



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDADE: INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Curso académico 2020-2021

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Análisis de la Proteína Mitocondrial
Transportadora de Piruvato (MPC) como
posible biomarcador sanguíneo en pacientes
con Insuficiencia Cardíaca**

Paula López Vázquez

22 de Xullo de 2021

Relación de directores:

Nieves Doménech García

María Generosa Crespo Leiro

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

18S	<i>18S Ribosomal</i>
ACTB	<i>Actin Beta</i>
AD	Aurícula Derecha
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
AI	Aurícula Izquierda
ALT	Alanina Transaminasa
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato (<i><u>A</u>denosine <u>T</u>ri<u>P</u>hosphate</i>)
B2M	<i>Beta-2 Microglobulina</i>
BRP44	<i>Brain Protein 44</i>
BRP44L	<i>Brain Protein 44 Like</i>
CI	Cardiopatía Isquémica
CPT1B	<i>Carnitine O-PalmitoylTransferase 1B</i>
Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle Threshold</i>)
dNTPS	Desoxinucleótidos (<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>)
DO	Densidad Óptica)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylene Diamine Tetra Acetate</i>)
EEUU	Estados Unidos
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FADH	Flavín Adenín Dinucleótido reducido
GAPDH	<i>GlicerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>
H₂O	Agua
HPRT	Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase
HRP	Peroxidasa



IC	Insuficiencia Cardíaca
IMM	Membrana mitocondrial interna (<i>Inner Mitochondrial Membrane</i>)
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MD	Miocardiopatía Dilatada
MDI	Miocardiopatía Dilatada Idiopática
MH	Miocardiopatía Hipertrófica
mL	mililitros
MPC	Proteína Mitocondrial Transportadora de Piruvato (<i>Mitochondrial Pyruvate Carrier</i>)
N	Tamaño muestral
NADH	Nicotín Adenín Dinucleótido reducido
nts	Nucleótidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDH	Piruvato Deshidrogenasa
PDK	Piruvato Deshidrogenasa quinasa
pg	Picogramos
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RNaseH	Ribonucleasa H
RPL13A	<i>Ribosomal Protein L13a</i>
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real
SOD2	<i>SuperOxide Dismutase 2</i>
ST	Sangre total
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (<i>TriCarboxilic Acid</i>)
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
VD	Ventrículo Derecho
VI	Ventrículo Izquierdo
µg	microgramos
µL	microlitros

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	4
1.1	Fisiología cardiovascular	4
1.1.1	Bioenergética mitocondrial	6
1.2	Insuficiencia cardíaca (IC)	8
1.2.1	Cardiopatía Isquémica (CI)	8
1.2.2	Miocardopatía Hipertrófica (MH)	8
1.2.3	Miocardopatía Dilatada Idiopática (MDI)	9
1.3	Proteína Mitocondrial Transportadora de Piruvato	10
1.3.1	MPC y su relación con la IC	12
1.3.2	Datos previos propios del grupo de investigación	13
2	OBJETIVO	14
3	METODOLOGÍA	15
3.1	Muestras	15
3.1.1	Obtención y procesado de las muestras sanguíneas	15
3.2	Análisis de la expresión génica	16
3.2.1	Extracción de ARN y cuantificación	16
3.2.2	Retrotranscripción (RT)	17
3.2.3	Selección de los genes de estudio	20
3.2.4	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	21
3.2.5	Análisis estadístico	24
3.3	Análisis de la expresión proteica	24
3.3.1	Cuantificación proteica de MPC1	25
3.3.2	Cuantificación proteica de MPC2	27
4	RESULTADOS	30
4.1	Selección de donantes	30
4.2	Análisis de la expresión génica	30
4.2.1	Extracción, cuantificación y RT	30
4.2.2	Determinación de los genes de referencia mediante <i>geNorm</i>	31
4.2.3	Selección de los genes de interés	32
4.2.4	Niveles de expresión génica de <i>MPC1</i> y <i>MPC2</i>	32
4.2.5	Niveles de expresión génica de <i>SOD2</i> y <i>CPT1B</i>	35

4.3	Análisis de la expresión proteica	37
4.3.1	Niveles de expresión proteica de MPC1	37
4.3.2	Niveles de expresión proteica de MPC2	38
5	DISCUSIÓN	39
6	CONCLUSIONES	43
7	AGRADECIMIENTOS	44
8	BIBLIOGRAFÍA	45
9	ANEXOS	49
9.1	ANEXO I: Consentimiento informado Colección ICA-TC	49

RESUMEN

Introducción. La actividad de la Proteína Mitocondrial Transportadora de Piruvato (MPC) determina si el piruvato se oxida en las mitocondrias o, por el contrario, se metaboliza en el citosol. Se sabe que, en la Insuficiencia Cardíaca (IC), una gran cantidad del piruvato es metabolizado a lactato en el citosol en vez de seguir la ruta mitocondrial, por lo que se ha observado una disminución general del metabolismo mitocondrial en este tipo de patologías. **Objetivo.** Vista la relación existente entre el metabolismo mitocondrial y la disfunción cardíaca, y la regulación de la expresión de las subunidades de MPC observada en los tejidos cardíacos de pacientes con IC, el objetivo principal de este trabajo ha sido analizar la expresión génica y proteica de las moléculas MPC1 y MPC2 en muestras sanguíneas, para así poder estudiar su posible uso como biomarcadores. **Metodología.** Las muestras utilizadas provenían de 4 grupos de donantes: pacientes con cardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática o miocardiopatía hipertrófica; y donantes sin patología cardíaca. Se ha realizado el análisis de la expresión génica en muestras de sangre total mediante la técnica de RT-qPCR, previa extracción de los ácidos nucleicos. El análisis de la expresión proteica se ha llevado a cabo mediante la técnica ELISA, usando como muestra el plasma obtenido de sangre total. Los análisis estadísticos se realizaron con *GraphPad Prism v8* y *RCommander v4*. **Resultados.** El análisis de expresión génica de *MPC1* y *MPC2* no reflejó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados, salvo entre los grupos MH y MDI una vez eliminado un dato atípico influyente del primer grupo. La cuantificación de estas moléculas en plasma reflejó resultados no detectables para MPC1, pero en el caso de MPC2 se puede apreciar gráficamente un mayor nivel proteico en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática con respecto al resto de los grupos. **Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren que MPC no es un buen candidato como biomarcador sistémico de IC.

RESUMO

Introdución. A actividade da Proteína Mitocondrial Transportadora de Piruvato (MPC) determina si o piruvato se oxida nas mitocondrias ou, pola contra, se metaboliza no citosol. Sábese que, na Insuficiencia Cardíaca (IC), unha gran cantidade de piruvato é metabolizado en lactato no citosol no canto de seguir a vía mitocondrial, polo que se observou unha diminución xeral do metabolismo mitocondrial neste tipo de patoloxía.

Obxectivo. Vista a relación entre o metabolismo mitocondrial e a disfunción cardíaca, e a regulación da expresión das subunidades MPC observadas nos tecidos cardíacos de pacientes con IC, o obxectivo principal deste traballo foi analizar a expresión xénica e proteica das moléculas MPC1 e MPC2 en mostras sanguíneas, para así poder estudar o seu posible uso como biomarcadores.

Metodoloxía. As mostras empregadas proviñan de 4 grupos de doantes: pacientes con cardiopatía isquémica, miocardiopatía idiopática dilatada ou miocardiopatía hipertrófica; e doantes sen patoloxía cardíaca. A análise da expresión xénica realizouse en mostras de sangue total usando a técnica RT-qPCR, previa extracción dos ácidos nucleicos. A análise da expresión proteica levouse a cabo mediante a técnica ELISA, empregando como mostra o plasma obtido do sangue total. Realizáronse análises estatísticas con *GraphPad Prism v8* e *RCommander v4*.

Resultados. A análise da expresión xénica de MPC1 e MPC2 non reflectiu diferencias estatisticamente significativas entre os grupos analizados, salvoentre os grupos MH e MDI unha vez eliminado un dato atípico influente do primeiro grupo. A cuantificación destas moléculas en plasma reflectiu resultados non detectables para MPC1, pero no caso de MPC2 pódese apreciar gráficamente un maior nivel proteico en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática con respecto ao resto dos grupos.

Conclusións. Os nosos resultados suxiren que MPC non é un bo candidato como biomarcador sistémico de IC.

ABSTRACT

Introduction. Mitochondrial Pyruvate Carrier (MPC) activity determines whether the pyruvate is oxidized in the mitochondria or, on the contrary, metabolized in the cytosol. It is known that, in Heart Failure (HF), a large amount of pyruvate is metabolized to lactate in the cytosol instead of following the mitochondrial pathway, so a general decrease in mitochondrial metabolism has been observed in this type of pathology. **Objective.** Given the relationship between mitochondrial metabolism and cardiac dysfunction, and the regulation of MPC subunit expression observed in cardiac tissues of patients with HF, the main objective of this study was to analyze the gene and protein expression of MPC1 and MPC2 molecules in blood samples, in order to study their possible use as biomarkers. **Methodology.** The samples used came from 4 groups of donors: patients with ischemic heart disease, idiopathic dilated cardiomyopathy or hypertrophic cardiomyopathy; and donors without cardiac pathology. Gene expression analysis was performed in whole blood samples by RT-qPCR, after the extraction of nucleic acids. The analysis of protein expression was carried out by ELISA, using plasma obtained from whole blood as a sample. Statistical analyses were performed with *GraphPad Prism v8* and *RCommander v4*. **Results.** The gene expression analysis of MPC1 and MPC2 did not show statistically significant differences between the groups analyzed, except between the MH and MDI groups after removing an influential outlier from the first group. The quantification of these molecules in plasma showed undetectable results for MPC1, but in the case of MPC2, a higher protein level can be seen graphically in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy compared to the rest of the groups. **Conclusions.** Our results suggest that MPC is not a Good candidate as s systemic biomarker of HF.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 FISIOLÓGÍA CARDIOVASCULAR

El sistema sanguíneo (también denominado aparato cardiovascular) es, junto al sistema linfático, uno de los 2 componentes del sistema circulatorio humano, y es el encargado de repartir nutrientes a todas las células del cuerpo, así como de recoger los desechos (1). También realiza otras funciones importantes como la distribución sistémica de hormonas o el control del intercambio de calor entre el cuerpo y el ambiente externo (2). Está formado por los vasos sanguíneos que transportan la sangre, y el corazón, que la impulsa.

Los vasos sanguíneos se clasifican en: venas, arterias y capilares. Las arterias son los vasos que salen del corazón hacia: los pulmones (sangre desoxigenada); y hacia el resto del cuerpo (sangre oxigenada). Por otro lado, las venas son los vasos que llevan la sangre al corazón desde: los pulmones (sangre oxigenada); y desde el resto del cuerpo (sangre desoxigenada). Por último, los capilares son pequeños vasos que comunican las arterias con las venas. Son muy finos, y en ellos ocurre el verdadero intercambio (1). Este circuito se representa de forma simple en la Figura 1.

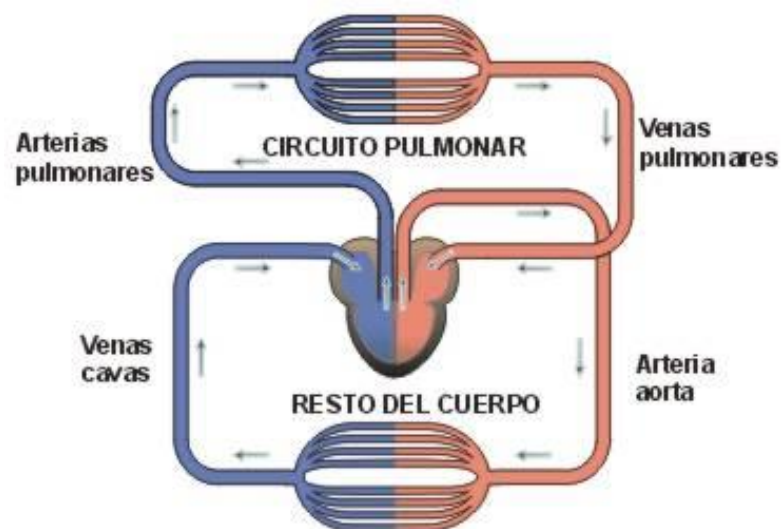


Figura 1. Representación del aparato cardiovascular. Fuente: Slideshare.
(<https://es.slideshare.net/enalto/aparato-circulatorio-eat-2014-29726585>)

El corazón es un órgano formado por músculo estriado cardíaco (miocardio, formado principalmente por miocitos) irrigado por las arterias coronarias (derecha e izquierda), y distribuido en cuatro cavidades, dos aurículas y dos ventrículos. Contiene una membrana interior endotelial (endotelio) y una membrana exterior fibroserosa (pericardio).

El miocardio presenta a su vez las fibras de Purkinje (células cardioconectoras de tipo muscular), gracias a las cuales el corazón se contrae y relaja rítmicamente. El latido refleja la contracción de los ventrículos a un ritmo marcado por las descargas eléctricas del nódulo sinusal (donde se inicia esta contracción), es decir, actúa como marcapasos (Figura 2). Situado en la parte superior de la aurícula derecha e inervado por el Sistema Nervioso Autónomo, el nódulo sinusal transmite el impulso hacia el nódulo auriculoventricular desde el cual, y gracias a las fibras de Purkinje (agrupadas en el haz de His), se transmite de las aurículas a los ventrículos.

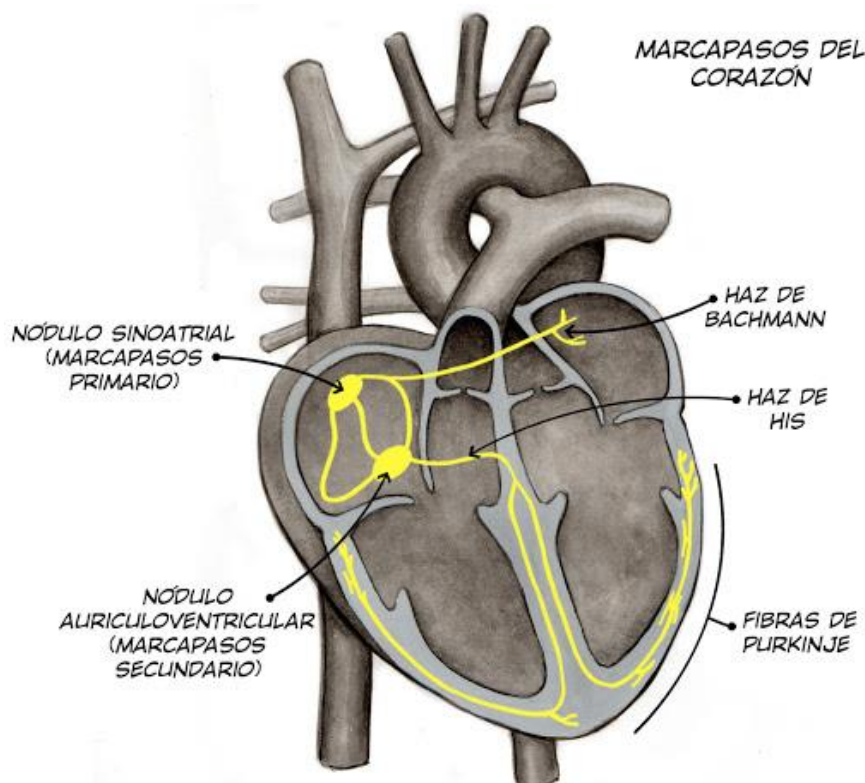


Figura 2. Representación del circuito eléctrico del corazón. Fuente: Facebook.
(<https://www.facebook.com/755317431238947/photos/sistema-de-conducci%C3%B3n-el%C3%A9ctrica-del-coraz%C3%B3n-el-sistema-de-conducci%C3%B3n-el%C3%A9ctrica-de/1033505756753445/>)

Diferenciamos así dos estados: sístole (contracción) y diástole (relajación). En la diástole general, las aurículas y ventrículos se dilatan, gracias a la relajación de la musculatura, y esto permite que la sangre entre en las aurículas. Tanto en la sístole auricular como en la sístole ventricular, las cavidades se contraen para permitir la salida de la sangre: primero de las aurículas hacia los ventrículos; y después de estos al resto del cuerpo (1). De esta forma, el corazón es en realidad un complejo de dos bombas conectadas en serie: el hemicardio izquierdo (compuesto por la aurícula (AI) y el ventrículo (VI) izquierdos separados por la válvula mitral) encargado del circuito de la sangre oxigenada; y el hemicardio derecho (formado por la aurícula (AD) y el ventrículo (VD) derechos conectados por la válvula tricúspide) encargado del bombeo de la sangre desoxigenada (2).

1.1.1 Bioenergética mitocondrial

Para su correcto funcionamiento, el corazón depende estrechamente de la energía oxidativa generada en las mitocondrias, principalmente a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos, de la cadena respiratoria de electrones y de la fosforilación oxidativa (3). Hasta el 95% de la generación de ATP (Adenosín Trifosfato, del inglés *Adenosine TriPhosphate*) del corazón proviene de la oxidación mitocondrial, y aproximadamente el 60-90% de esta producción de ATP mitocondrial proviene de ácidos grasos, mientras que el 10-40% proviene de la oxidación de piruvato (4).

Por ser un tejido de gran demanda energética, las mitocondrias son muy abundantes en los miocitos, donde constituyen un 20-40% del volumen celular. Los ácidos grasos son el principal sustrato energético para la producción de ATP en el músculo cardíaco a partir de la fosforilación oxidativa. La betaoxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los hidratos de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (o ciclo de Krebs, ciclo TCA del inglés *TriCarboxylic Acid*, Figura 3) genera la mayor parte del NADH (Nicotín Adenín Dinucleótido reducido) y FADH (Flavín Adenín Dinucleótido reducido) intramitocondriales, que son la fuente directa de electrones para la cadena de transporte respiratoria. El aporte de ATP a

partir de otras fuentes (p. ej., el metabolismo glucolítico) es limitado en el tejido cardiaco normal (3).

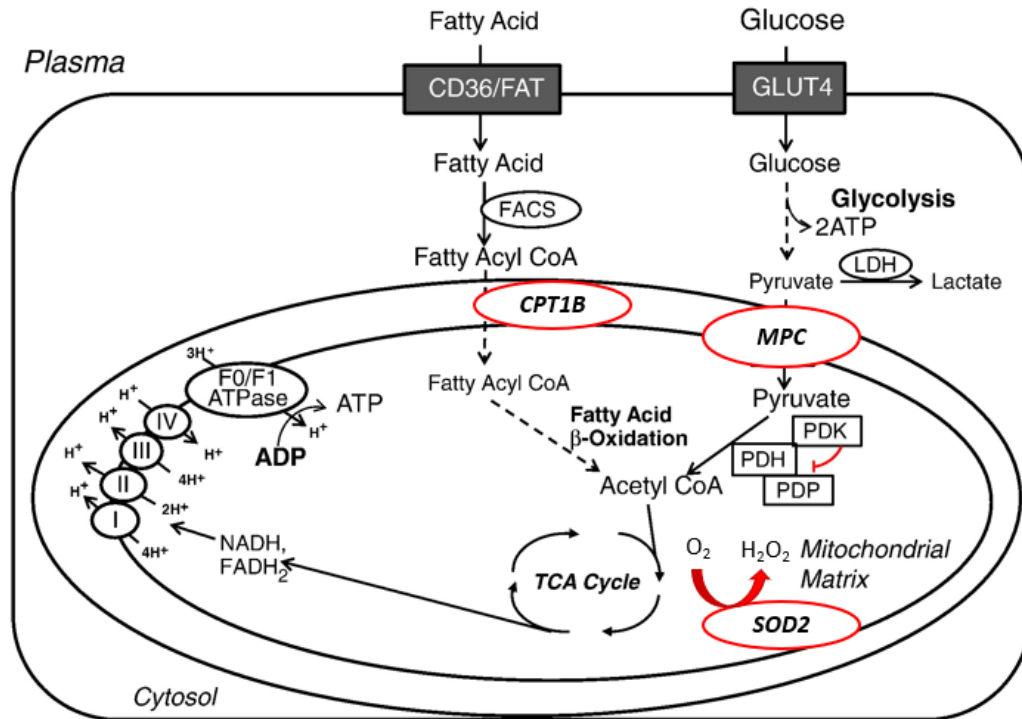


Figura 3. Representación esquemática de las vías metabólicas que suceden en la mitocondria a partir de la captación de ácidos grasos y de glucosa. Enmarcadas en rojo están las moléculas de interés de este trabajo. Imagen tomada y modificada de Filmore & Lopaschuk (30).

En condiciones normales, el corazón genera aproximadamente el 70% de su energía a partir de los ácidos grasos y el 30% restante de los carbohidratos (5). Sin embargo, el corazón puede cambiar la contribución relativa de estos sustratos en un esfuerzo por adaptarse a diferentes condiciones fisiológicas. En condiciones de baja cantidad de oxígeno como isquemia e insuficiencia cardiaca, se cree que el contenido de ATP decrece tanto como un 40% (6). En estos casos, se reduce el flujo de la fosforilación oxidativa, y la glucólisis anaeróbica se convierte en el metabolismo principal para la síntesis de ATP (7).

1.2 INSUFICIENCIA CARDIACA (IC)

La IC se define como la incapacidad del corazón para bombear suficiente flujo sanguíneo como para cumplir las demandas metabólicas del cuerpo. Sus causas pueden ser no cardíacas (p. ej., perfusión tisular inadecuada o aumento de las demandas metabólicas) o cardíacas (cardiopatías).

La IC puede ser la última manifestación y la más grave de casi cualquier forma de cardiopatía, incluidas aterosclerosis coronaria, infarto de miocardio, valvulopatías, hipertensión, cardiopatías congénitas y miocardiopatías.

1.2.1 Cardiopatía Isquémica (CI)

La CI consiste en una patología en la que el desequilibrio entre el aporte de oxígeno al miocardio y la demanda de éste se traduce en hipoxia miocárdica y acumulación de metabolitos de desecho. En la mayor parte de las veces la causa es la patología aterosclerótica de las arterias coronarias provocando la denominada enfermedad arterial coronaria.

La presentación clínica de la CI puede ser muy variable, aunque la angina de pecho continúa siendo la manifestación más frecuente, la cual se define como una sensación molesta en el pecho y estructuras circundantes (8).

Cuando el suplemento de oxígeno es limitado, la fosforilación oxidativa y el flujo del transporte electrónico declinan, se produce una depleción rápida de las reservas de creatina fosfato, disminuye la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos y se deteriora la producción de ATP. La hidrólisis del ATP derivado de la glucólisis y la acumulación de lactato conducen a una disminución del pH intracelular y al desarrollo de acidosis intracelular, lo que ejerce un efecto inhibitorio directo sobre la función contráctil. La isquemia sostenida acaba por producir depleción de ATP y muerte celular necrótica (3).

1.2.2 Miocardiopatía Hipertrófica (MH)

La MH se caracteriza por hipertrofia (engrosamiento irregular) ventricular izquierda o hipertrofia del tabique ventricular (Figura 4) cuya causa no es la

sobrecarga de presión crónica (8). Es un diagnóstico de exclusión, tras descartar causas secundarias como hipertensión sistémica, estenosis aórtica valvular o miocardiopatía infiltrativa. Un engrosamiento de la pared mayor o igual a 15 mm es compatible con el diagnóstico de MH (9). En este trastorno, la función contráctil sistólica del VI es intensa, pero el músculo está rígido, lo cual conlleva deterioro de la relajación ventricular y presiones diastólicas elevadas (8).

Se trata de una enfermedad cardiovascular hereditaria común presente en 1 de cada 500 personas (10) con estudios recientes que sugieren una prevalencia aún mayor (9). Presenta una clínica muy heterogénea: es la causa más frecuente de muerte súbita en persona jóvenes (sobre todo atletas) y puede causar IC y accidente cerebrovascular. Sin embargo, es posible que la mayoría de las personas afectadas no experimenten síntomas o reducción de la esperanza de vida (10).

1.2.3 Miocardiopatía Dilatada Idiopática (MDI)

La Miocardiopatía Dilatada (MD) se caracteriza por la dilatación de la cavidad ventricular y el deterioro de la función contráctil sistólica (Figura 4). Esta lesión miocítica se debe a un amplio espectro de causas genéticas (en el 30-48% de los casos, (11)), tóxicas y metabólicas, aunque la mayor parte de los casos son idiopáticos (es decir, se desconoce la causa). Es habitual que en la MD ambos ventrículos estén deteriorados, aunque en ocasiones se limita al VI y es poco frecuente que el afectado sea el VD (8,11). A medida que el volumen sistólico ventricular y el gasto cardiaco disminuyen, se activan efectos compensatorios. Debido a esto, el paciente puede permanecer asintomático durante las primeras fases de la disfunción; no obstante, a medida que avanza la degeneración miocítica progresiva y la sobrecarga de volumen, se manifiestan los síntomas de la IC (8). Los pacientes con tratamiento crónico a veces presentan IC descompensada.

Otros riesgos potencialmente mortales son las arritmias ventriculares, el síncope y la muerte súbita (11).

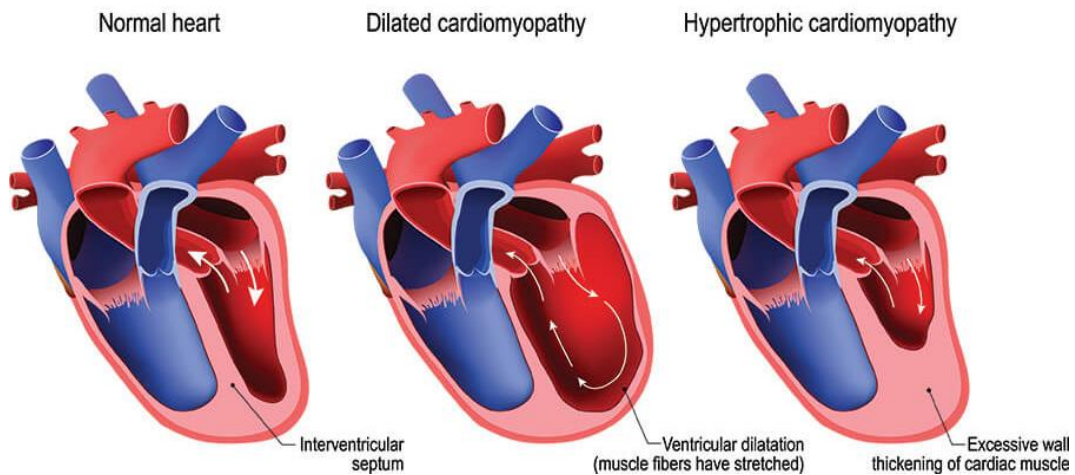


Figura 4. Representación gráfica de las alteraciones morfológicas de la MH y la MD, en comparación con la morfología normal de un corazón sano. Fuente: Advanced Cardiovascular Institute. (<https://www.advancedcardiovascular.org/services-williamsburg/common-cardiac-conditions/dilated-cardiomyopathy/>)

La MD es la causa principal de fallo cardíaco que conlleva un trasplante cardíaco, debido a un carácter progresivo y casi siempre irreversible, con una tasa de mortalidad del 20% al primer año y del 56% a los 4 años (12).

1.3 PROTEÍNA MITOCONDRIAL TRANSPORTADORA DE PIRUVATO

Como se ha dicho previamente, la β -oxidación es el metabolismo mayoritario en los cardiomiocitos, pero cuando hay una restricción del suministro de oxígeno como consecuencia de una cardiopatía, se reduce el flujo de la fosforilación oxidativa y la glucólisis anaeróbica se convierte en el metabolismo principal para la síntesis de ATP. El piruvato es el producto final de la glucólisis, un sustrato principal para el metabolismo oxidativo y un punto de ramificación para la síntesis de glucosa, lactato, ácidos grasos y aminoácidos.

Otras fuentes de piruvato citosólico son a través de la oxidación de lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), a partir del malato mediante la enzima málica citosólica o del aminoácido alanina mediante la enzima alanina transaminasa (ALT). En la mayoría de los tejidos, gran parte del

piruvato citosólico generado por estas vías se importa a las mitocondrias para su oxidación completa a través del ciclo TCA (13).

Las enzimas mitocondriales que metabolizan el piruvato están físicamente separadas de las fuentes de piruvato citosólico y dependen de un sistema de transporte de membrana para transportar el piruvato a través de la membrana mitocondrial interna impermeable (IMM del inglés, *Inner Mitochondrial Membrane*).

Se ha tardado casi 40 años en determinar la identidad molecular de este portador de piruvato. A principios de los años 70, algunos estudios (14) ya predijeron la existencia de una proteína transportadora del piruvato. Sin embargo, no fue hasta el 2012 (15,16) cuando la proteína mitocondrial transportadora de piruvato (MPC del inglés, *Mitochondrial Pyruvate Carrier*) fue descubierta. Estos 2 grupos de investigación independientes utilizaron enfoques genéticos y bioinformáticos para identificar un complejo heterooligomérico de proteínas integrales de membrana ahora denominado MPC1 y MPC2 (anteriormente conocidos como Brp44L y Brp44 respectivamente, del inglés *Brain Protein 44 Like* y *Brain Protein 44*).

Desde su descubrimiento, la MPC ha sido objeto de extensos artículos de investigación y revisión que detallan aspectos claves de su estructura, función, regulación y sus diversos roles en la salud y la enfermedad (17).

En resumen, actualmente se conoce que este complejo heterooligomérico (MPC1 y MPC2) es necesario para la oxidación y la carboxilación del piruvato mitocondrial, reacciones críticas en el metabolismo intermediario que están desreguladas en varias enfermedades comunes. La identificación de estos componentes transportadores abre la puerta a la identificación de nuevos compuestos con una utilidad potencial para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades como diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otras causas comunes de morbilidad y mortalidad (18).

1.3.1 MPC y su relación con la IC

La actividad de la MPC, que está controlada por su abundancia (retroalimentación) y por regulación postraduccional, determina si el piruvato se oxida en las mitocondrias o, por el contrario, se metaboliza en el citosol. De esta forma, sirve como un punto de ramificación metabólica crucial, lo que permite adaptaciones durante la salud e incluso en la enfermedad (Figura 5).

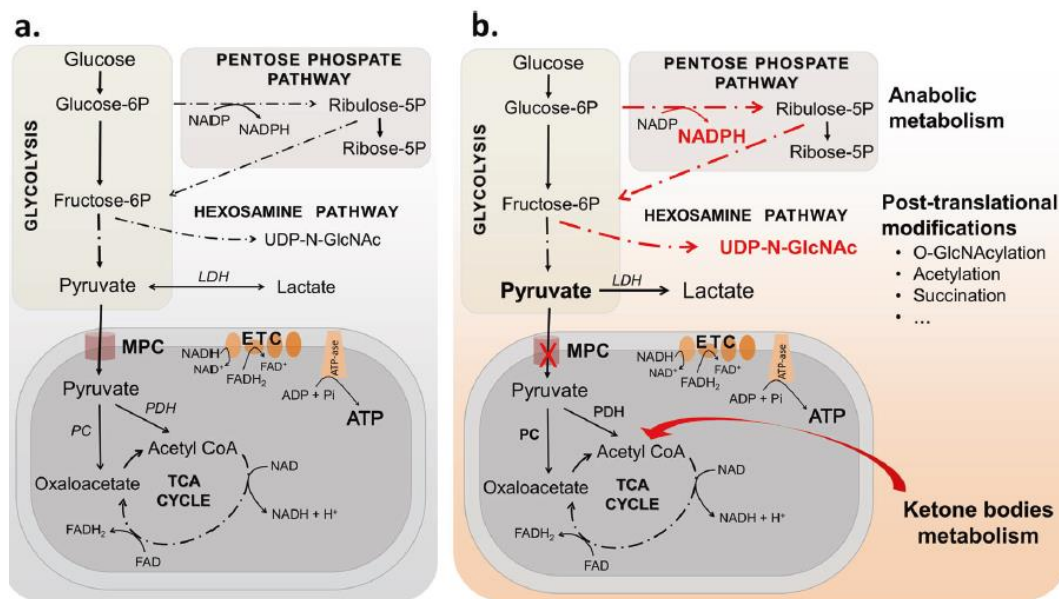


Figura 5. a) MPC como un punto de ramificación metabólica. **b)** Remodelación metabólica ante un posible déficit de MPC. Fuente: Fernández-Caggiano & Eaton (19).

Se sabe que, en la IC, una gran cantidad del piruvato es metabolizado a lactato en el citosol, en vez de seguir la ruta mitocondrial (19). Se ha observado una disminución general del metabolismo mitocondrial en la IC crónica descompensada (20,21), observándose disminuciones específicas en la oxidación del piruvato (22). Se cree que esto se debe a la disminución de la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) causada por el aumento de la expresión de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), que inactiva la PDH (23). Sin embargo, la actividad de la MPC también podría estar involucrada, lo que hace de interés su investigación en este contexto.

Resultados recientes (24) mostraron una reducción tanto en la expresión de MPC1 como MPC2 en VI de individuos con IC respecto a individuos sanos, lo que sugiere una reducida capacidad de absorción de piruvato en la mitocondria y conversión de este a acetil-CoA. Otros autores (25), observaron el papel de MPC bajo condiciones de hipoxia en células endoteliales (que dependen de la glucólisis para generar energía), demostrando que la hipoxia puede inducir la secreción de lactato y el flujo glucolítico mediante la reducción de los niveles de MPC.

1.3.2 Datos previos propios del grupo de investigación

El grupo de investigación, con el cual se ha realizado este estudio en colaboración, posee una larga experiencia en el estudio de la expresión de la MPC en IC. En 2016 (26) mediante un modelo de isquemia/reperfusión (I/R) en cerdo, identificaron un incremento en *MPC1* y *MPC2* en el tejido sano adyacente a la zona necrótica, lo que indica una inversión en el patrón metabólico para la obtención de energía en forma de ATP. Otro estudio más reciente demostró que la reducción de estas proteínas mediaba la remodelación adversa cardiaca hipertrófica y posterior evolución hacia fallo cardiaco (27). Resultados del grupo sin publicar (TFM realizado por F. Regueira) utilizando tejido cardiaco humano de pacientes con IC de diverso origen, confirman la disminución de la expresión de MPC1 y MPC2 en esta enfermedad, siendo este descenso diferente según la patología desencadenante de la IC.

En conclusión, la expresión reducida del complejo MPC se suele asociar con características clínicas desfavorables, convirtiéndolo en un posible biomarcador pronóstico de diversas enfermedades, entre ellas las cardiopatías descritas en este trabajo.

2 OBJETIVO

Vista la relación existente entre el metabolismo mitocondrial y la disfunción cardíaca, y la regulación de la expresión de las subunidades de MPC observada en los tejidos cardíacos de pacientes con IC, el objetivo principal de este trabajo ha sido analizar la expresión génica y proteica de las subunidades MPC1 y MPC2 en muestras sanguíneas de estos pacientes, para así poder estudiar su posible uso como biomarcadores.

3 METODOLOGÍA

3.1 MUESTRAS

Todas las muestras biológicas y los datos asociados procedentes de los pacientes con IC de diferente origen patológico pertenecen a la “Colección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante” inscrita en la sección de colecciones del Registro Nacional de Biobancos con Código Registro C.0000419, y autorizada por el Comité Ético de Investigación de Galicia con Código Registro: 2012/348 (se adjunta copia del consentimiento informado, ANEXO I). Esta colección pertenece al Grupo de Investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada (ICA) y Trasplante Cardíaco (TC) englobado en la unidad de investigación de Enfermedades Cardiovasculares del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). En el grupo de investigación se cuenta con una aplicación informática de Gestión de Muestras y Datos (Noraybanks) que permite controlar la trazabilidad de las muestras de una manera automatizada para evitar lo máximo posible la tramitación manual de códigos y de información asociada a las muestras, y que cumple la Ley Orgánica de Protección de Datos (LO 3/2018).

Por otro lado, las muestras biológicas y los datos asociados procedentes de los donantes no patológicos del grupo control (donantes sanos, haciendo referencia a que no sufren patologías graves, incluidas de forma específica las cardiovasculares) fueron cedidas por el Biobanco Vasco/Nodo BioCruces Bizkaia (con Código Registro de Biobancos B.0000140) para el estudio de expresión génica, y por el Biobanco de la Universidad de Navarra (con Código Registro de Biobanco B.0000612) para el estudio de la expresión proteica.

3.1.1 Obtención y procesado de las muestras sanguíneas

Se utilizaron muestras de sangre total (ST) anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *Ethylene Diamine Tetra Acetate*) obtenidas mediante la técnica de venopunción en consulta. Posteriormente,



en el laboratorio, parte de esta sangre se alicuotó en tubos *ependorf*, y el resto se centrifugó a 2.000xg durante 15 minutos (min) para obtener el plasma. Tanto las alícuotas de ST como de plasma fueron conservadas en ultracongelador a -80°C hasta su utilización para esta investigación.

3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.2.1 Extracción de ARN y cuantificación

Para el estudio de la expresión génica se utilizaron muestras de ST. El primer paso para el análisis de la expresión génica en una muestra biológica consistió en la extracción del ARN. Para ello, se utilizó el kit comercial *RiboPure-Blood* de Invitrogen (*Thermo Fisher Scientific*, EE. UU.) cuyo protocolo consiste en diversos pasos explicados a continuación:

- A 500 microlitros (μL) de muestra, añadir 800 μL de Solución de lisis y 50 μL de Solución de Acetato sódico. Agitar 30 segundos (s).
- Añadir 250 μL de Fenol:Cloroformo. Agitar 30s. Incubar 5 minutos (min) a temperatura ambiente (TA). Centrifugar 1 min, TA, 16.000xg.
- Trasvasar 600 μL del sobrenadante a 2 tubos *ependorf low binding* de 2 mL. Añadir 300 μL de etanol 100°. Agitar 10s. Centrifugar 5s.
- Trasvasar 700 μL de la muestra a la columna con filtro colector del kit colocada en un tubo colector para recoger el descarte. Centrifugar 5-10s. Descartamos el líquido filtrado y nos quedamos con el filtro, ya que es donde queda retenido el ARN. Repetir este proceso hasta que haya filtrado la muestra de los 2 tubos *ependorf*.
- Añadir al filtro 700 μL de Solución de lavado 1. Centrifugar. Descartar líquido.
- Añadir al filtro 700 μL de Solución de lavado 2/3. Centrifugar. Descartar líquido. Repetir este paso. Centrifugación final de 1 min a 16.000xg para secar bien el filtro.
- Trasferir el filtro a un *ependorf* estéril del kit y añadir 30 μL de Solución de elución precalentada a 75°C. Incubar 20s a TA. Centrifugar 20s. En este caso no descartamos el líquido, ya que es

lo que no interesa, debido a que estamos haciendo eluir el ARN del filtro. Volvemos a pasar por el filtro el líquido recuperado. Centrifugar 20s. Centrifugación final 1 min. para recuperar la mayor cantidad posible.

Guardar rápidamente la muestra a 4°C para evitar su degradación. Durante todo este protocolo, se debe trabajar en cabina de flujo laminar, en ambiente estéril, así como utilizar tubos y puntas estériles y con filtro.

Una vez obtenido el ARN eluido, se realizó la medición de su concentración y pureza mediante espectrofotometría. Para ello, utilizamos el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific*, EE. UU.), el cual mide la absorbancia del ARN a 260 nanómetro (nm). La pureza de la muestra se determinó mediante las ratios 260/280 y 260/230, los cuales indican contaminación por proteínas, compuestos fenólicos y otros compuestos que absorben a esas longitudes de onda. Ambos valores deben ser cercanos a 2. Se apuntaron todos estos resultados para posteriores cálculos y consideraciones.

3.2.2 Retrotranscripción (RT)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) está valorada como una de las más sensibles y específicas de las técnicas moleculares. El fundamento de esta técnica se basa en una replicación exponencial in vitro de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc) mediante ciclos repetidos a tres temperaturas distintas. En cada uno de estos ciclos el ADN se duplica hasta que los reactivos se agotan. La PCR se basa en una secuencia que le sirve de molde, y por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. La síntesis de la nueva cadena sigue la dirección 5'-3', ya que necesita de un nucleótido con el extremo 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se genera el enlace fosfodiéster. Para que esta reacción se lleve a cabo, se necesita una cadena de ADNg o ADNc que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa (sintetiza la nueva cadena), cofactores para que la enzima realice su función correctamente,

desoxinucleótidos (dNTPs) para la síntesis de la nueva cadena y cebadores (secuencias específicas que se emplean para delimitar e identificar por complementariedad secuencias blanco en la cadena molde). Los cebadores reciben el nombre de *Sentido* y *Antisentido*, dependiendo de la secuencia a la que da origen. El cebador *Sentido* es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del ADNc, por lo que la polimerasa, al añadir nucleótidos a partir de él, da lugar a una cadena de sentido 5'-3'. Por el contrario, el cebador *Antisentido* es complementario y antiparalelo a la cadena 5'-3', por lo que su polimerización dará lugar a la cadena 3'-5'.

La RT es una variante de la PCR convencional. Consiste en una PCR inversa, mediante la cual obtenemos ADNc a partir de nuestra muestra de ARN mediante el uso de una transcriptasa inversa obtenida de los retrovirus (familia *Retroviridae*). La realización consecutiva de una RT y una PCR se denomina RT-PCR.

Para llevar a cabo la RT, utilizamos el kit *NZY First-Strand DNA Synthesis Kit* (NZYtech, Portugal) y un termociclador *T100 Thermal Cycler* (Biorad, EE. UU.). El protocolo de este kit nos permite retrotranscribir desde un mínimo de 10pg (picogramos) hasta un máximo de 5µg (microgramos) de ARN. Los reactivos incluidos en este kit son:

- I. ***NZYRT Máster Mix***: cebadores, dNTPs, MgCl₂ y Buffer.
- II. ***NZYRT Enzyme Mix***: *NZY Reverse Transcriptase* (Transcriptasa inversa) y *NZY Ribonuclease Inhibitor* (protege al ARN contra la degradación).
- III. ***NZY RNase H (E. coli)***.
- IV. ***DEPC.treated H₂O***.

Este protocolo consta de 2 fases: en un primer paso, se produce la síntesis y amplificación del ADNc; mientras que el segundo paso consiste en la degradación del ARN de los híbridos ARN:ADNc, de forma que obtengamos una muestra pura. Este procedimiento aumentará la sensibilidad de la subsiguiente PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que

realizaremos para el análisis de la expresión génica, ya que los cebadores de dicha reacción se unirán más fácilmente al ADNc.

Tabla I. Volúmenes utilizados para la realización de una RT a partir de 500 ng de ARN.

Reactivo	Volumen (μL)
NZYRT Enzyme Mix	2
NZYRT Máster Mix	10
ARN (hasta 8μL)	X (500ng)
DEPC-treated H₂O	X hasta Vt=20

Para la primera fase, se prepararon y calcularon los volúmenes indicados en la Tabla I y se pipetearon en un microtubo de PCR de 0,2mL. El volumen de ARN necesario se calculó a partir de la concentración medida en el *Nanodrop*. Para este estudio, hemos retrotranscrito unas cantidades fijas de 500ng (nanogramos). Como el volumen final del tubo debe ser de 20 μL , el volumen de ARN debe ser como máximo de 8 μL . Sin embargo, es asumible hasta 10 μL de ARN, de forma que la fórmula final no tenga agua (H₂O). Los ciclos del termociclador para esta primera fase de la retrotranscripción se especifican en la Tabla II.

Tabla II. Ciclos de temperatura y tiempo programados en el termociclador para la realización de la RT.

PRIMERA FASE	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
PREINCUBACIÓN	25	10
INCUBACIÓN	50	30
INACTIVACIÓN	85	5
ENFRIAMIENTO	4	∞
SEGUNDA FASE	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
INCUBACIÓN	37	20
ENFRIAMIENTO	4	∞

La segunda fase de la reacción consiste en añadir a la preparación 1 μL de la Ribonucleasa H (en inglés *RNase H*) para la degradación completa del ARN residual. Se introdujeron los tubos *ependorf* nuevamente en el

termociclador y programamos los ciclos que podemos observar en la Tabla II.

Tanto el proceso de extracción como el de retrotranscripción se realizaron en el mismo día para evitar así la degradación del ARN, y siempre trabajando en hielo para mantener la muestra estable. Este ADNc obtenido fue el molde utilizado para la posterior realización de una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), por lo que el procedimiento completo se denomina RT-qPCR.

3.2.3 Selección de los genes de estudio

3.2.3.1 Genes de referencia

Antes de realizar los experimentos de expresión génica de los genes de estudio *MPC1* y *MPC2*, realizamos un estudio previo para saber cuáles serían los genes de referencia más apropiados que tendríamos que incluir en nuestra placa de PCR. En base a diversas publicaciones relacionadas con patologías similares, se eligieron los siguientes genes para comprobar su idoneidad como genes de referencia en nuestro estudio: *RPL13A* (*Ribosomal Protein L13a*), *GAPDH* (*GlicerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase*), *HPRT* (*Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase*), *18S* (*18S Ribosomal*), *B2M* (*Beta-2 Microglobulina*) y *ACTB* (*Actin Beta*).

Para ello, se utilizó la herramienta informática geNorm incluida en el software qBase+ versión 3.1. En función de los valores proporcionados de **M** (estabilidad en la expresión de un gen, siendo necesario un valor de $M \leq 0.5$) y **V** (número óptimo en la selección de genes de referencia), finalmente se escogieron *HPRT*, *ACTB* y *GAPDH* como nuestros genes de referencia.

3.2.3.2 Genes *MPC1* y *MPC2*. Diseño de cebadores

Un buen diseño es imprescindible para una correcta realización de la PCR. El diseño de los cebadores necesarios para amplificar los genes *MPC1* y *MPC2* se realiza a partir de las secuencias de ARN mensajero (ARNm) correspondientes. El diseño se realiza a través de la página web de la casa



comercial *Universal Probe Library* (UPL), introduciendo el nombre del gen y seleccionando la variante correspondiente.

Para la elección de la pareja de cebadores, se tuvieron en cuenta que cumplieran las siguientes características: longitud de entre 18-22 nucleótidos (nts), temperatura de desnaturalización (o *melting* del inglés, T_m) entre 59-60°C, un contenido de guanina/citosina entre 40-60% y una longitud del amplicón de entre 60-200 nts. Una vez seleccionados fueron pedidos y manufacturados en la misma casa comercial. Tras recibir los viales, se diluyeron en agua destilada dejándolos a una concentración final de 20 μ mol. Posteriormente se hizo una prueba para comprobar que no había dimerización entre ellos y para determinar el volumen de ADNc óptimo a utilizar en la qPCR.

Los cebadores del resto de los genes analizados en este trabajo, salvo los de *MPC1* y *MPC2* ya habían sido diseñados previamente.

3.2.3.3 Genes del metabolismo mitocondrial

Además del estudio de la expresión génica de *MPC*, se seleccionaron otros 2 genes relacionados con el metabolismo mitocondrial: *CPT1B* (*Carnitine O-PalmitoylTransferase 1B*), implicado en el metabolismo de los ácidos grasos; y *SOD2* (*SuperOxide Dismutase 2*) correspondiente a una enzima detoxificadora (Figura 3).

3.2.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La qPCR (del inglés, *Quantitative PCR*) consiste en una variante de la PCR convencional en la cual se realiza simultáneamente la amplificación y la cuantificación del material genético mediante el uso de compuestos fluorescentes. En nuestro caso, se utilizaron sondas UPL de Roche marcadas con fluorocromos. Su estructura consiste en un fragmento de oligonucleótidos dotado de un fluorocromo donador en el extremo 5', silenciado por el fluorocromo atenuador o *quencher* en el extremo 3'. Ésta sonda está diseñada para hibridar en algún punto intermedio de la secuencia delimitada por los cebadores. Debido a ello, es necesario usar una sonda específica por cada gen de estudio. Al estar la sonda anillada al

ADNc, el donador dona luz que es captada por el atenuador, de forma que no se emite señal. Cuando la ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena y llega a la región donde se encuentra la sonda, se degrada por la acción exonucleasa 5'-3' de la enzima. Esto provoca la separación del donador y del atenuador, de forma que la fluorescencia puede ser detectada por el equipo.

El análisis de los niveles de expresión génica se realizó en el termociclador *LightCycler 480 II* (Roche, Alemania) siguiendo el programa que se observa en la Tabla III. Programación del LightCycler 480 II para la realización de la qPCR. En la fase de amplificación se aplican 3 temperaturas distintas en las que ocurren los procesos de desnaturalización, anillamiento y extensión respectivamente.

Tabla III. Programación del LightCycler 480 II para la realización de la qPCR.

FASE	Temperatura (°C)	Tiempo
PREINCUBACIÓN	95	10 min
AMPLIFICACIÓN (50 ciclos)	95	10s
	60	30s
	72	1s
ENFRIAMIENTO	40	20s

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos, de forma que en las filas se situaron los genes y en las columnas las muestras de los donantes, cada una de ellas con una réplica. De esta forma, en cada microplaca se pudieron estudiar a la vez 7 genes y 5 donantes, utilizando las 2 últimas columnas para el blanco (control negativo). Para la reacción es necesaria la presencia de los reactivos especificados a continuación:

- I. **Mix UPL:** *Taq* ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y Buffer.
- II. **H₂O estéril especial para PCR**
- III. **Cebadores:** específicos de cada gen
- IV. **Sonda:** específica de cada gen

Con estos reactivos, se preparó la *Máster Mix* (mezcla de reactivos) específico para cada gen, siguiendo el protocolo del fabricante para cada reacción/pocillo (Tabla IV), y multiplicando los volúmenes por 12 (número de pocillos por fila, donde irán colocados los genes según nuestro diseño de microplaca) a la vez que se calculó también un 10% de excedente para evitar errores de pipeteo. De esta forma, era necesario preparar 7 alícuotas, una por cada gen.

Tabla IV. Volúmenes necesarios para la reacción de amplificación de la qPCR. Es necesario pipetear un volumen final de *Máster Mix* de 8µl en cada pocillo de la microplaca.

Reactivo	Volumen (µl)
Sonda UPL	0,10
Cebador sentido	0,35
Cebador antisentido	0,35
H ₂ O	2,20
MixUPL	5,00
Volumen total	8

En cada pocillo se pipetearon 8µL de la *Máster Mix* y 2µL del ADNc, por lo que la reacción final se llevó a cabo a partir de un volumen total de 10µL. Para realizar todo este procedimiento se trabajó en cabina estéril, con las muestras en hielo y tapadas, ya que las sondas son sensibles a la luz. Se introdujeron previamente todos los materiales a utilizar en la cabina para someterlos a un ciclo inicial de desinfección con luz ultravioleta.

Una vez terminada la qPCR, el cálculo de los niveles de expresión a partir de la eficiencia de la reacción se realiza a partir de los datos del ciclo umbral (*Ct* del inglés, *Cycle Threshold*), y se aplica una fórmula matemática basada en la segunda derivada de cada gen de estudio y de referencia. Los valores de expresión génica de los genes de estudio (*MPC1*, *MPC2*, *SOD2* y *CPT1B*) se normalizan con los genes de referencia, obteniéndose así los valores de expresión génica relativa a partir de la siguiente ecuación:



$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$R = \frac{(E \text{ gen estudiado})^{\Delta Ct \text{ estudiado (referencia-muestra)}}}{(E \text{ gen referencia})^{\Delta Ct \text{ gen referencia (referencia-muestra)}}$$

Donde:

E=eficiencia de amplificación (cercano a 2)

ΔCt =número de ciclo/umbral a partir del cual se empieza a detectar fluorescencia.

3.2.5 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los valores de expresión génica relativa (media de 2 réplicas) a través del software *qbase+*, se exportaron los datos a los programas de análisis estadístico *GraphPad Prism 8.0* y *Rx64 4.0.3*, para la realización de los cálculos estadísticos necesarios y la representación gráfica de los resultados.

Primero, se estudió la normalidad de los datos, para así decidir el mejor enfoque analítico. Se llevó a cabo el test paramétrico de comparación de medias *t-test* (estudiando previamente la igualdad de varianzas) o el test no paramétrico *Mann-Whitney* (según los datos fueran normales o no, respectivamente), y se aplicó el método de corrección de *Holm-Sidak* para ajustar los p-valores por comparaciones múltiples. Realizamos contrastes de hipótesis con un nivel de significación del 5%; es decir, considerando estadísticamente significativos aquellos valores de $p \leq 0,05$ (con una aceptación dudosa de p -valores $\leq 0,1$) y expresando finalmente los valores de los grupos como media \pm desviación estándar.

3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

Para el estudio de la expresión proteica se utilizaron muestras de plasma. La medición de los niveles plasmáticos de las proteínas MPC1 y MPC2 se llevó a cabo mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de la casa

comercial *MyBioSource* (EE. UU.). Los ELISA son técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo que utilizan sistemas adicionales de revelado (enzima) que permiten evidenciar el resultado mediante un cambio de color en el medio. Este tipo de ensayos nos permiten obtener valores de concentración absoluta de las moléculas de estudio mediante la medición y la interpolación de los valores de absorbancia de las muestras frente a una curva estándar de concentraciones conocidas.

3.3.1 Cuantificación proteica de MPC1

Para el estudio de las concentraciones plasmáticas de MPC1 se utilizó un ELISA sándwich no competitivo. Este tipo de ensayos consisten en tapizar una microplaca de poliestireno (mediante adsorción) con un anticuerpo específico para la proteína de estudio y bloquear los sitios de unión inespecíficos. A continuación, se añade la muestra y se deja incubar, para que el antígeno de estudio, si lo hay, se una al anticuerpo. Posteriormente, se añade el anticuerpo de detección biotinilado (conjugado con biotina) el cual también será específico para la proteína. A continuación, se añade un complejo enzimático de Streptavidina (proteína con una alta afinidad por la Biotina) con peroxidasa (HRP), el cual se unirá a la biotina del anticuerpo de detección. Por último, se añade el sustrato enzimático TMB el cual, tras reaccionar con la peroxidasa, producirá un cambio de color (azul) en el pocillo en el cual se haya formado este complejo (Figura 6). Esta reacción enzimática es necesario pararla añadiendo un ácido, el cual provocará el cambio de color de azul a amarillo. De esta forma, la intensidad colorimétrica (es decir, la cantidad de inmunocomplejos formados) será directamente proporcional a la concentración de la proteína de estudio en las muestras. Este cambio de color se midió en un espectrofotómetro *NanoQuant infinite M200* (Suiza), mediante la medición de la absorbancia (densidad óptica, DO) de la muestra a una longitud de onda de 450nm.

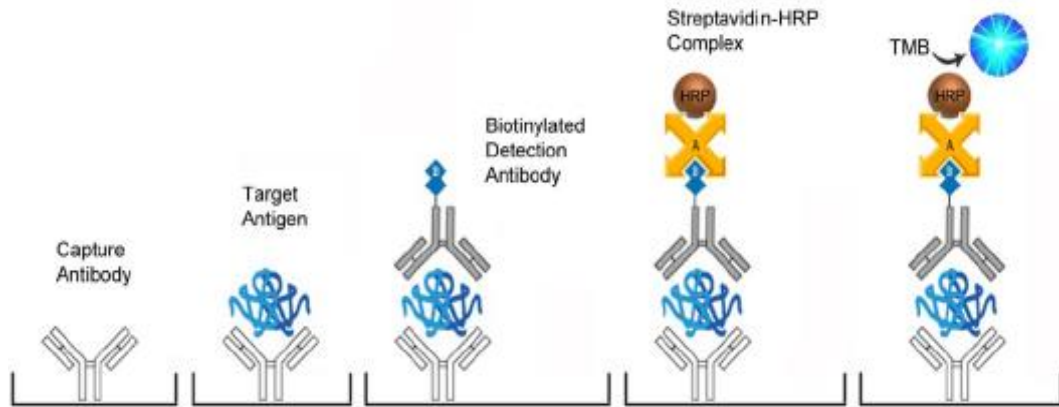


Figura 6. Esquema de la formación de inmunocomplejos en un ELISA sándwich. Fuente: protocolo MyBioSource.

El kit comercial proporciona una microplaca de 96 pocillos previamente tapizada y bloqueada por lo que el protocolo se llevó a cabo siguiendo las siguientes instrucciones:

- Preparar las diluciones seriadas del estándar, las cuales se utilizan para construir la recta patrón.
- Añadir 100µL de muestra o de las diluciones seriadas del estándar en cada pocillo, cubrir la microplaca con sellador transparente e incubar 2 horas a 37°C.
- Descartar el líquido (volcando la microplaca en el fregadero, sin lavar) y añadir 100µL del *Detection Reagent A* (anticuerpo de detección), cubrir e incubar 1 hora a 37°C.
- Descartar el líquido y realizar 3 lavados de los pocillos con 1x *Wash Solution* (buffer de lavado al 1x), dejando actuar el buffer 1 o 2 minutos antes de eliminarlo. Tras el último lavado, asegurarse que no quede nada de líquido en la microplaca, golpeándola boca abajo suavemente sobre papel absorbente.
- Añadir 100µL del *Detection Reagent B* (complejo Streptavidina-HRP), cubrir la microplaca e incubar 30 min a 37°C.
- Descartar líquido y lavar 5 veces.
- Añadir 90µL de *Substrate Solution* (TMB). Cubrir con sellador y papel albal para proteger de la luz, y dejar reaccionar durante 15-25 min,

hasta que se observe cambio de color en la curva estándar y ésta alcance el punto de saturación.

- Parar la reacción añadiendo 50µL de *Stop Solution* (ácido) y rotar ligeramente la microplaca para homogeneizar bien.

Una vez parada la reacción, volvemos a tapar la microplaca y la llevamos al espectrofotómetro para medir su absorbancia. Con los datos de absorbancia y concentraciones conocidas de las diluciones seriadas del estándar (proporcionadas por el kit), se ajustaron los puntos a una recta (concentración en el eje Y frente a la absorbancia en el eje X) y se obtuvo su fórmula (Figura 7). De esta forma, se pudieron interpolar los datos de absorbancia de nuestras muestras y extrapolar las concentraciones absolutas expresadas en ng por mililitro (ng/mL)

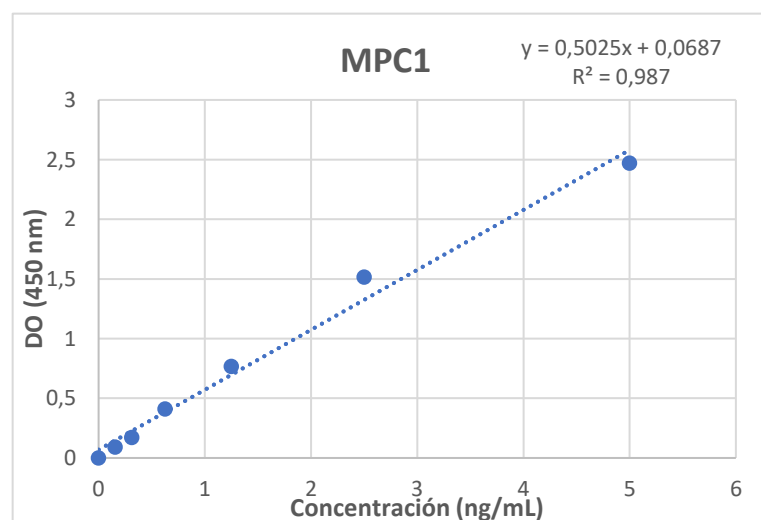


Figura 7. Recta ajustada del ELISA para la cuantificación de MPC1 en plasma.

3.3.2 Cuantificación proteica de MPC2

Para el estudio de las concentraciones plasmáticas de MPC2, al contrario que para MPC1, se utilizó un ELISA competitivo. La diferencia principal de este tipo de ensayos con los no competitivos radica en que en el pocillo se añaden al mismo tiempo la muestra y un antígeno (proteína de interés) conjugado con la enzima, por lo que ambos compiten por los sitios de unión al anticuerpo adsorbido a la microplaca. Esto se traduce en que, a la hora

de detectar la señal colorimétrica, esta será inversamente proporcional a la concentración de la proteína en la muestra: en decir, a mayor concentración de la proteína en la muestra, menor será la señal, ya que los sitios de unión al anticuerpo estarán ocupados en su mayoría por nuestro antígeno.

Debido a estas diferencias en la técnica, el protocolo a seguir en este caso fue:

- Añadir 100µL de muestra o de las diluciones seriadas (ya preparadas en este kit) en cada pocillo. Añadir 50µL del conjugado (antígeno marcado con HRP), cubrir la microplaca con sellador transparente e incubar 1 hora a 37°C.
- Descartar líquido y lavar 5 veces.
- Añadir 50µL de *Substrate A* y 50µL de *Substrate B* (sustratos enzimáticos), cubrir con sellador y papel albal e incubar 15-20 min.
- Añadir 50µL de *Stop solution* (ácido) para parar la reacción enzimática, provocando un viraje de color de azul a amarillo. Volver a cubrir con albal y leer la DO a 450nm en el espectrofotómetro.

En este caso, trabajamos con una curva estándar (Figura 8) no una recta ajustada, por lo que el cálculo se realizó de forma diferente. Sin embargo, el principio es el mismo, ya que interpolamos las absorbancias y extrapolamos las concentraciones absolutas, en este caso pg por mL (pg/mL) ya que esta técnica es más sensible que la anterior.

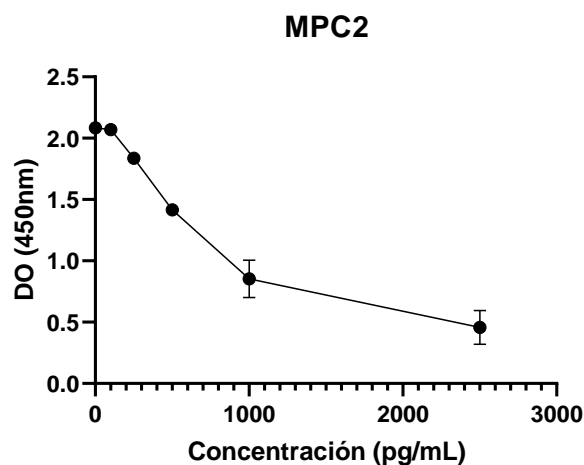


Figura 8. Curva estándar del ELISA para la cuantificación de MPC2 en plasma.

Para poder obtener la representación de los datos de la curva estándar, fue necesario primero hacer una transformación logarítmica para así poder hacer una representación de una curva 4PL (o curva de regresión lineal logarítmica, Figura 9). Una vez representada, se interpolan los datos de DO y se extrapolan las concentraciones, las cuales hay que volver a transformar en potencias de 10.

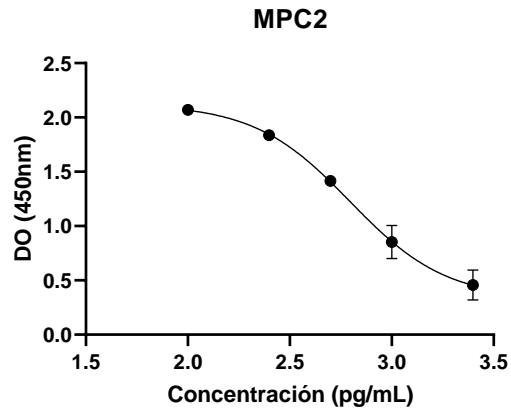


Figura 9. Curva 4PL del ELISA para la cuantificación de MPC2 en plasma.

4 RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE DONANTES

Este proyecto se llevó a cabo a partir de un tamaño muestral de 48 individuos (N=48), de los cuales 36 fueron previamente diagnosticados con alguna de las 3 miocardiopatías de estudio (CI, MH y MDI) y el resto son donantes sanos, de forma que quedaron repartidos en 4 grupos (3 patológicos y 1 control) de 12 sujetos cada uno. Dentro de cada agrupación, a su vez, se realizó una separación equitativa por género (6 hombres y 6 mujeres), y edades comprendidas entre los 55 y los 75 años en el momento de la donación de la muestra.

Para el estudio de la expresión proteica se utilizaron los mismos donantes que en el estudio de expresión génica, ampliando equitativamente los grupos (N=16 para patológicos y N=15 para grupo control) de forma que pudiéramos completar la microplaca de 96 pocillos.

4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.2.1 Extracción, cuantificación y RT

Como se ha mencionado en el apartado de Metodología, tanto la extracción, como la cuantificación y la RT se realizaron en el mismo día, para evitar la degradación del ARN. Una vez cuantificada la muestra en el espectrofotómetro, se hicieron los cálculos necesarios para la realización de la RT a partir de 500ng de ARN, tal y como se muestra en el ejemplo de la Tabla V. Para el cálculo del volumen necesario para tener 500ng, se utilizaron factores de conversión. Los volúmenes tanto de *Máster Mix* como de *Enzyme Mix* son constantes según protocolo, y se debe rellenar con H₂O hasta alcanzar un volumen final de 20µL.

Tabla V. Volúmenes utilizados para la realización de una RT a partir de 500 ng de ARN a una concentración de 94 ng/µl.

MUESTRA	[RNA] (ng/µl)	Vol. RNA (µl)	<i>Máster Mix</i> (µl)	<i>Enzyme Mix</i> (µl)	H ₂ O (µl)
IC-19/1445	94	6,42	10	2	1,58

4.2.2 Determinación de los genes de referencia mediante *geNorm*

La selección de la mejor combinación de genes de referencia para las muestras se determinó mediante la herramienta informática *geNorm*, integrada del paquete *qBase+* versión 3.1.

En primer lugar, se eligieron los genes a analizar en base a la literatura previa, siendo los candidatos finalmente seleccionados: *RPL13A*, *GAPDH*, *HPRT*, *18S*, *B2M* y *ACTB*. Según los valores obtenidos de **M** (estabilidad en la expresión de un gen, siendo necesario un valor de $M \leq 0,5$, Figura 10) y **V** (número óptimo en la selección de genes de referencia, Figura 11) proporcionados por el programa. Finalmente se seleccionaron los siguientes genes de referencia: *HPRT*, *ACTB* y *GAPDH*.

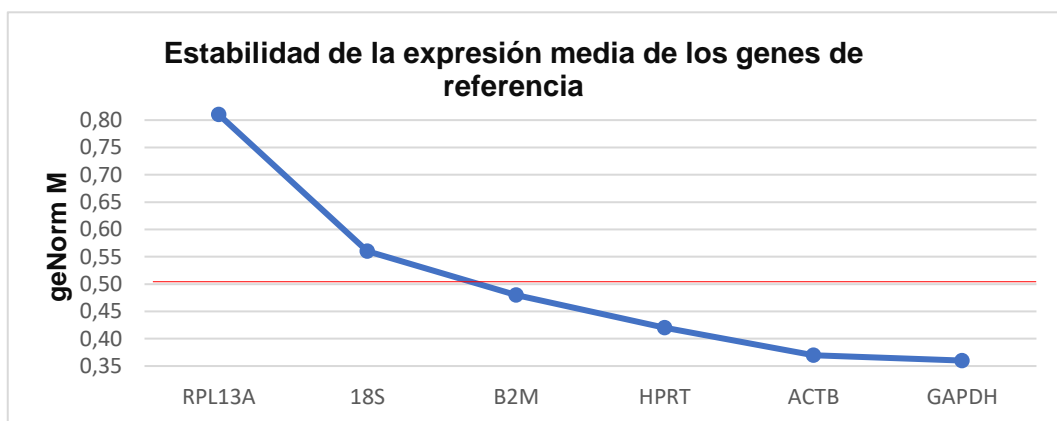


Figura 10. Valores M de los candidatos a genes de referencia. La línea roja representa el valor $M=0,5$, siendo necesario un valor inferior para que el gen sea estable.

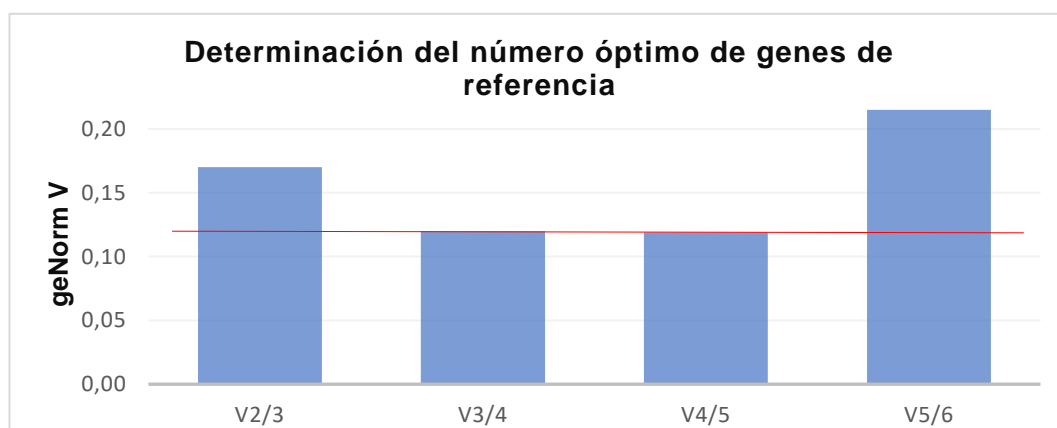


Figura 11. Valores V de los candidatos a genes de referencia. La línea roja representa el valor $V=0,15$ por debajo del cuál se representa el número óptimo de genes de referencia.

4.2.3 Selección de los genes de interés

En la Tabla VI se muestran los genes utilizados y las secuencias de sus respectivos cebadores, así como sus sondas UPL correspondientes.

Tabla VI. Genes de estudio con las secuencias nucleotídicas de sus respectivos cebadores, así como la sonda UPL correspondiente.

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Sonda UPL
HPRT	TGATAGATCCATTCCTATGACTGTAGA	CAAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTG	#22
ACTB	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	#9
GAPDH	GAGTCCACTGGCGTCTTCAC	GTTACACCCCATGACGAACA	#45
MPC1	AGGATTTCCGACTACCTC	GGAAGACCCCAGTTGGTAC	#57
MPC2	ATGCTGCCCGAGAAATTG	TGGAGCCCAGAAGAAAAGT	#62
SOD2	CTGGACAAACCTCAGCCCTA	TGATGGCTTCCAGCAACTC	#22
CPT1B	GAGCAGCACCCCAATCAC	AACTCCATAGCCATCATCTGCT	#10

4.2.4 Niveles de expresión génica de MPC1 y MPC2

Se quieren comparar los niveles de expresión de los diferentes grupos patológicos (MH, MDI y CI) frente al grupo control, así como comparar los niveles de expresión entre las diferentes patologías. Se analizaron por separado los genes *MPC1* y *MPC2*.

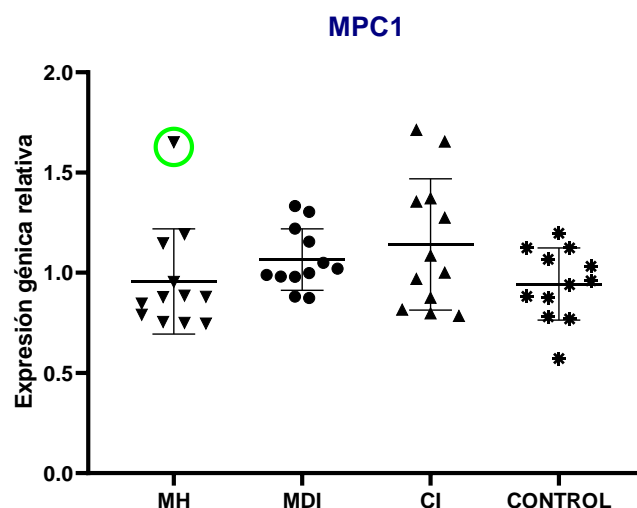


Figura 12. Niveles de expresión génica relativa de MPC1 en los diferentes grupos de estudio. Los puntos representan a cada uno de los donantes (N=12 en cada grupo). Se representan los valores en nubes de dispersión de la media \pm desviación estándar. Marcado con un círculo verde se puede observar el dato atípico del grupo MH.

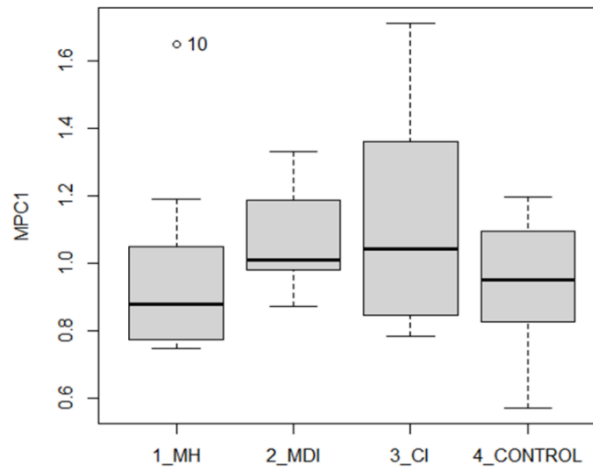


Figura 13. Gráfico de cajas mediante el cual estudiamos el dato atípico del grupo MH.

En los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión génica de *MPC1* (Figura 12) se observa un incremento de la expresión génica de los grupos patológicos MDI y CI ($1,065 \pm 0,1532$ y $1,141 \pm 0,3276$ respectivamente) frente al grupo control ($0,9435 \pm 0,1800$), aunque estas diferencias no son significativas posiblemente debido a la dispersión de los datos. El grupo MH ($0,9562 \pm 0,2625$) presenta unos niveles de expresión génica similares a los del grupo control. Gráficamente, podemos observar un posible dato atípico en el grupo MH. Se estudió su influencia mediante el estudio del gráfico de cajas (Figura 13) y la variación en los resultados estadísticos, y se obtuvieron datos significativos representados en la Figura 14 y que se comentarán en el apartado de discusión.

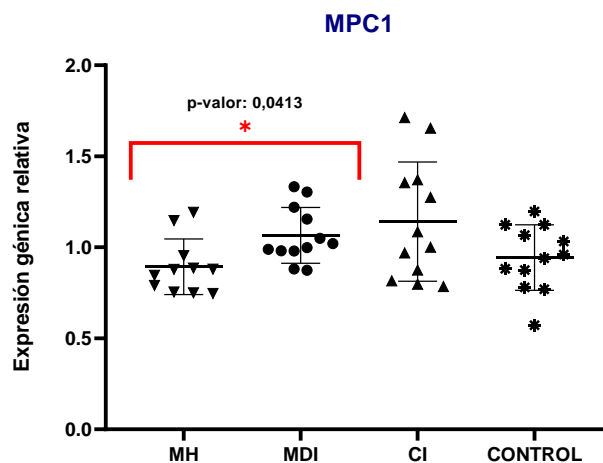


Figura 14. Niveles de expresión génica relativa de *MPC1* una vez eliminado el dato atípico del grupo MH. Se obtienen resultados significativos entre MH y MDI, con un p -valor=0.0413

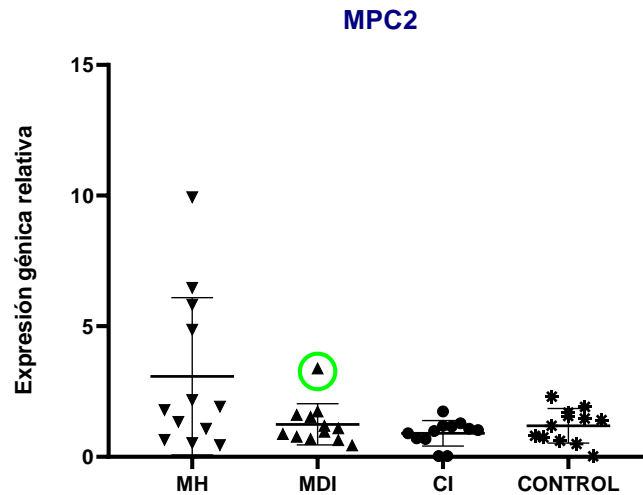


Figura 15. Niveles de expresión génica relativa de MPC2 en los diferentes grupos de estudio. Los puntos representan a cada uno de los donantes (N=12 en cada grupo). Se representan los valores en nubes de dispersión de la media \pm desviación estándar. Marcado con un círculo verde se puede observar el dato atípico del grupo MDI.

Con respecto a MPC2 (Figura 15), gráficamente podemos observar valores más altos y dispersos en el grupo MH ($3,083 \pm 3,006$) con respecto al resto de grupos ($1,185 \pm 0,6620$; $1,243 \pm 0,7878$ y $0,9014 \pm 0,4900$ para los grupos control, MDI y CI respectivamente). En el gráfico de cajas (Figura 16) también podemos observar un dato atípico en el grupo MH, pero este caso resultó ser una observación no influyente en nuestros datos. Estadísticamente, tampoco se observan diferencias significativas una vez aplicada la corrección a los p-valores.

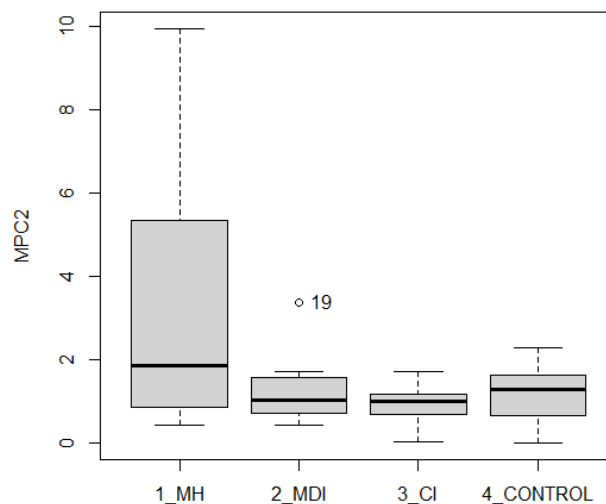


Figura 16. Gráfico de cajas mediante el cual estudiamos la influencia del dato atípico del grupo MDI.

4.2.5 Niveles de expresión génica de *SOD2* y *CPT1B*

Aunque no son los genes de interés, se realizaron análisis estadísticos para otros dos genes implicados en el metabolismo mitocondrial.

Estadísticamente, no existen diferencias significativas de la expresión génica de *SOD2* entre los grupos. Gráficamente (Figura 17), podemos observar valores más dispersos en el grupo MH ($1,269 \pm 0,5144$) con respecto al resto de los grupos ($0,9642 \pm 0,2111$; $1,029 \pm 0,3187$ y $0,9281 \pm 0,1975$ para el grupo control, MDI y CI respectivamente). El gráfico de cajas no muestra ningún dato atípico.

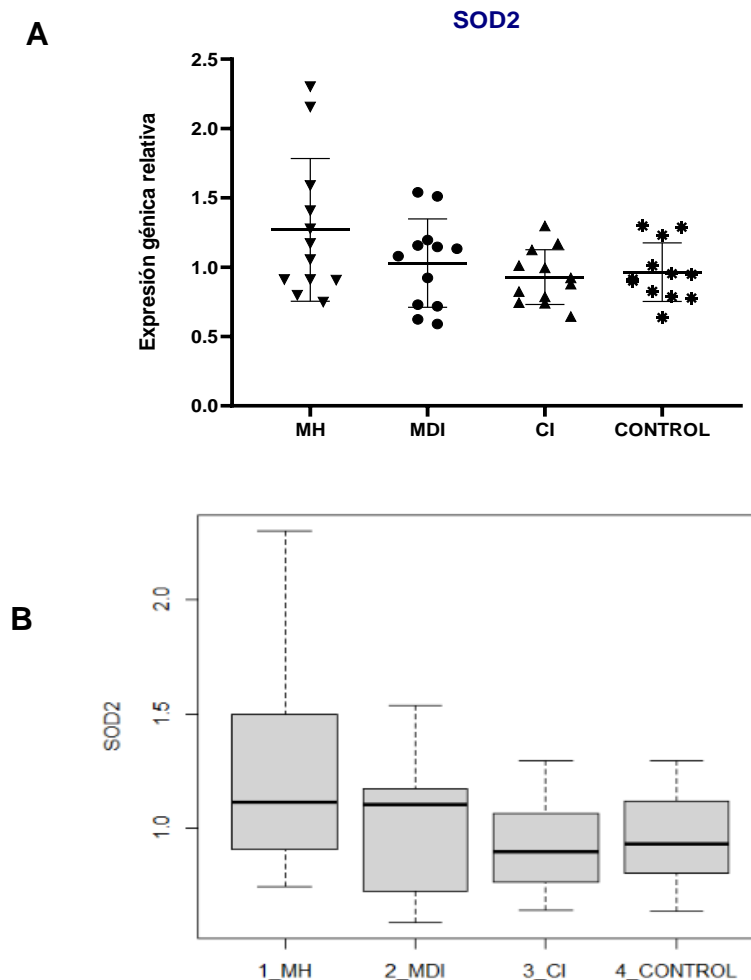


Figura 17. A) Niveles de expresión génica de *SOD2* en los diferentes grupos. Los puntos representan a cada uno de los donantes ($N=12$ en cada grupo). Se representan los valores en nubes de dispersión de la media \pm desviación estándar **B)** Gráfico de cajas para *SOD2*. No se encontraron datos atípicos.

Con respecto al gen *CPT1B* (Figura 18) tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, obteniendo expresiones génicas relativas de: $0,9462 \pm 0,7251$; $1,072 \pm 0,3725$; $1,231 \pm 0,7172$ y $1,629 \pm 1,157$ para los grupos MH, MDI, CI y control respectivamente. Sin embargo, el gráfico de cajas nos detecta 3 valores atípicos, por lo que se estudió su influencia en los p-valores, pero los resultaron continuaron siendo no significativos.

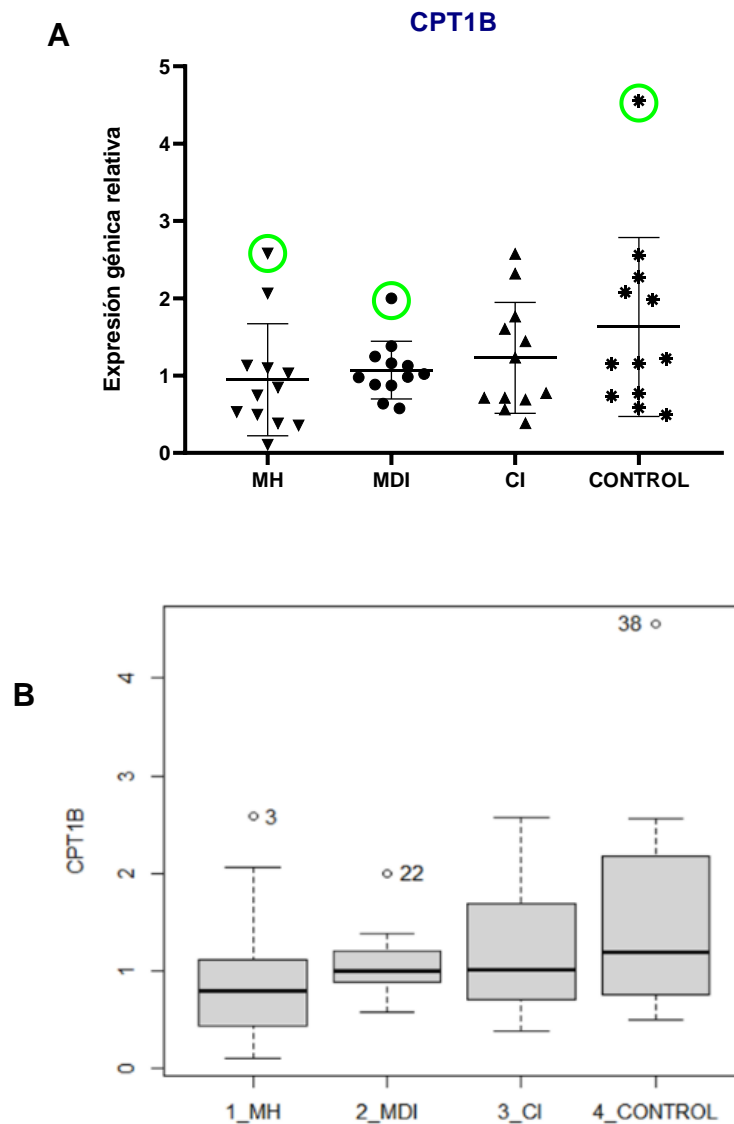


Figura 18. A) Niveles de expresión génica de *CPT1B* en los diferentes grupos. Los puntos representan a cada uno de los donantes ($N=12$ en cada grupo). Se representan los valores en nubes de dispersión de la media \pm desviación estándar **B)** Gráfico de cajas para *CPT1B*. Se encontraron 3 datos atípicos no influyentes.

4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

Debido a la falta de tiempo, no se pudieron realizar los análisis estadísticos de los resultados. Sin embargo, sí se realizó un análisis preliminar de las concentraciones obtenidas para ambas moléculas en cada uno de los grupos.

4.3.1 Niveles de expresión proteica de MPC1

Para MPC1 (Figura 19), se obtuvieron valores mayoritariamente no detectables o cercanos a 0. Se puede apreciar cierta positividad entre los donantes del grupo MDI, pero sin que sea suficiente para concluir que este grupo posee una expresión superior al resto.

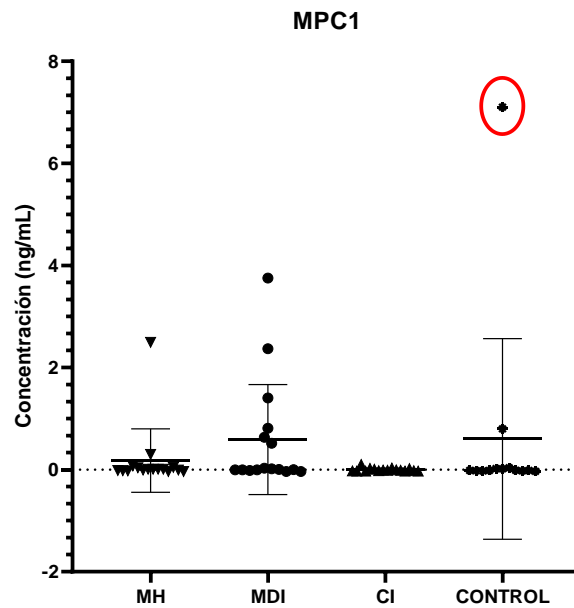


Figura 19. Niveles de expresión proteica de MPC1 en los diferentes grupos. Los puntos representan a cada uno de los donantes (N=16 en cada grupo patológico y N=15 en el control). Se representan los valores en nubes de dispersión de la media \pm desviación estándar. Rodeado en rojo aparece un posible dato atípico en el grupo control.

4.3.2 Niveles de expresión proteica de MPC2

Para MPC2 (Figura 20), por el contrario, sí que se obtuvieron valores positivos. Podemos apreciar una mayor expresión de la molécula en el grupo MDI, aunque también posee una mayor dispersión de los datos. Podría haber diferencias significativas entre el grupo MDI y el grupo control, ya que en el primero se observa un posible dato atípico influyente (Figura 21).

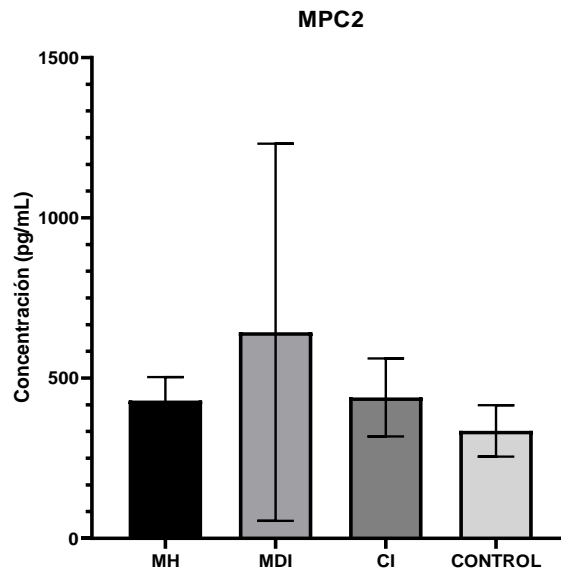


Figura 20. Niveles de expresión proteica de MPC2 en los diferentes grupos. Representación en gráfico de barras de los valores de la media \pm desviación estándar ($N=16$ en cada grupo patológico y $N=15$ en el control).

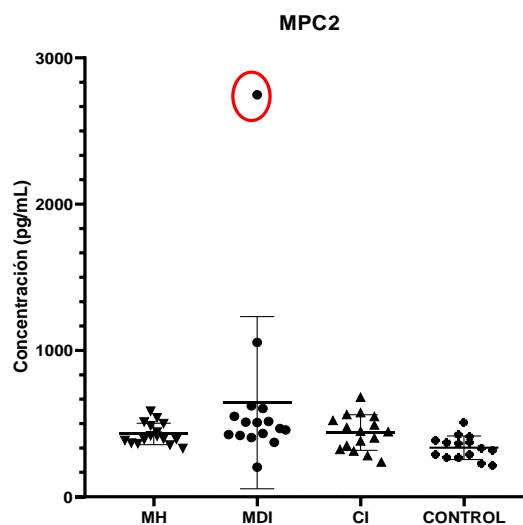


Figura 21. Niveles de expresión proteica de MPC2 en los diferentes grupos. Los puntos representan a cada uno de los donantes ($N=16$ en cada grupo patológico y $N=15$ en el control). Rodeado en rojo aparece un posible dato atípico.

5 DISCUSIÓN

En el campo de la Investigación Biomédica, la identificación de biomarcadores específicos de una determinada patología es una disciplina que ha despertado enormes expectativas por su doble potencial de aplicación: por una parte, puede ayudar en la identificación de marcadores proteicos o genéticos que permitan diagnosticar, clasificar, pronosticar y predecir enfermedades; y por otra puede contribuir en la definición de nuevas dianas terapéuticas. Uno de los mayores retos de la medicina cardiovascular es la búsqueda de biomarcadores diagnósticos y pronósticos de eventos cardiovasculares que puedan ser identificados mediante métodos accesibles en sangre de los pacientes para su posible aplicación a la clínica.

La IC es una enfermedad severa que produce una alta morbilidad, y aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento del origen genético, molecular y celular de estas patologías, se necesitan nuevos datos para establecer nuevas estrategias terapéuticas. Para su correcto funcionamiento, el corazón depende estrechamente de la energía oxidativa generada en las mitocondrias, principalmente a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos; sin embargo, ante una situación de anoxia por cardiopatía, la producción de ATP se reduce en casi un 40%, y la glucólisis anaeróbica se convierte en la principal fuente energética (6,7).

Es en este escenario donde se ha observado una disminución general del metabolismo mitocondrial en la IC (20,21), observándose disminuciones específicas en la oxidación del piruvato (22), lo que llevaría asociado una expresión reducida de *MPC1* y *MPC2* (24), convirtiéndolo así en un posible biomarcador pronóstico. Por otro lado, un estudio realizado en tejidos humanos (biopsias recogidas de corazones patológicos tras un trasplante cardiaco), sugiere que la elevación de *MPC1* y *MPC2* puede limitar la lesión tisular al aumentar la entrada del piruvato a la mitocondria, limitando así la acidosis intracelular y convirtiéndolo en una posible diana terapéutica.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que tratar de aumentar la expresión de *MPC1* y *MPC2* puede limitar la lesión tisular al aumentar la entrada del piruvato a la mitocondria, limitando así la acidosis intracelular, lo que las convierte en posibles dianas terapéuticas con función cardioprotectora.

Los datos de expresión génica de *MPC1* y *MPC2* obtenidos en este trabajo no permiten obtener evidencia suficiente para clasificar estos genes como posibles biomarcadores sanguíneos. Sin embargo, como ya se ha indicado en resultados, cabe destacar que, una vez analizada la influencia de uno de los datos atípicos encontrados en nuestra muestra, obtenemos unos resultados significativamente distintos. Concretamente, se trata de un dato atípico en el grupo MH para los valores del gen *MPC1*, representado en la Figura 12. Tras la eliminación de ese punto, volvemos a realizar las comparaciones estadísticas de ese grupo con respecto al resto, obteniendo en este caso, con un nivel de significación del 5%, un p-valor corregido de 0.0413. Este resultado supone una gran diferencia, ya que el p-valor obtenido con la muestra completa era mucho mayor (p-valor corregido=0.1834) lo que implica que estamos ante un valor influyente en nuestra muestra. La interpretación de este nuevo resultado supondría la existencia de diferencias significativas entre los grupos MH y MDI; es decir, podríamos afirmar que aquellos pacientes con cardiopatía hipertrófica poseen niveles de expresión significativamente más bajos ($0,8931 \pm 0,1523$) que aquellos con cardiopatía dilatada idiopática ($1,065 \pm 0,1532$) (Figura 14).

A pesar de que tenemos significación estadística, debemos valorar también si estos resultados tienen relevancia clínica. El objetivo principal de este estudio era poder encontrar diferencias significativamente distintas entre los grupos de pacientes con IC y el grupo control de pacientes sin patologías graves, de forma que pudiéramos identificar estos genes como posibles biomarcadores. No hemos podido confirmar esta hipótesis, y los resultados obtenidos para los grupos MH y MDI no tienen aplicación clínica.



Sin embargo, la ausencia de resultados significativos podría deberse a que hemos trabajado con un tamaño muestral pequeño, lo que disminuye la potencia estadística y aumenta las posibilidades de cometer errores de tipo II (concluir que no existen diferencias cuando realmente sí las hay); es decir, podemos estar ante una aceptación falsa de la hipótesis nula de ausencia de diferencias.

Por otro lado, en el estudio del gen *MPC1* hemos observado cierta tendencia a obtener unos valores de expresión génica mayores en patológicos que en controles, lo que indica cierta tendencia a la sobreexpresión en pacientes con IC. Para comprobarlo, sería necesario repetir el estudio sobre un tamaño muestral mayor, de forma que aumentemos la potencia estadística del estudio.

Los resultados de expresión proteica obtenidos en ese trabajo no pudieron ser analizados estadísticamente, ya que se recibió el kit comercial muy tarde. Además, la cuantificación de MPC1 fue no detectable, por lo que no se pudo obtener ninguna conclusión. Esto pudo deberse a que el kit comercial no posee tanta sensibilidad como el utilizado para la molécula MPC2 (ya que trabaja con concentraciones de ng/mL, mientras que MPC2 trabaja en pg/mL), de forma que no pudieron detectar concentraciones tan bajas. También pudo deberse a una mala realización del protocolo. Sería necesario repetir la prueba para confirmar estas hipótesis.

Sin embargo, la cuantificación plasmática de MPC2 sí que resultó positiva y realizamos un análisis gráfico preliminar, donde podemos observar ciertas diferencias entre los grupos. La diferencia más destacable es la observada en el grupo MDI, donde apreciamos una mayor expresión de la proteína, aunque también posee una mayor dispersión de los datos. Para confirmar si hay diferencias entre este grupo y el control, sería necesario hacer los análisis estadísticos de la misma forma que se realizaron para el estudio de los niveles de expresión génica (estudiando normalidad, aplicando el

test correspondiente y las correcciones necesarias), así como estudiar la influencia del posible dato atípico representado en la Figura 21.

La identificación de biomarcadores no invasivos con utilidad clínica es todavía un reto en el ámbito de la IC. Aunque en los últimos años se ha tratado de identificar biomarcadores para diferentes aspectos de la fisiopatología de la IC, en la práctica clínica, por su valor diagnóstico y pronóstico, los más utilizados son los péptidos natriuréticos tipo B (BNP y NT-proBNP) (28) pero existen muchos otros en IC que han demostrado solo una utilidad más limitada tanto en clínica como en investigación al tener una relación menos directa con la patología y ser menos específicos (por ejemplo, factor soluble supresor de tumorigenicidad 2 (sST2), Troponina T de alta sensibilidad (hsTnT), galectina-3 (Gal-3), proadrenomedulina, cistatina-C, interleucina-6 (IL-6), procalcitonina, etc (29)).

La mayor limitación del estudio presentado en este TFM es el tamaño muestral empleado. Se necesitaría poder aumentar los donantes de cada grupo tanto en los estudios a nivel génico como proteico para sacar conclusiones precisas. Sin embargo, los datos preliminares obtenidos sugieren que las moléculas de MPC1 o MPC2 no son buenos candidatos para ser identificados como biomarcadores sanguíneos de IC que puedan usarse en la clínica al no mostrar en general diferencias de expresión génica ni proteica entre los grupos analizados.

6 CONCLUSIONES

- La expresión génica de *MPC1* mostró una tendencia mayor en los grupos MDI y CI con respecto al grupo control, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, el grupo MH mostró niveles de expresión similares al grupo control.
- Para la expresión génica de *MPC1*, se detectaron diferencias significativas entre los grupos patológicos MH y MDI, una vez analizado y eliminado el dato atípico influyente.
- Los niveles de expresión génica de *MPC2* no mostraron modulaciones entre los grupos MDI, CI y control. El grupo MH reflejó niveles más elevados, aunque también se pudo apreciar una mayor dispersión de los datos.
- Los niveles de expresión del gen implicado en el metabolismo de los ácidos grasos (*CPT1B*) y la enzima detoxificadora (*SOD2*) no mostraron diferencias significativas entre los grupos.
- La cuantificación de los niveles de la proteína MPC1 en plasma muestra valores cercanos a cero, es decir, no detectables con la técnica aplicada.
- La cuantificación de la molécula MPC2 mostró, gráficamente, niveles superiores en los grupos patológicos frente al grupo control. Sería necesario realizar el análisis estadístico para comprobar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas.
- Los datos preliminares obtenidos sugieren que las moléculas de MPC1 o MPC2 no son buenos candidatos para ser identificados como biomarcadores sanguíneos de IC.

7 AGRADECIMIENTOS

Primero me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Nieves Doménech García y a la Dra. María Generosa Crespo Leiro, sin las cuales no habría sido posible realizar el presente trabajo; así como al resto de investigadores y personal de apoyo del Grupo de Investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada (ICA) y Trasplante Cardíaco (TC). De igual modo, quiero agradecer a mis compañeros del INIBIC, por apoyarme y ayudarme en la realización de todas las técnicas y protocolos aplicados en el presente estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido financiados por un Proyecto de Investigación de la Sección de Insuficiencia Cardíaca (convocatoria 2018) de la Sociedad Española de Cardiología.

8 **BIBLIOGRAFÍA**

1. Crespo Gonzalez I. Fisiopatología general. Primera ed. Madrid: Ediciones Paraninfo, SA; 2016.
2. Rhoades R, Bell DR. Fisiología médica. Fundamentos de Medicina Clínica [Medical Physiology. Principles for Clinical Medicine]. Quinta ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2018.
3. Marín-García J, Goldenthal MJ. La mitocondria y el corazón. Rev Esp Cardiol. 2002; 55(12): p. 1293-310.
4. Wineski JA, Gertz EW, Neese RA, Gruenke LD, L MD, Craig JC. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. J Clin Invest. 1985; 76: p. 1819-1827.
5. Vadvalkar SS, Matsuzaki S, Ester CA, Giorgione JR, Bockus LB, Kinter CS, et al. Decreased Mitochondrial Pyruvate Transport Activity in the Diabetic Heart. Journal of Biological Chemistry. 2017; 292(11): p. 4423-4433.
6. Wilcox JE, Vega RB, Kelly DP. Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart. Biochim. Biophys. 2013; 1833(4): p. 84-847.
7. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in normal and failing heart. Physiol Rev. 2005; 85(3): p. 1093-129.
8. Lilly LS. Fisiopatología de las cardiopatías [Pathophysiology of Heart Disease]. Cuarta ed. Barcelona: Wolters Kluwer Health España, SA; 2009.
9. Geske JB, Ommen SR, Gersh BJ. Hypertrophic Cardiomyopathy: Clinical Update. JACC: Heart Failure. 2018; 6(5): p. 364-375.

10. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 2013; 381(9862): p. 242-55.
11. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2010; 375(9716): p. 752-62.
12. Caviedes Bottner P, Córdova Fernández T, Larraín Valenzuela M, Cruces Romer P. Dilated cardiomyopathy and severe heart failure. An update for pediatricians. *Arch Argent Pediatr*. 2018; 116(3): p. 421-428.
13. Zangari J, Petrelli F, Maillot B, Martinou JC. The Multifaceted Pyruvate Metabolism: Role of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Biomolecules*. 2020; 10(7): p. 1068.
14. Halestrap AP. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J*. 1975; 71: p. 2577-2604.
15. Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen YC, et al. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science*. 2012; 337: p. 96-100.
16. Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westerman B, et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*. 2012; 337: p. 93-96.
17. Buchanan JL, Taylor EB. Mitochondrial Pyruvate Carrier Function in Health and Disease across the Lifespan. *Biomolecules*. 2020; 10(8): p. 1162.
18. McCommis KS, Finck BN. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem J*. 2015; 466(3): p. 443-54.



19. Fernandez-Caggiano M, Eaton P. Heart failure-emerging roles for the mitochondrial pyruvate carrier. *Cell Death Differ.* 2021; 28: p. 1149-1158.
20. Davila-Roman VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J AM Coll Cardiol.* 2002; 40: p. 271-277.
21. Recchia FA, McConell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res.* 1998;(83): p. 969-979.
22. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorn PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010; 85: p. 376-384.
23. Atherton HJ, Dodd MS, Heather LC, Schroeder M, Griffin JL, Radda GK, et al. Role of pyruvate dehydrogenase inhibition in the development of hypertrophy in the hyperthyroid rat heart: a combined magnetic resonance imaging and hyperpolarized magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation.* 2011; 123: p. 2552-2561.
24. Sheeran FL, Angerosa J, Liaw NY, Cheung MM, Pepe S. Adaptations in protein expression and regulated activity of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex in human systolic heart failure. *Oxid Med Cell Lengev.* 2019; 2019: p. 4532592.
25. Wang D, Wang Q, Yan G, Qiao Y, Zhu B, Liu B, et al. Hypoxia induces lactate secretion and glycolytic efflux by downregulating mitochondrial pyruvate carrier levels in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep.* 2018; 18(2): p. 1710-1717.



26. Fernández-Caggiano M, Prysyzhna O, Barallobre-Barreiro J, CalviñoSantos R, Aldama López G, Crespo-Leiro MG, et al. Analysis of Mitochondrial Proteins in the Surviving Myocardium after Ischemia Identifies Mitochondrial Pyruvate Carrier Expression as Possible Mediator of Tissue Viability. *Mol Cell Proteomics*. 2016; 15(1): p. 246-55.
27. Fernandez-Caggiano M, Kamynina A, Francoi AA, Prysyzhna O, Eykyn TR, Krasemann S, et al. Mitochondrial pyruvate carrier abundance mediates pathological cardiac hypertrophy. *Nature Metabolism*. 2020; 2: p. 1223-1231.
28. Ibrahim NE, Burnett Jr JC, Butler J, Camacho A, Felker GM, Fiuzat M, et al. Natriuretic Peptides as Inclusion Criteria in Clinical Trials: A JACC: Heart Failure Position Paper. *JACC Heart Fail*. 2020; 8(5): p. 347-358.
29. Chow SL, Maisel AS, Anand I, Bozkurt B, de Boer RA, Felker GM, et al. Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135(22): p. 1054-1091.
30. Fillmore N, Lopaschuk GD. Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833(4): p. 857-65.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO COLECCIÓN ICA-TC

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TÍTULO: COLECCIÓN DE MUESTRAS Y DATOS PARA EL DESARROLLO DE LA LINEA DE INVESTIGACIÓN EN INSUFICIENCIA CARDIACA AVANZADA Y TRASPLANTE CARDIACO

IDENTIDAD RESPONSABLE: DRA. MARIA GENEROSA CRESPO LEIRO

SERVICIO MÉDICO: UNIDAD DE INSUFICIENCIA CARDIACA AVANZADA Y TRASPLANTE CARDIACO. SERVICIO DE CARDIOLOGÍA.

CENTRO: XERENCIA XESTION INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMEDICA A CORUÑA (INIBIC). SERVIZO GALEGO DE SAUDE (SERGAS).

FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en la Línea de Investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco (ICA y TC).

Las muestras e información clínica obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para ser utilizadas en investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de esta **Línea de investigación** es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe el responsable de la misma, el **Dra. María Generosa Crespo Leiro** y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación del Servicio de Cardiología del CHUAC - XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las patologías cardíacas en general, y particularmente en la insuficiencia cardíaca y el trasplante cardíaco.

La finalidad principal de esta línea de investigación es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

Debe saber que la realización de los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y los datos, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de investigación y el Biobanco están reguladas por el Reglamento General de Protección de datos (Reg. UE 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016) y la normativa española en materia de protección de datos, sanidad e investigación biomédica vigente.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. **Suno-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.**

MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS (*Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos*) que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de la **Dra. María Generosa Crespo Leiro**.

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que se deriven de su adecuada atención médica.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimadas.

Análisis de la Proteína Mitocondrial Transportadora de Piruvato como biomarcador sanguíneo

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será utilizada junto a la muestra. *(Más información en el apartado de Confidencialidad)*

En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

CONDICIONES DE LA PARTICIPACIÓN.-

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra y datos que cede.

Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del registro de actividades del Servizo Galego de Saúde - SERGAS.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en la investigación, con un código, lo que se denomina seudonimización. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de las investigaciones con sus muestras y datos, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a su identidad, por si fuera información de interés clínico. La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores colaboradores con nuestras investigaciones, se realizará de manera codificada (seudonimizada: se mantendrá por el investigador responsable en este centro el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar con la **Línea de Investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco**, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

La normativa que regula el tratamiento de datos de personas, le otorga **el derecho a acceder a sus datos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la supresión** de los mismos. También puede solicitar una copia de éstos o que ésta sea remitida a un tercero (**derecho de portabilidad**).

Para ejercer estos derechos puede ud. dirigirse al **Delegado de Protección de Datos** del centro a través del correo electrónico: Delegado.proteccion.datos@sergas.es o al investigador principal responsable de la línea de investigación de Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco, D^a. María Generosa Crespo Leiro dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:



- **ENTREGA EN PERSONA**, en la Unidad de ICA y TC, del Servicio de Cardiología de la XXIAC, a la atención de la D^a. María Generosa Crespo Leiro.
- **CORREO POSTAL**: D^a. María Generosa Crespo Leiro. Unidad de ICA y TC. Servicio de Cardiología. Planta Baja Hospital Universitario A Coruña. Xerencia Xestión Integrada A Coruña.
- **CORREO ELECTRÓNICO**: marisa.crespo.leiro@sergas.es

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, a la atención de la responsable de esta investigación D^a. María Generosa Crespo Leiro, la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento. Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

Así mismo, Ud. tiene derecho a interponer una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos, cuando considere que alguno de sus derechos no haya sido respetado.

Usted puede contactar con la **responsable de la Línea de investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco, D^a. María Generosa Crespo Leiro**, si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación, en el **Teléfono: 981 17 83 04**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA Y DATOS.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El responsable de la investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de **estudios de biología celular y genéticos**, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los **estudios genéticos** se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO FINAL DE LA MUESTRA

Cuando así lo determine la persona responsable de la Línea de investigación con la que usted accedió a colaborar con sus muestras y datos, y siempre que no nos indique lo contrario en la hoja de firma del consentimiento informado, las muestras sobrantes junto a los datos asociados serán depositadas en el Biobanco A Coruña.

Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores solicitantes de las muestras, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta del investigador responsable y previa autorización del comité de ética competente, podrán enviarse sus muestras seudonimizadas, es decir, codificadas (se mantendrá por el biobanco el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

El Biobanco A Coruña asume como propio todo lo descrito en los apartados previos de este documento en relación a la confidencialidad, los posibles hallazgos, etc.

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las soliciten.

BIOBANCO A CORUÑA.**TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA:** Angel Concha López**TELÉFONO DE CONTACTO:** 981 17 64 36 **CORREO ELECTRÓNICO:** BioBanco.CHUAC@sergas.es**CIERRE DEL BIOBANCO.-**

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco y/o Centro Hospitalario <http://www.inibic.es> y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

Muchas gracias por su colaboración.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Yo, *(Nombre y apellidos del participante manuscritos)* he leído la hoja de información y he podido hacer todas las preguntas que he considerado necesarias, y, **con la firma de este documento, acepto participar en la Línea de Investigación en Insuficiencia Cardíaca Avanzada y Trasplante Cardíaco con mis muestras y datos para que se utilicen en las condiciones que me han informado y que se concretan en:**

- Autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- Autorizo el uso y cesión de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información.
- Autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- Autorizo el depósito en el **Biobanco A Coruña** de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información.
- Quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- Acepto que se contacte conmigo cuando sea necesario, a través del siguiente Teléfono / E-mail de contacto:
.....

RESTRICCIONES DE USO (usted puede establecernos las restricciones de uso que considere oportunas a continuación).

- Y **NO** autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que
- Y **NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- Y **NO** autorizo el depósito en el **Biobanco A Coruña** de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información
- Y **NO** acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- Y **NO** quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.

Firma del participante
Identidad del participante:

Firma de la persona que informa
Identidad de la persona que informa:

Firma del testigo
Con mi firma, confirmo el consentimiento verbal del participante a participar en lo aquí indicado.
Identidad del testigo: DNI:
Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal
Identidad representante legal: DNI:
Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En, a de de
Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: con DNI

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al..... (nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Firma del participante

Identidad del participante:

Firma de la persona que informa

Identidad de la persona que informa:

Firma del testigo

Con mi firma, confirmo el consentimiento verbal del participante a participar en lo aquí indicado.

Identidad del testigo: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal

Identidad representante legal: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En, a de de