-45.
- 284.** Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation*. **2001**;103(18):2303-9.
- 285.** Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, et al. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail*. **2002**;8(6):390-8.
- 286.** Wang Y, Xu F, Chen J, Shen X, Deng Y, Xu L, et al. Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration, collagen and cytokine secretion: inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. **2011**;19(1):13-9.
- 287.** Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*. **2000**;106(1):55-62.
- 288.** Li R, Frangogiannis NG. Integrins in cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. **2022**;172:1-13.
- 289.** Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*. **2010**;10(10):753-68.
- 290.** Bagnato GL, Irrera N, Pizzino G, Santoro D, Roberts WN, Bagnato G, et al. Dual $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ blockade attenuates fibrotic and vascular alterations in a

- murine model of systemic sclerosis. Clin Sci Lond Engl 1979. **2018**;132(2):231-42.
- 291.** Li C, Flynn RS, Grider JR, Murthy KS, Kellum JM, Akbari H, et al. Increased activation of latent TGF- β 1 by α V β 3 in human Crohn's disease and fibrosis in TNBS colitis can be prevented by cilengitide. Inflamm Bowel Dis. **2013**;19(13):2829-39.
- 292.** Yokota T, McCourt J, Ma F, Ren S, Li S, Kim TH, et al. Type V Collagen in Scar Tissue Regulates the Size of Scar after Heart Injury. Cell. **2020**;182(3):545-562.e23.
- 293.** Bryant JE, Shamhart PE, Luther DJ, Olson ER, Koshy JC, Costic DJ, et al. Cardiac myofibroblast differentiation is attenuated by alpha(3) integrin blockade: potential role in post-MI remodeling. J Mol Cell Cardiol. **2009**;46(2):186-92.
- 294.** Bouvet M, Claude O, Roux M, Skelly D, Masurkar N, Mougenot N, et al. Anti-integrin α v therapy improves cardiac fibrosis after myocardial infarction by blunting cardiac PW1+ stromal cells. Sci Rep. **2020**;10(1):11404.
- 295.** Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. J Pharmacol Exp Ther. **2014**;349(2):209-20.
- 296.** Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, Devaraj A, Walsh SLF, Inoue Y, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. N Engl J Med. **2019**;381(18):1718-27.
- 297.** Balasubramanian S, Pleasant DL, Kasiganesan H, Quinones L, Zhang Y, Sundararaj KP, et al. Dasatinib Attenuates Pressure Overload Induced Cardiac

BIBLIOGRAFÍA

- Fibrosis in a Murine Transverse Aortic Constriction Model. *PloS One*. **2015**;10(10):e0140273.
- 298.** Wang LX, Yang X, Yue Y, Fan T, Hou J, Chen GX, et al. Imatinib attenuates cardiac fibrosis by inhibiting platelet-derived growth factor receptors activation in isoproterenol induced model. *PloS One*. **2017**;12(6):e0178619.
- 299.** Yan S, Xue S, Wang T, Gao R, Zeng H, Wang Q, et al. Efficacy and safety of nintedanib in patients with non-small cell lung cancer, and novel insights in radiation-induced lung toxicity. *Front Oncol*. **2023**;13:1086214.
- 300.** Lamb YN. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs*. **2021**;81(5):575-86.
- 301.** Wang Y, Jiao L, Qiang C, Chen C, Shen Z, Ding F, et al. The role of matrix metalloproteinase 9 in fibrosis diseases and its molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. **2024**;171:116116.
- 302.** Chopra A, Tabdanov E, Patel H, Janmey PA, Kresh JY. Cardiac myocyte remodeling mediated by N-cadherin-dependent mechanosensing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2011**;300(4):H1252-1266.
- 303.** Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, et al. Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res*. **2005**;97(5):474-81.
- 304.** Ferrell PD, Oristian KM, Cockrell E, Pizzo SV. Pathologic Proteolytic Processing of N-Cadherin as a Marker of Human Fibrotic Disease. *Cells*. **2022**;11(1):156.

- 305.** Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. **2015**;45(5):1434-45.
- 306.** Schneider M, Kostin S, Strøm CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. **2007**;75(1):40-50.
- 307.** Kong P, Christia P, Saxena A, Su Y, Frangogiannis NG. Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2013**;305(9):H1363-1372.
- 308.** Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem (Tokyo)*. **2010**;147(6):781-92.
- 309.** Fuchs M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, et al. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. **2003**;17(14):2118-20.
- 310.** Birner CM, Ulucan C, Fredersdorf S, Rihm M, Löwel H, Stritzke J, et al. Head-to-head comparison of BNP and IL-6 as markers of clinical and experimental heart failure: Superiority of BNP. *Cytokine*. **2007**;40(2):89-97.
- 311.** Pan L, Cheng Y, Yang W, Wu X, Zhu H, Hu M, et al. Nintedanib Ameliorates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, Inflammation, Apoptosis, and Oxidative Stress by Modulating PI3K/Akt/mTOR Pathway in Mice. *Inflammation*. **2023**;46(4):1531-42.
- 312.** Konstam MA, Neaton JD, Dickstein K, Drexler H, Komajda M, Martinez FA, et al. Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical outcomes in

BIBLIOGRAFÍA

- patients with heart failure (HEAAL study): a randomised, double-blind trial. *Lancet Lond Engl.* **2009**;374(9704):1840-8.
- 313.** Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**;102(2):437-42.
- 314.** Kovács MG, Kovács ZZA, Varga Z, Szűcs G, Freiwan M, Farkas K, et al. Investigation of the Antihypertrophic and Antifibrotic Effects of Losartan in a Rat Model of Radiation-Induced Heart Disease. *Int J Mol Sci.* **2021**;22(23):12963.
- 315.** Haudek SB, Cheng J, Du J, Wang Y, Hermosillo-Rodriguez J, Trial J, et al. Monocytic fibroblast precursors mediate fibrosis in angiotensin-II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* **2010**;49(3):499-507.
- 316.** Shi H, Wang H, Fu S, Xu K, Zhang X, Xiao Y, et al. Losartan Attenuates Scar Formation in Filtering Bleb After Trabeculectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2017**;58(3):1478-86.
- 317.** Murphy A, LeVatte T, Boudreau C, Midgen C, Gratzer P, Marshall J, et al. Angiotensin II Type I Receptor Blockade Is Associated with Decreased Cutaneous Scar Formation in a Rat Model. *Plast Reconstr Surg.* **2019**;144(5):803e-13e.
- 318.** Gay-Jordi G, Guash E, Benito B, Brugada J, Nattel S, Mont L, et al. Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise in an animal model. *PloS One.* **2013**;8(2):e55427.
- 319.** Shimada YJ, Passeri JJ, Baggish AL, O'Callaghan C, Lowry PA, Yannekis G, et al. Effects of losartan on left ventricular hypertrophy and fibrosis in patients with

- nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. *JACC Heart Fail.* **2013**;1(6):480-7.
- 320.** Lim DS, Lutucuta S, Bachireddy P, Youker K, Evans A, Entman M, et al. Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* **2001**;103(6):789-91.
- 321.** Lindsey ML, de Castro Brás LE, DeLeon-Pennell KY, Frangogiannis NG, Halade GV, O'Meara CC, et al. Reperfused vs. nonreperfused myocardial infarction: when to use which model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2021**;321(1):H208-13.
- 322.** Chen J, Ceholski DK, Liang L, Fish K, Hajjar RJ. Variability in coronary artery anatomy affects consistency of cardiac damage after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2017**;313(2):H275-82.
- 323.** Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2018**;314(4):H812-38.
- 324.** Wang L, Li J, Li D. Losartan reduces myocardial interstitial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting JAK/STAT signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* **2015**;8(1):466-73.
- 325.** Yamakawa H, Sato S, Ohta H, Kusano K, Kawabe R, Oba T, et al. Body weight loss is a simple and useful indicator of prognosis and predictive tolerability in the first year of nintedanib therapy in patients with interstitial lung disease. *Respir Investig.* **2024**;62(4):551-7.

BIBLIOGRAFÍA

- 326.** Tomioka H, Iwabayashi M, Yokota M, Hashimoto R, Amimoto H. Weight loss in nintedanib-treated patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* **2023**;80:102213.
- 327.** Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* **2016**;119(1):91-112.
- 328.** Kondo T, Takahashi M, Yamasaki G, Sugimoto M, Kuse A, Morichika M, et al. Immunohistochemical analysis of CD31 expression in myocardial tissues from autopsies of patients with ischemic heart disease. *Leg Med Tokyo Jpn.* **2022**;59:102127.
- 329.** Tjeerdsma G, de Boer RA, Boomsma F, van den Berg MP, Pinto YM, van Veldhuisen DJ. Rapid bedside measurement of brain natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* **2002**;86(2-3):143-9; discussion 149-152.
- 330.** Zaborska B, Sikora-Frąc M, Smarż K, Pilichowska-Paszkiel E, Budaj A, Sitkiewicz D, et al. The Role of Galectin-3 in Heart Failure-The Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential-Where Do We Stand? *Int J Mol Sci.* **2023**;24(17):13111.
- 331.** Nordeng J, Schandiz H, Solheim S, Åkra S, Hoffman P, Roald B, et al. TIMP-1 expression in coronary thrombi associate with myocardial injury in ST-elevation myocardial infarction patients. *Coron Artery Dis.* **2022**;33(6):446-55.
- 332.** Myhre PL, Claggett B, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Selvin E, Matsushita K, et al. NT-proBNP and Cardiac Troponin I, but Not Cardiac Troponin T, Are Associated With 7-Year Changes in Cardiac Structure and Function in Older Adults: The ARIC Study. *Circulation.* **2024**;150(23), 1847–1857.

- 333.** Osredkar J, Bajrić A, Možina H, Lipar L, Jerin A. Cardiac Troponins I and T as Biomarkers of Cardiomyocyte Injury—Advantages and Disadvantages of Each. *Appl Sci.* **2024**;14(14):6007.
- 334.** Kovács MG, Kovács ZZA, Varga Z, Szűcs G, Freiwan M, Farkas K, et al. Investigation of the Antihypertrophic and Antifibrotic Effects of Losartan in a Rat Model of Radiation-Induced Heart Disease. *Int J Mol Sci.* **2021**;22(23):12963.
- 335.** Li Y, Yao Y, Li J, Chen Q, Zhang L, Wang QK. Losartan protects against myocardial ischemia and reperfusion injury via vascular integrity preservation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* **2019**;33(7):8555-64.
- 336.** Pourdjabbar A, Parker TG, Nguyen QT, Desjardins JF, Lapointe N, Tsoporis JN, et al. Effects of pre-, peri-, and postmyocardial infarction treatment with losartan in rats: effect of dose on survival, ventricular arrhythmias, function, and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2005**;288(4):H1997-2005.
- 337.** Huang J, Beyer C, Palumbo-Zerr K, Zhang Y, Ramming A, Distler A, et al. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* **2016**;75(5):883-90.



ANEXOS

VIII. ANEXOS

Tabla 28. Valores de SCORE asignados de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental.

Grupo experimental	Ratón	Corte histológico, <i>SCORE</i>			Media <i>SCORE</i>
		Basal	Medio	Apical	
<i>SHAM</i>	Los ratones pertenecientes a este grupo experimental no mostraron inflamación en los cortes de tejido cardíaco, asignándoles el valor de 0				
VEHÍCULO	1	1	3	3	2.3
	2	1	2	2	1.6
	3	2	1	2	1.6
	4	1	1	1	1
	5	1	1	1	1
	6	1	1	1	1
NTB	1	2	3	3	2.6
	2	0	1	1	0.6
	3	1	2	X	1.5
	4	0	1	2	1
	5	1	2	1	1.3
	6	2	2	2	2
LOS	1	1	1	2	1.3
	2	1	1	1	1
	3	1	1	2	1.3
	4	1	0	1	0.6
	5	0	2	1	1
	6	0	4	0	1.3

ANEXOS

Tabla 29. Valores asignados tras la cuantificación de los depósitos de colágeno (% fibrosis) de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental.

Grupo experimental	Ratón	Corte histológico, % <i>fibrosis</i>			Media
		Basal	Medio	Apical	
SHAM	Los ratones (S.1 – S.4) no mostraron depósitos de colágeno en los cortes de tejido cardíaco.				
	5	0	0	1.21	0.40
VEHÍCULO	1	1.29	32.48	43.88	25.88
	2	4.78	18.12	16.43	13.11
	3	15.39	6.35	12.87	11.54
	4	6.20	7.35	12.84	8.80
	5	1.26	7.14	4.38	4.26
	6	0.41	2.39	18.97	7.26
NTB	1	15.79	31.42	35.19	27.46
	2	0	11.79	14.04	8.61
	3	2.08	26.57	18.91	15.86
	4	0	5.78	21.60	9.13
	5	4.55	19.45	15.21	13.07
	6	12.02	21.76	16.67	16.82
LOS	1	6.90	4.32	21.65	10.96
	2	2.37	2.56	3.19	2.71
	3	10.56	5.74	11.35	9.22
	4	6.45	0	7.86	4.77
	5	7.00	17.53	1.51	8.68
	6	0	68.37	0.57	22.98

Tabla 30. Valores asignados tras la cuantificación del índice de Ki67 de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental.

Grupo experimental	Ratón	Corte histológico, Índice Ki67			Media
		Basal	Medio	Apical	
SHAM	1	5.05	3.10	X	4.08
	2	3.31	3.22	2.17	2.90
	3	5.09	2.51	1.80	3.13
	4	3.68	X	3.11	3.40
	5	2.02	1.42	1.17	1.54
VEHÍCULO	1	1.61	1.74	1.00	1.43
	2	1.55	1.56	0.25	1.12
	3	4.78	2.28	1.22	2.76
	4	2.35	1.85	2.12	2.10
	5	1.65	2.20	1.97	1.94
	6	0.94	0.89	0.76	0.87
NTB	1	3.64	4.41	0.76	2.94
	2	1.40	1.66	1.03	1.36
	3	7.21	3.06	1.03	3.76
	4	0.80	1.67	1.58	1.35
	5	1.94	3.13	1.16	2.08
	6	0.84	0.90	0.96	0.90
LOS	1	1.82	1.74	0.84	1.47
	2	2.51	1.80	1.08	1.80
	3	5.92	2.38	2.83	3.71
	4	3.32	2.04	4.54	3.30
	5	1.96	X	1.53	1.75
	6	1.72	2.62	1.25	1.86

ANEXOS

Tabla 31. Valores asignados tras la cuantificación del número de vasos positivos para CD31 de cada uno de los cortes de tejido cardíaco de cada uno de los ratones pertenecientes a cada grupo experimental.

Grupo experimental	Ratón	Corte histológico, CD31 ⁺			Media
		Basal	Medio	Apical	
SHAM	1	29	15	9	18
	2	28	31	20	26
	3	25	25	9	20
	4	7	8	4	6
	5	7	13	2	7
VEHÍCULO	1	33	35	9	26
	2	42	40	44	42
	3	67	44	15	42
	4	22	19	15	19
	5	9	9	5	8
	6	18	22	1	14
NTB	1	41	60	18	40
	2	41	35	18	31
	3	32	39	34	35
	4	13	15	6	11
	5	18	13	11	14
	6	31	17	20	23
LOS	1	12	16	10	13
	2	23	16	5	15
	3	15	28	4	16
	4	9	10	5	8
	5	13	16	7	12
	6	15	22	0	12



CERTIFICADOS

IX. CERTIFICADOS



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Don Julio Palmero da Cruz, Secretario Técnico del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de comisión ordinaria (Acta nº367), de fecha 25 de marzo de 2021, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

Nº DE ORDEN: 2021/038

TÍTULO: Receptores P2X7 y respuesta inflamatoria vascular: desde la evidencia obtenida con Abacavir hasta la caracterización de nuevos mediadores protrombóticos

PROTOCOLO: versión 1 de fecha 7 de febrero de 2021

HIP/CI centro de transfusiones: versión 2 de fecha 10 de marzo de 2021

HIP/CI cordones umbilicales: versión 2 de fecha 10 de marzo de 2021

HIP/CI muestras sangre pacientes VIH: versión 3 de fecha 29 de marzo de 2021

PETICIÓN DE AYUDA A LA INVESTIGACIÓN: Proyectos I +D generación de conocimiento y proyectos I+D+I retos investigación

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia por el Dr. Juan Vicente Esplugues Mota y la Dra. Ángeles Álvarez Ribelles.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 30 de marzo de 2021

Fdo. Don Julio Palmero da Cruz

HOJA DE INFORMACIÓN AL DONANTE

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el estudio de investigación "receptores p2x7 y respuesta inflamatoria vascular: desde la evidencia obtenida con abacavir hasta la caracterización de nuevos mediadores protrombóticos" dirigido por el Dr. Juan Vicente Esplugues Mota y la Dra. Ángeles Álvarez Ribelles, en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de su centro, de acuerdo con la legislación vigente, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

Podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, por la Dra. Ángeles Álvarez Ribelles en el teléfono 963864898.

1. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

2. EL OBJETIVO DEL ESTUDIO ES ESTUDIAR NUEVAS VÍAS DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.

3. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Para llevar a cabo el objetivo del estudio extraeremos plaquetas o leucocitos de sangre de donantes sanos.

4. ACTIVIDADES DEL ESTUDIO

Durante la participación en este estudio, se extraerá una muestra de sangre al participante. La participación no requiere la realización de más visitas y pruebas de las que se realizarían si no participara en el estudio. La participación en el estudio no interfiere con el hecho de la donación.

5. RIESGOS Y MOLESTIAS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña muestra de sangre.

6. POSIBLES BENEFICIOS

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

7. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES

El investigador y el centro son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor, la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD).

8. INFORMACION RELATIVA A MUESTRAS BIOLÓGICAS

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas (muestra de sangre procedente de donante sano) con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011 de Biobancos, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten.

Al firmar este documento, revisado y evaluado favorablemente por el Comité de Ética de Investigación de su centro, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

8.1 Procedimientos de obtención de muestras, molestias y posibles riesgos

El tipo de muestra a obtener serán muestras de sangre procedente de donantes sanos que se obtendrán cuando vaya a donar sangre.

8.3. Lugar de análisis y almacenamiento de muestras

Durante el desarrollo del estudio sus muestras pueden ser analizadas en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Durante este proceso el responsable de las muestras será el promotor/investigador del estudio.

8.4. Implicaciones de la información obtenida al analizar las muestras

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios generales del presente estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Yo, _____ <<nombre y apellidos del participante>>

Edad _____, Sexo _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.

- Sin tener que dar explicaciones.

- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Consiento al uso y tratamiento de mis datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

☐ SI ☐ NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

☐ SI ☐ NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

☐ SI ☐ NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Firma del participante

Fecha: ____/____/____

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

PROCEDIMIENTO 2023-VSC-PEA-0200

Vista la solicitud realizada en fecha 21/07/23 con nº reg. entrada GVRTE/2023/3193517 por D/Dª. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Vicerrector de Investigación y Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

"Estudio del potencial efecto de fármacos anti-fibróticos sobre la fibrosis vascular"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

La realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2023-VSC-PEA-0200 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de València

Responsable del proyecto: Ana Blas García

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina - Campus Blasco Ibañez

Necesidad evaluación retrospectiva: No

Condiciones específicas: No

La presente resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma puede interponerse, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente al de su notificación o publicación, recurso de alzada ante el Secretario Autonómico de Agricultura y Desarrollo Rural, de conformidad con lo dispuesto en los artículos 121 y 122 de la Ley 39/2015, de 10 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

Valencia a, fecha de la firma electrónica

La directora general de Producción Agrícola y Ganadera

Firmat per Leticia Sanchiz Becquet el
15/10/2023 18:43:35
Càrrec: Directora General de Producción
Agrícola y Ganadera

