



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Expresión espacio-temporal de marcadores de Hipertrofia Cardíaca en ratones tratados con isoproterenol (de 15dpc a 7 días de nacidos).”

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Bióloga Experimental Arlett Del Olmo Turrubiarte

Codirectores

Dra. ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS

Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

Septiembre 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Expresión espacio-temporal de marcadores de Hipertrofia Cardíaca en ratones tratados con isoproterenol (de 15dpc a 7 días de nacidos).”

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Bióloga Experimental Arlett Del Olmo Turrubiarte

Codirectores

Dra. ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS

Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

Asesora

Dra. CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GÓMEZ



El trabajo se realizó con la colaboración de las Instituciones:

**Hospital Infantil de México Federico Gómez. Laboratorio de Investigación en
Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.**

Y

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Departamento de
Ciencias de la Salud. Laboratorio de Expresión Génica**



MIEMBROS DEL COMITÉ

Dra. Alejandra Contreras Ramos

Hospital Infantil de México Federico Gómez. Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Laboratorio de Expresión Génica.

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Hospital Infantil de México Federico Gómez. Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis

Experimental. Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Karla G. Carvajal Aguilera

Laboratorio de Nutrición Experimental

Instituto Nacional de Pediatría

Dr. David Cruz Robles

Departamento de Biología Molecular

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



AGRADECIMIENTO POR LOS APOYOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo para becarios de **CoNaCyT 233310**, y por el Hospital Infantil de México Federico Gómez en el **proyecto HIM/2011/006**



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las personas que han estado muy presentes en mi vida, mis padres y hermano, principalmente a mis padres, quienes me han encaminado toda mi vida para lograr mis metas y retos. Y a mi hermano por protegerme, por sus juegos y comentarios que me han hecho feliz.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores la Dra. Alejandra Contreras Ramos, al Dr. Humberto González Márquez y a mi asesora la Dra. Concepción Sánchez Gómez, quienes me han abierto las puertas a la investigación y que me han apoyado con paciencia a elaborar este trabajo. Agradezco su tiempo, sus regaños, halagos y comentarios pues de ellos he aprendido a ser mejor en lo que hago tanto en mi carrera como en mi vida personal.

Agradezco a los miembros del jurado por su valiosa participación, pues me han brindado su apoyo y tiempo para lograr este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer énfasis en la Dra. Alejandra Contreras Ramos, quien me ha demostrado que todo lo que uno se propone se puede lograr con sabiduría y humildad. Gracias, gracias, gracias y gracias por tu paciencia consejos y regaños y por enseñarme a crecer en todos los aspectos. Se, que aún me faltan muchas cosas por aprender, conocer y descubrir y también se que el camino aun es largo pero quiero que sepas que de no haberte conocido no estaría en el lugar en el que estoy y concluyendo esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas que me han apoyado en el laboratorio, ya sea por sus enseñanzas o consejos y que además les he tomado mucho cariño pues me han enseñado a vivir y a reír pero sobre todo a disfrutar la vida día a día.

Tec. Lab. Lucia Lima García y Dra. Guadalupe Días Rosas

Agradezco a todos los compañeros que han estado apoyando y formando parte del laboratorio y equipo de trabajo, por su amistad, consejos y apoyo en esta tesis.

Abigail Cruz, Cristina Sánchez, Yvett Mota, Violeta Castellón, Sigifredo Morales y Pablo Zúñiga

Agradezco a todos mis amigos que me han acompañado en una parte de mi vida, los quiero y los extraño.

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPERTROFIA CARDIACA	3
TIPOS DE HIPERTROFIA CARDIACA	4
Hipertrofia cardiaca fisiológica	4
Hipertrofia cardiaca patológica	5
CUADRO CLÍNICO	6
ETIOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDIACA	7
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDIACA	9
Vía de activación de la hipertrofia cardiaca fisiológica	10
Vía de activación de la hipertrofia cardiaca patológica	12
FISIOLOGÍA DE LA CONTRACCIÓN EN LA HC	14
MODELOS DE HIPERTROFIA CARDIACA	16
Isoproterenol	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	21
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MATERIAL	24
MATERIAL BIOLÓGICO	24
ANTICUERPOS	24

MÉTODOS	24
ANÁLISIS MORFOLÓGICO	25
HISTOLOGÍA	26
INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA	26
EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE CDNA	27
PCR CUANTITATIVA TIEMPO REAL.	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	29
RESULTADOS	30
CORAZONES DE LOS RATONES HEMBRA ADULTAS	30
MORFOMETRÍA DEL CORAZÓN DE LAS CRÍAS	31
EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LOS MARCADORES MOLECULARES DE LA HIPERTROFIA CARDIACA EN CRÍAS DE RATONES HEMBRA TRATADAS CON ISOPROTERENOL Y PBS.	39
EXPRESIÓN RELATIVA DE A-MHC Y B-MHC EN EL CORAZÓN DE CRÍAS DE RATONES HEMBRA TRATADAS CON ISOPROTERENOL.	42
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÉNDICES	56
SOLUCIONES	59

RESUMEN

El corazón puede incrementar su masa, es decir hipertrofiarse si se somete a cargas anormales de trabajo físico o por cardiopatías congénitas obstructivas, lo que genera una respuesta adaptativa, esto se puede presentar tanto en la niñez como en la etapa adulta y provocar la muerte. Día con día se diagnostican más casos de Hipertrofia Cardíaca (HC) en la infancia, y la prevalencia sigue siendo desconocida. Esto hace de la HC posnatal uno de los temas de salud de interés y se requiere, por tanto, profundizar en los mecanismos que la regulan. Durante la embriogénesis del corazón, tras el cierre de la comunicación interventricular, si se produce un incremento gradual en masa del miocardio durante la vida fetal y postnatal mientras disminuye la capacidad proliferativa, se produce HC patológica posnatal. Sin embargo, aun se desconoce si, durante la etapa fetal, se desregulan los marcadores de HC descritos en el adulto (MEF2A, GATA4, CDK9 y NFAT), asociados con la expresión de proteínas contráctiles (α -MHC y β -MHC), ni su repercusión en el desarrollo de HC posnatal. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue determinar el patrón de expresión espacio-temporal de marcadores de HC en crías (de 15 día postcoito (dpc) a 7 días de nacidos), de ratones hembras tratadas con isoproterenol, xenotóxico que ha demostrado provocarla, durante la gestación. Se obtuvieron corazones de etapas fetales (15 a 19 dpc), recién nacidos (inmediatamente después del parto) y 7 días de edad, de crías de ratones hembras tratadas durante la gestantes, desde el quinto hasta el decimoprimer dpc con 50 μ g/Kg/día de isoproterenol, así como controles de las mismas edades de madres tratadas con PBS. Se obtuvieron, también, los corazones de las madres tratadas y de las testigo. Se evaluaron las características anatómicas, morfométricas y la compactación miocárdica en cortes histológicos teñidos con H-E; la capacidad proliferativa y los cambios espacio-temporal de marcadores de HC, por inmunohistoquímica de PCNA, MEF2A, GATA4, CDK9, NFAT y el patrón de expresión de α y β -MHC, mediante qRT-PCR tiempo real. Los resultados mostraron que las madres tratadas con isoproterenol no presentan efecto sobre el corazón. En las crías, el tratamiento utilizado conduce al desarrollo de HC concéntrica del ventrículo izquierdo, con afección del tabique interventricular, sin

compactación miocárdica pero con baja tasa de proliferación. Los marcadores de HC están sobre expresados en las regiones afectadas desde etapas fetales (15 dpc), y se mantiene así hasta después del nacimiento. La expresión relativa del gen α -MHC, fue un poco mayor en las crías experimentales en la etapa posnatal; sin embargo, el cambio más significativo fue que el pico de expresión de la α -MHC, que en los controles se presentó a los 17 dpc, en los tratados se observó hasta los 15 dpc.

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo, la progresión del ciclo celular está altamente acoplada a la acumulación de la masa celular (crecimiento celular), garantizando que el tamaño celular sea constante. En diversas condiciones fisiológicas y/o patológicas surgen estímulos, como el estiramiento del miocardio producido por aumento de la carga hemodinámica y/o la liberación de factores humorales circulantes o provenientes de las mismas células cardíacas (mecanismo autocrino y paracrino), que, a través de la activación de señales intracelulares, promueven el aumento del tamaño de los cardiomiocitos a expensas de la formación o agregado de sarcómeros. De esta manera, en muchas cardiopatías, el crecimiento del músculo cardíaco está desacoplado de la proliferación, de tal manera que los miocitos cardíacos crecen, ya sea en largo o en ancho, dando origen a lo que se conoce como hipertrofia cardíaca (HC), (Reiss et al., 1993, Kajtura et al., 1994 y Ahuja et al., 2007).

A pesar de que los miocitos pierden, posiblemente, la capacidad de proliferar tempranamente luego del nacimiento por ser células altamente diferenciadas (Reiss et al., 1993 y Kajtura et al., 1995), son capaces aún de responder a estímulos que promuevan su crecimiento (Russel et al., 2000 y Sadoshima e Izumo 1997).

Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia es el aumento del tamaño de una célula o grupo de células que da lugar a un incremento en el tamaño del órgano del que forman parte (Vargas et al., 2009). La hipertrofia cardíaca se observa, macroscópicamente, como un incremento del grosor de la pared ventricular izquierda y/o del septo interventricular (Mariand y Roberts 2001). Se caracteriza por una reinducción del programa génico fetal, aumento de la síntesis proteica (principalmente de proteínas contráctiles), incremento del tamaño del cardiomiocito y cambios en la organización de la estructura sarcomérica (Frey et al., 2000), Esto provoca que la masa muscular del ventrículo izquierdo sea más grande que lo normal, y/o que el

tabique entre los dos ventrículos se engrose (Ilustración 1), ocasionando la obstrucción del flujo sanguíneo del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos. Este engrosamiento también puede afectar a una de las valvas de la válvula mitral, que separan la aurícula y el ventrículo izquierdos, provocando que la sangre se escape y retroceda desde el ventrículo izquierdo a la aurícula izquierda en vez de avanzar hacia el cuerpo (Frey y Olson 2003).

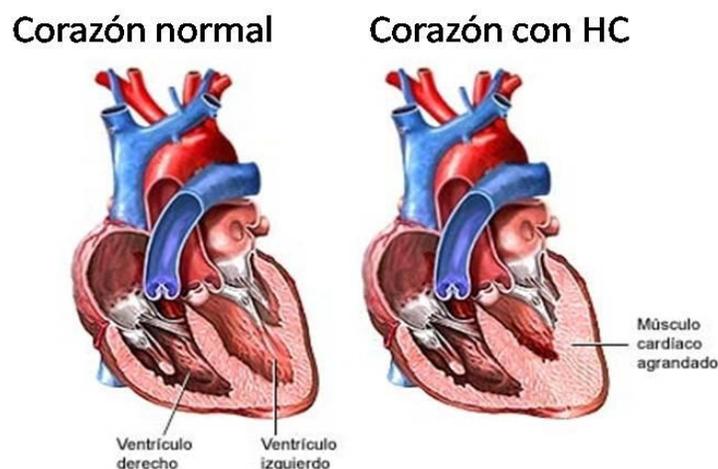


Ilustración 1. Hipertrofia cardíaca del ventrículo izquierdo. Corte en cuatro cámaras

Tipos de Hipertrofia Cardíaca

La hipertrofia cardíaca es una característica central en varios escenarios patológicos y remodelación fisiológica del corazón (Beisvag et al., 2009). Existen dos tipos de hipertrofia que se pueden producir como respuesta a factores genéticos, fisiológicos, mecánicos, neurohormonales y ambientales, y puede ser fisiológica o patológica, provocando, en ambos casos, que el cardiomiocito genere mayor trabajo.

Hipertrofia cardíaca fisiológica

En determinadas situaciones como durante el crecimiento, el embarazo o la práctica de actividad física intensa, la respuesta a la sobrecarga hemodinámica se caracteriza por aumento del tamaño de los miocitos con incremento proporcional

de los elementos estructurales del miocardio (sin aumento de la fibrosis intersticial) y sin compromiso funcional. Este tipo de respuesta se denomina HC fisiológica y cumple realmente una función de adaptación (Escudero y Pinilla 2007).

La HC fisiológica, también conocida como hipertrofia cardiaca adecuada o adaptativa, tras una sobrecarga de volumen conduce a una hipertrofia cardiaca excéntrica, provoca la adaptación incorrecta del volumen del ventrículo izquierdo en respuesta a la actividad física. Se caracteriza, a nivel celular, por la adición de sarcómeros en serie, lo que da como resultado un crecimiento celular longitudinal (Carreño et al., 2006), (Ilustración 2).

Hipertrofia cardiaca patológica

La HC patológica también conocida como inadecuada o no adaptativa, en respuesta a una sobrecarga de presión conduce a una hipertrofia cardiaca concéntrica. Se caracteriza por una mala adaptación del volumen ventricular, conduciendo a la disfunción ventricular izquierda y a insuficiencia cardiaca. A nivel celular se identifica por la adición de sarcómeros en paralelo que provoca el crecimiento lateral de los cardiomiocitos (Dorn et al., 2003), así como aumento de fibrosis intersticial (colágeno), disminución de la densidad capilar y reprogramación génica con inducción de genes fetales (α -MHC) y represión de los genes que codifican las isoformas específicas del adulto (β -MHC). (Carreño et al., 2006; Escudero y Pinilla 2007). (Ilustración 2).

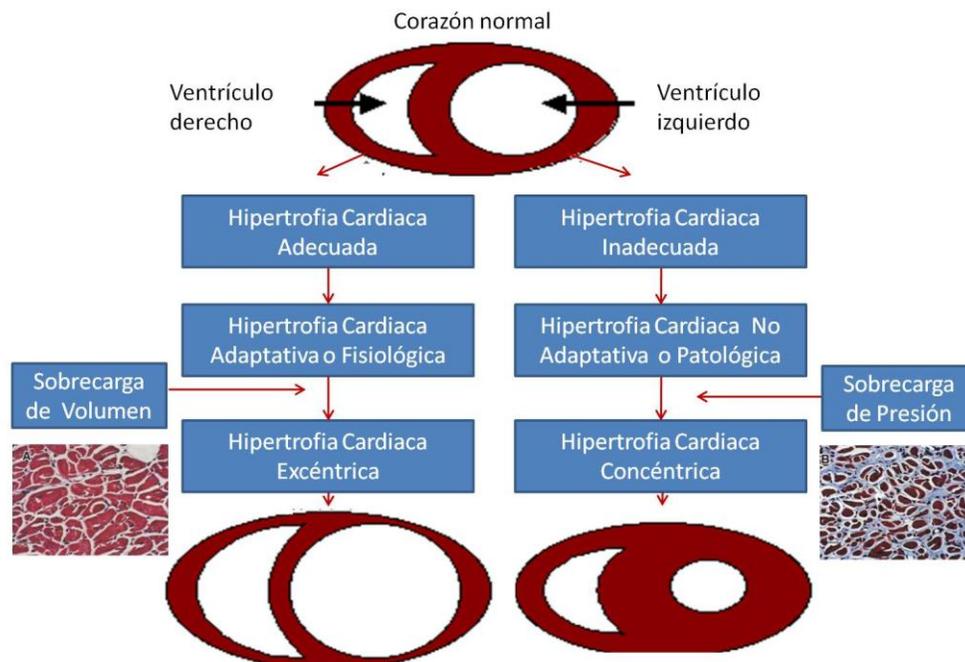


Ilustración 2. Tipos de Hipertrofia Cardiaca en el adulto, micrografía de hipertrofia cardiaca patológica con aumento de fibrosis intersticial y micrografía de hipertrofia cardiaca fisiológica.

Cuadro clínico

Entre los síntomas más comunes de la hipertrofia cardiaca se encuentran: dolor de pecho, disnea, palpitación, arritmias cardiacas, en particular fibrilación atrial y taquicardia ventricular no sostenida, además de que pueden presentar síndrome de Wolff-Parkinson y, con poca frecuencia, síncope (Cannan et al., 1976). Todos estos desórdenes conllevan a alta morbilidad y mortalidad (Carreño et al., 2006). De esta manera, las manifestaciones clínicas de la HC varían desde un curso asintomático benigno hasta un fallo severo del corazón y la muerte repentina (Maron, 1979; Mariand y Roberts, 2001). La hipertrofia es independiente de la elevación de la presión sanguínea, a pesar de que aumenta la constricción aórtica (Lukowski et al., 2010).

El diagnóstico de la HC se basa, principalmente, en el ecocardiograma, en donde sólo es evidente la hipertrofia del ventrículo izquierdo. El examen clínico no es un método fiable para el diagnóstico porque la mayoría de los pacientes,

especialmente los jóvenes, no muestran la obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo, así como ningún soplo detectable. Es interesante que el 10% de los pacientes jóvenes con HC son identificados durante un chequeo previo a las actividades deportivas (Geogarcopolus y Tolis, 2007). Resulta imprescindible que al detectarse cierto grado de hipertrofia de las paredes del ventrículo izquierdo en edades tempranas (<4 años) se debe de realizar más exámenes que permitan descartar otras afecciones tales como enfermedades del glucagón, mitocondriales, de Fabry, o el síndrome de Noonan. Debido a que la enfermedad aparece solo en un pequeño número de casos antes de los 12 años, la prevalencia sigue siendo aún desconocida (Geogarcopolus y Tolis 2007).

Etiología y evolución de la hipertrofia cardiaca

La respuesta hipertrófica puede ser desencadenada por diversos factores como situaciones naturales de sobrecarga hemodinámica como la determinada por el crecimiento, el embarazo y la actividad física intensa y regular. También puede deberse a situaciones de sobrecarga hemodinámica patológica de presión y/o de volumen, secundaria a hipertensión arterial, estenosis o insuficiencias valvulares que se presentan en cardiopatías congénitas como la tetralogía de Fallot y la constricción del arco aórtico. La miocardiopatía primaria y/o infarto agudo de miocardio. Son otros factores que desencadenan la HC. En todos los casos cuando se prolonga puede provocar fibrosis intersticial (Levy, 1990; Ho, 1998 y Maron, 1979).

La etiología de la hipertrofia cardiaca, se ha clasificado en dos tipos de origen, aquellas alteraciones de tipo mecánico y las de tipo metabólico (Tabla 1). Sin embargo, las principales causas que conducen a la HC son: la *hipertensión* que puede ser caracterizada por aumento continuo de la presión sanguínea, o la obesidad; *valvulopatías*, mediante afección de válvulas cardiacas, principalmente las del lado izquierdo; la *estenosis de la válvula aórtica*, a consecuencia de la disminución del calibre de la válvula que hace pasar la sangre del corazón a la aorta. La estenosis, aparece como un trastorno pediátrico y es congénito. El sujeto

nace con una válvula aórtica bicúspide, aunque también puede aparecer como consecuencia de la calcificación senil de la válvula, produce sobrecarga sobre el ventrículo izquierdo en vista de la mayor presión como consecuencia, la presión sistólica dentro del ventrículo izquierdo es mayor que en la aorta (Torpy et al., 2004).

Tabla 1. Etiología de la hipertrofia cardiaca en humanos por grupos etarios.

EDAD	MECÁNICO	METABÓLICO
Lactantes	Fibroelastosis, atresia tricuspídea, ventrículo izquierdo único, transposición corregida de los grandes vasos, persistencia del ductus arterioso, estenosis aórtica severa.	Enfermedad de Pompe, hijos de madres diabéticas.
Niños	Comunicación interventricular, persistencia del ductus arterioso, canal atrioventricular común, coartación aórtica, estenosis aórtica, hipertensión arterial secundaria.	Obesidad.
Jóvenes atletas	Miocardiopatías hipertróficas y dilatadas, valvulopatías mitroaórticas, hipertensión arterial primaria y coartación aórtica.	
Adultos y ancianos	Hipertensión arterial esencial, miocardiopatías hipertróficas y dilatadas, cardioesclerosis, valvulopatía mitroaórtica, o en la aorta bivalva con estenosis.	

La hipertrofia cardiaca progresa desde una función normal con hipertensión hasta la muerte súbita (Ilustración 3). La primera característica evidente en su evolución es la remodelación. En 1990, Pfeffer y Braunwald definieron que la remodelación ventricular es una alteración en el contorno o volumen de la cavidad ventricular, no atribuible a cambios agudos de la presión de distensión. En la remodelación se produce agrandamiento ventricular, con cavidad dilatada y pared adelgazada, a consecuencia de diversos mecanismos, tales como pérdida de miocitos, crecimiento de miocitos no dañados y fibrosis reactiva. Es entonces un proceso que incluye cambios en la forma, volumen y masa ventriculares, que a la larga repercuten negativamente sobre la función ventricular (Pfeffer y Braunwald 1990).

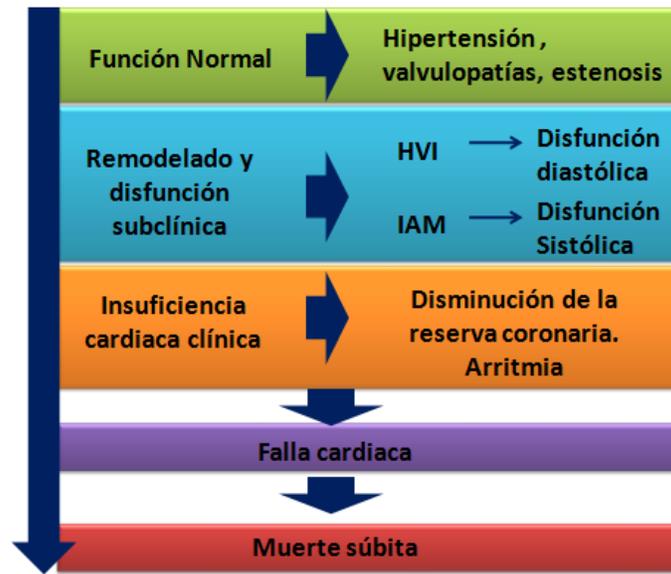


Ilustración 3. Progreso de la HC. HVI, hipertrofia del ventrículo izquierdo, IAM, infarto agudo al miocardio. Modificado de Francis et al 1995 y Sullivan et al., 1993.

Vías de señalización involucradas en la activación de la hipertrofia cardiaca

La HC es una respuesta a una variedad de estímulos extrínsecos e intrínsecos que incrementan el estrés biomecánico. La HC puede normalizar eventualmente la tensión, aunque puede progresar a insuficiencia y falla cardiaca (Frey y Olson, 2003). La noción tradicional de que la HC tiene un papel compensador ha sido cuestionada recientemente, lo que ha estimulado la investigación en torno a los eventos moleculares implicados en los eventos adaptativos, como la arritmogenicidad y la evolución a insuficiencia cardiaca (Carreño et al., 2006). La evidencia acumulada de estudios en humanos y modelos animales, sugiere que la HC no es una respuesta compensatoria, sino un proceso de mala adaptación (Frey y Olson, 2003).

En los complejos procesos moleculares que llevan al crecimiento del miocito cardiaco en la etapa fetal, intervienen primeros mensajeros, receptores de membrana, segundos mensajeros y factores de transcripción. La vía final común en que convergen estos agentes intracelulares es la expresión génica cuyos

cambios están siendo caracterizados cada vez con más detalle. En la HC, la modificación génica se caracteriza por la activación de los genes tempranos (*c-jun*, *c-fos*, *c-myc*) y la reexpresión de genes fetales como el factor natriurético atrial [ANF], la cadena pesada de la miosina cardiaca β [β -MHC] y alfa-actina esquelética [SKA], entre otros (Sadoshima e Izumo, 1997). Este evento es considerado como el marcador molecular del inicio de la hipertrofia patológica, ausente en condiciones de crecimiento fisiológico (Carreño et al., 2006 y Freu et al., 2004).

Existen dos rutas de señalización planteadas como promotoras de la HC, sin embargo no han sido bien caracterizadas antes de que se identifique morfológica y fisiológicamente la patología, ni durante la evolución de la misma. Una de estas rutas es la que conduce a la HC patológica, mientras que la otra hace referencia a la HC fisiológica.

Vía de activación de la hipertrofia cardiaca fisiológica

El estrés biomecánico del miocardio puede producirse por 2 tipos de noxas: el estiramiento mecánico y la liberación de factores neurohumorales.

El ***estiramiento mecánico*** inducido por estiramiento físico de cardiomiocitos de adultos y neonatales es suficiente para inducir una respuesta genética y fenotípica hipertrófica, incluso en ausencia de factores humorales y neuronales. Se han propuesto diversos tipos de moléculas candidatas para cumplir este papel, entre las que destacan los canales iónicos, las integrinas y las tirosincinasas, (Carreño et al., 2006)

Por lo que respecta a los ***factores neurohumorales***, estos se pueden clasificar en dos grupos. El primer grupo está compuesto por los factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante tipo β [TGF- β], factor de crecimiento fibroblástico [FGF], factor de crecimiento análogo a la insulina [IGF], los cuales, debido a su acción en receptores de membrana con actividad tirosincinasa, inician una cascada de señalización a través de la activación de segundos mensajeros

intracelulares, involucrados en el control del ciclo celular, ya sea impulsando o manteniendo a las células quiescentes (G0) o bien regulando la entrada de la célula en fase G1. Este proceso determina un patrón de crecimiento normal, característico del crecimiento del cardiomiocito posnatal (eutrofia) y del crecimiento hipertrófico fisiológico o adaptativo (Oudit et al., 2004; Lupu et al., 2001). La familia de los TGF- β incluye activinas, citocinas y a la proteína morfogénica de hueso (BMP), que regulan diferentes funciones celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación y migración, por lo que juegan un papel clave en el desarrollo del organismo. La desregulación de las proteínas de la familia TGF- β está implicada en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer. La activación del receptor del TGF- β propicia su fosforilación en residuos de serina/treonina y dispara la fosforilación de proteínas efectoras intracelulares (SMAD), que una vez activas se translocan al núcleo para inducir la transcripción de genes blanco y así, regular procesos y funciones celulares. Se han desarrollado estrategias terapéuticas para corregir las alteraciones presentes en patologías que involucran al TGF- β como principal factor (Gálvez et al., 2004).

El segundo grupo de factores neurohumorales promotores de HC, también involucra la activación de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa (RTyrK), promovida por factores de crecimiento como la insulina, la hormona de crecimiento (GH), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) así como por transactivación a través de algunos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como el de angiotensina 1. Cuando estos receptores son activados se inducen dos rutas de señalización intracelular distintas: la dependiente de cinasas (PI3K, Akt) y la dependiente de Ras/MAPKs (Ilustración 4).

También se han involucrado factores de transcripción como el Factor de Respuesta al Suero o SRF. Esta proteína se une a elementos de respuesta a suero del tipo c-fos. Se trata de un gen *MADS-box* (una superfamilia de factores

de transcripción) (Shore, 1995). Está implicado en la regulación de genes involucrados en mecanismos esenciales de la fisiología celular, como el ciclo celular, la apoptosis, el crecimiento celular, la diferenciación celular, etc.; para ello, se une a los elementos de respuesta al suero (SRE) de las regiones promotoras de sus genes diana. Está abajo de rutas de transducción de señal como la vía MAPK. Se considera a SRF como un elemento fundamental durante la embriogénesis debido a su papel determinante en la generación del mesodermo. El homeodominio *hop*, que se expresa en cardiomiocitos embrionarios y postnatales, regula el crecimiento y proliferación inhibiendo la actividad transcripcional del SRF. Hop puede inhibir a SRF por desacetilación de la histona HDAC (Kook et al., 2003). Por lo que la sobreexpresión de hop desarrolla HC severa, fibrosis cardíaca y muerte prematura.

Vía de activación de la hipertrofia cardíaca patológica

En este caso los factores humorales y respectivos receptores heptahelicoidales acoplados a proteína G involucrados son: la epinefrina y norepinefrina, la angiotensina II (Ang II) y su receptor AT, así como la endotelina 1 (ET1) y el receptor para ET (Molkentin y Dorn, 2001; Hunter y Chien, 1999, Lijnen y Petrov, 1999; Kajstura et al., 1994). La ocupación del receptor por su agonista promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ lo que provoca la disociación de ambas subunidades del receptor, permitiendo la activación de diferentes vías de señalización intracelular. (Bisping et al., 2006; Lodish et al., 2009) (Ilustración 4).

Cuando los agentes inductores de HC, como la Ang II, la Endotelina y los agonistas α adrenérgicos se unen a sus respectivos receptores acoplados a la proteína Gq , desencadenan la respuesta hipertrófica del miocardio. Al inducir la disociación de la subunidad α , el estímulo hipertrófico permite que ésta subunidad reclute a la isoforma β de la fosfolipasa C ($PLC\beta$) a la membrana, que hidroliza a la fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato (PIP2), dando inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG); este último facilita la activación de la proteína cinasa C (PKC),

que a su vez activa a las MAPKs, a través de las cinasa Raf. La activación de las MAPKs puede producirse a través de Raf por una cascada independiente de Gαq que involucra a cinasas de tirosina. La MAPK ERK 1/2 fosforila a la cinasa p90RSK, y esta última activa por fosforilación al NHE-1. De esta forma se promueve la entrada de calcio a través de los canales iónicos NHE1/NCX. El IP3, por otro lado, induce la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplásmico (RS) o de la envoltura nuclear (Bisping et al., 2006; Lodish et al., 2009).

El calcio, como segundo mensajero intracelular está involucrado en promover la actividad de calcineurina que funciona como factor de desfosforilación del factor nuclear de activación de células T (NFAT), que en un estado hipofosforilado es trasladada al interior del núcleo. Por otra parte, el calcio también promueve directamente la actividad de la histona II desacetilasa (HDACs), resultando en la, disociación del factor de unión a miocitos 2C (MEF2C), y su translocación al sitio promotor de la transcripción (Wang et al., 1998).

Finalmente, estas cascadas convergen en la activación de factores de transcripción nuclear, como el NFAT, GATA4 y MEF2, que interactuando sinérgicamente inducen la transcripción de genes de respuesta hipertrófica, como troponina T y C y el intercambio de β -MHC por α -MHC, (Molkentin et al., 1998; Wang et al., 1998; Akazawa y Komuro, 2003), (Ilustración 4).

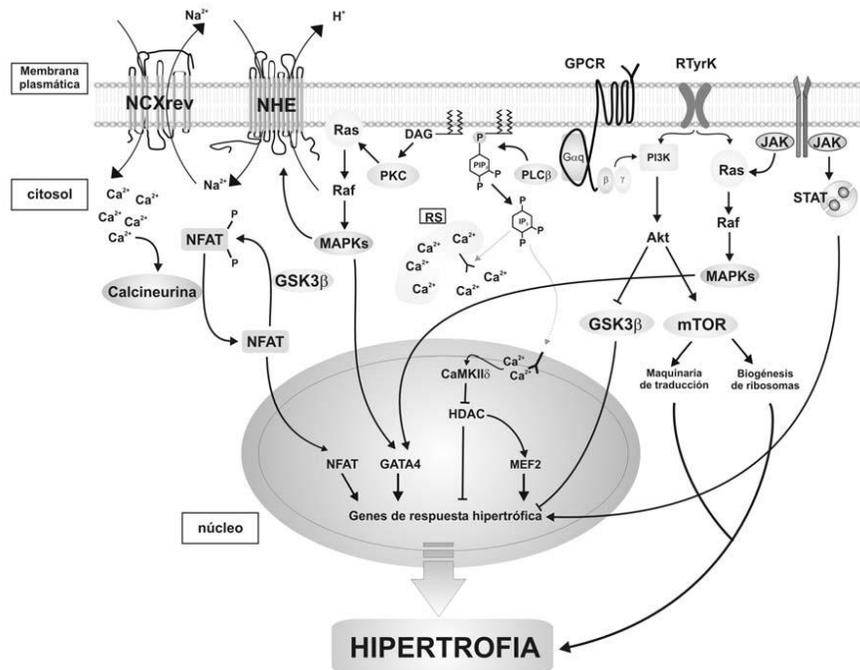


Ilustración. 4 Esquema que muestra las principales cascadas de señalización intracelular involucradas en la respuesta hipertrofica del miocardio. Ennis et al., 2004.

Fisiología de la contracción en la HC

La maquinaria de contracción del miocardio está representada por miofibrillas, que se componen por unidades contráctiles denominadas sarcómeros, la separación entre un sarcómero y otro se denomina disco Z. Este disco se encuentra en una región poco densa llamada banda I, por isotrópica. Estas bandas alternan con otras denominadas bandas A, por anisotrópica. En la parte media de las bandas A, se encuentra la banda H (ilustración 5). Estas distintas bandas sufren variaciones periódicas que se deben a la superposición de las proteínas citoesqueléticas (Ganong, 2006).

En los sarcómeros están los filamentos de actina, que nacen de los discos Z, en donde existe la actinina, que es una proteína que une a la actina y la titina, esta última es una proteína elástica, mantiene a la miosina en su posición y debido a que tiene una parte elástica, actúa como resorte recuperando la longitud de la miofibrilla, después de la contracción muscular (Ganong, 2006).

El filamento grueso de la miosina, está formado por dos cadenas ligeras, muy parecidas a la calmodulina y troponina c, pero que han perdido la afinidad por el calcio. Cada cadena pesada está compuesta por tres dominios, amino terminal, central y carboxilo terminal, los últimos 2 son los que interaccionan con la actina. El filamento fino es el que está formado por actina G, proteína globular al polimerizarse forma un filamento de actina (Ganong, 2006).

Existen dos isotipos de la cadena pesada de miosina cardiaca (MHC), el tipo α y el tipo β . El tipo β -MHC es la forma predominante en el corazón adulto, está caracterizada por baja actividad ATPasa y alta velocidad de acortamiento de los filamentos, logrando generar mayor fuerza mediante puentes cruzados con más ahorro de energía que la α -MHC, lo que sugiere, que el cambio de α -MHC por β -MHC, puede ser una respuesta adaptativa de conservación de energía (Miyata et al., 2000).

En la HC ventricular se produce aumento de la síntesis proteica con re-expresión de isoformas fetales de proteínas contráctiles como la cadena pesada de la miosina, se observa una disminución de la velocidad de acortamiento de la fibra miocárdica que es, en parte, secundaria al cambio de isoforma de la miosina (fenotipo de la cadena pesada de la miosina), que ha pasado a ser de tipo α o rápida. Cuando se reemplaza la forma lenta β por la forma rápida α , se apresura la formación de puentes de actina-miosina, aumenta la eyección sanguínea, aumenta el costo energético de la contracción, por tanto, disminuye el rendimiento. En muchos casos hay una estrecha relación entre la pérdida de miocitos y el trastorno funcional, es decir, hay un número insuficiente de miocitos que impide la función correcta del miocardio (Miyata et al., 2000).

En estudios recientes, se ha propuesto que las fallas del ventrículo izquierdo se asocian a un aumento en la expresión del mensajero de α -MHC y la disminución de β -MHC. Sin embargo, no hay pruebas circunstanciales que demuestren esta idea. Por otra parte, Miyata et al., (2000) y Reiser et al., (2001), determinaron que la disminución de β -MHC, conduce a infarto y muerte y que la desregulación

transcripcional de β -MHC o de α -MHC puede servir como un marcador temprano de HC. Aunado a esto, Crilley et al., (2003), demuestra que existe una deficiencia bioenergética en pacientes con HC.

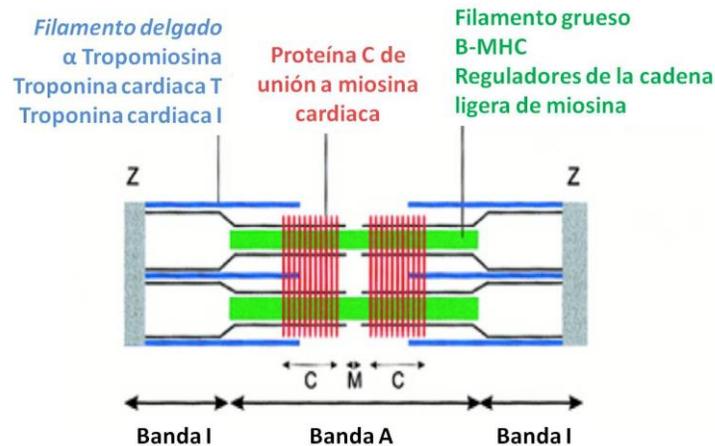


Ilustración 5. Esquema representativo de las diferentes proteínas del cardiomiocito. Modificado de Ramírez et al., (2004).

Modelos de hipertrofia cardíaca

Se ha demostrado que el desarrollo de HC se acompaña de disminución de la presión arterial, con aumento de la masa miocárdica. El uso de ciertas drogas antihipertensivas, como los bloqueadores β adrenérgicos, incrementan la masa ventricular izquierda. Además, las drogas simpatolíticas y los bloqueadores beta-adrenérgicos son capaces de inducir la patología en modelos experimentales y humanos aun sin normalizar la presión arterial (Gómez et al., 1998). En la Ilustración 6, se encuentran representadas las respuestas hipertróficas en animales de laboratorio expuestos a diferentes tipos de sobrecarga.

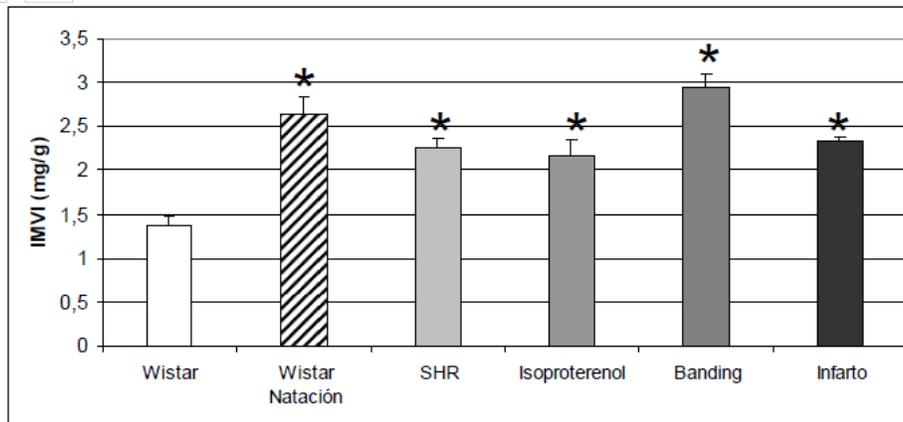


Ilustración 6. Hipertrofia cardiaca que se presenta en ratas Wistar en respuesta a diferentes tipos de sobrecarga. Los datos corresponden al índice de masa ventricular izquierda. Entrenamiento físico intenso (natación); ratas espontáneamente hipertensas (SHR); ratas expuestas al fármacos (Isoproterenol); disminución del diámetro de la raíz aórtica por colocación de un clip (Banding); Infarto de miocardio, producido por ligadura de la arteria descendente anterior (Infarto), (Ennis et al., 2004).

El uso de fármacos, como el isoproterenol, conduce a una respuesta inotrópica, evitando la manipulación por cirugía del animal. Ennis et al., (2004), demostraron que su administración conduce a la HC en tiempos menores que en los modelos de inducción mecánica (Ilustración 6), pero sus efectos son más prolongados y aseguran que es el mejor modelo para realizar estudios de los aspectos moleculares de la HC

Isoproterenol

El agregado de dos grupos metilo a la adrenalina genera isoproterenol, agonista adrenérgico que se une a los receptores para adrenalina con una fuerza 10 veces mayor a la propia adrenalina. Tiene un efecto inotrópico cronotrópico positivo sobre el corazón, es decir aumenta la contractilidad y frecuencia cardiaca, elevando la presión arterial sistólica, mientras que por sus efectos vasodilatadores, tiende a producir una presión arterial diastólica baja. También estimula la glucogenólisis, (Lodish et al., 2009).

El isoproterenol imita los efectos de las catecolaminas, las cuales cumplen un papel paracrino o endocrino en la circulación embrionaria (Burggren y Keller,

1997). Las catecolaminas, están presentes en la circulación materna, atraviesan la placenta hasta el embrión, al igual que la epinefrina o agonistas adrenérgicos como el isoproterenol, son ampliamente usadas en estudios teratogénicos (Trend y Bruce, 1989).

El mecanismo molecular por el cual el isoproterenol afecta la actividad cardiaca no se ha demostrado, pero por su naturaleza se ha implicado en al menos dos procesos; la cascada MAPK y con los receptores β -adrenérgicos (Lodish et al., 2009).

Brooks y Conrad (2009), determinaron que la administración de isoproterenol, es un método simple, no invasivo, de fácil administración y con baja incidencia de mortalidad adecuado para producir modelos de animales con lesiones del miocardio y disfunción cardiaca, asociada a la hipertrofia. Este modelo además, puede ser útil para evaluar los efectos de los genes o terapia con células madre en la disfunción cardíaca, sin los efectos potenciales de confusión de procedimientos invasivos. Así mismo, Yan et al., (2008), determinaron que la administración subcutánea de isoproterenol en ratas adultas induce HC 7 a 8 días después de su aplicación. Mientras que Heather et al., (2009), demostraron que la administración crónica de isoproterenol en ratas adultas, deteriora la función cardíaca, inducida por la hipertrofia, disminuye los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa, similares a los cambios en la dirección y magnitud a los que se encuentran en el corazón de rata después de un infarto de miocardio de gravedad moderada.

Por tanto, la administración de isoproterenol en ratas, resulta en un modelo de hipertrofia cardíaca rápido y altamente reproducible. Al respecto Galindo et al., (2009), realizaron un análisis de la inducción de HC entre el uso de isoproterenol y el ejercicio activo en ratones de 8 semanas después del nacimiento, al comparar los genes de ambos modelos, mediante el uso de microarreglos, concluyen que el uso de isoproterenol es más eficiente para la inducción de hipertrofia y que los genes encontrados tienen mayor correlación con el humano.

Por otro lado, Cha et al., (2009), al analizar la participación de IL-6, en la HC, emplearon ratones neonatos con HC inducida mediante isoproterenol, determinando que el uso de este fármaco incrementa la respuesta a HC después de 7 días de administración diaria. Por su parte Iwasaki et al., (1990), con la finalidad de determinar la función de las catecolaminas en el desarrollo normal y la fase temprana HC, estudiaron crías de 2, 4 y 7 semanas de nacidas provenientes de ratas gestantes tratadas con isoproterenol, encontrando una hipertrofia septal desproporcionada y un desorden intra-celular en el tabique interventricular de los corazones de ratas de 2 y 4 semanas de nacidos cuyas madres habían sido tratadas con isoproterenol. Sin embargo, estos cambios morfológicos no fueron tan evidentes en crías de 7 semanas después del nacimiento. Por lo que sugirieron que la función anormal de catecolaminas durante el período fetal puede dar lugar a la hipertrofia septal desproporcionada y/o del ventrículo izquierdo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los conocimientos obtenidos sobre la HC, hasta el momento, se basan en modelos de neonatos (cultivo in vitro) y adultos (cultivo in vitro y/o in vivo). En el adulto, tanto en modelos experimentales como en el humano, el aumento de los niveles de expresión de factores de transcripción, considerados marcadores de HC, produce una reinducción del “programa fetal” (Fink et al., 2000).

Durante la embriogénesis normal del corazón, tras el cierre de la comunicación interventricular, se sabe que la hipertrofia se manifiesta poco a poco durante la vida fetal y posnatal, mientras disminuye la capacidad proliferativa. A pesar de esta información, debido a la falta de modelos experimentales durante el desarrollo fetal, aun se desconoce si cuando existe el riesgo de presentar esta patología en la vida posnatal, existe una desregulación de los marcadores de HC previa, asociado a la expresión de proteínas contráctiles, los cuales tengan repercusión en del desarrollo de la HC en niños, jóvenes o adultos. Este trabajo centra su interés en determinar si la administración del isoproterenol en ratones hembra gestantes permitirá la obtención de crías que desarrollen hipertrofia cardiaca temprana (neonato), en las cuales, se observen cambios anatómicos asociados a la expresión de los factores de transcripción (GATA4, MEF2, NFAT y Cdk9), considerados como marcadores de respuesta hipertrófica (Sadoshima e Izumo, 1997), que a su vez correlacionen con los cambios de expresión de genes fetales (α -MHC y β -MHC), tal como se ha reportado en la HC del adulto.

HIPÓTESIS

En los corazones de las crías de las ratonas gestantes tratadas con isoproterenol, la manifestación morfológica de la hipertrofia no se observará durante el periodo fetal pero se hará evidente después del nacimiento, asociada a mayor expresión de los marcadores de hipertrofia (MEF2, NFAT, GATA4 y Cdk9) y de α -MHC. Mientras que β -MHC se mantendrá en niveles bajos o decaerá (Ilustración 7).

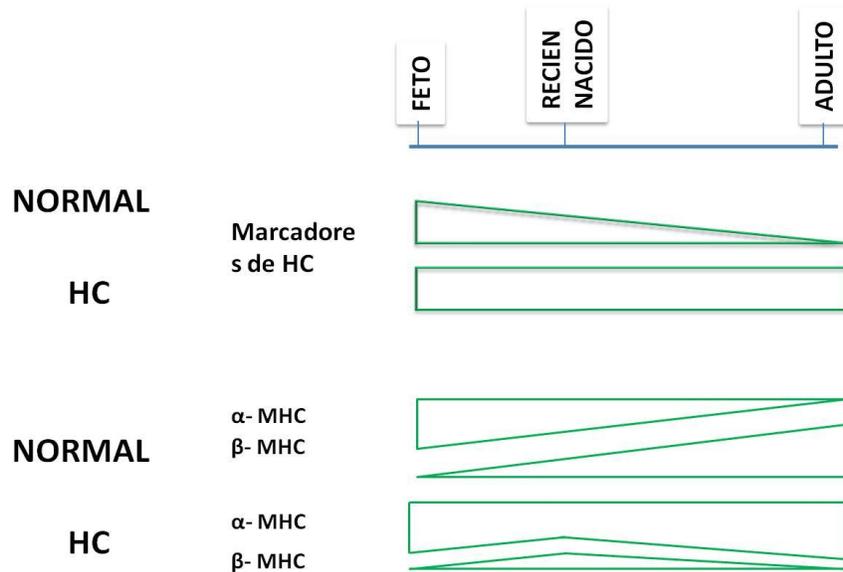


Ilustración 7. Hipótesis de la evolución del patrón de expresión de marcadores de hipertrofia, así como expresión de proteínas contráctiles en crías de ratones hembra gestantes tratadas con isoproterenol. Los marcadores de HC, en condición normal decaerán conforme pasa el tiempo, mientras que en los tratados con isoproterenol se mantendrán casi constantes. En condición normal α -MHC disminuirá su expresión, mientras que β -MHC aumentará, en el tratado, α -MHC disminuirá un poco y aumentará su expresión, mientras que β -MHC casi no aumentará y decaerá.

JUSTIFICACIÓN

Desde la vida fetal hasta el final de la adolescencia son numerosos los problemas cardiovasculares que se pueden presentar. Sin duda, las cardiopatías hipertróficas son un problema cardiológico importante en la sociedad, ya que se pueden manifestar en adultos, jóvenes y hasta en niños. Además de ser una de las principales causas de trasplante de corazón.

La HC es una de las características más importantes de las enfermedades cardíacas y es considerado como predictor independiente de mal pronóstico (Fink et al., 2000). Su frecuencia en el total de la población es de 1/500. Se estima que la prevalencia diagnosticada en individuos jóvenes mediante ecocardiografía es de 1/1000 pero aumenta con la edad (Rico et al., 2007). Se ha determinado que la HC es la causa más común de muerte repentina o súbita en niños mayores de 5 años y jóvenes entre 14 y 15 años, aunque también puede ocurrir en adultos mayores de 40 años. Pese a que se piensa que es extremadamente rara en niños menores de 5 años (Rico et al., 2007), día con día se manifiestan más casos de HC, por lo que, la prevalencia real sigue siendo aún desconocida (Geogarcopolus y Tolis 2007). Los avances logrados en los últimos años han permitido dilucidar algunos mecanismos que conduce a la HC en modelos *in vitro e in vivo*, de neonatos y adultos, destacando la participación de algunos factores de transcripción (Fink et al., 2000). Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, poco se ha definido sobre los cambios de expresión de genes en el tiempo y la transición que conduce de un crecimiento beneficioso a un mal funcionamiento desde la etapa fetal hasta el nacimiento, aunado a la falta de un modelo experimental que permita valorar dichos cambios. Consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo, servirán como indicadores del inicio de una alteración cardíaca hipertrófica.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión espacio temporal de los marcadores de HC en crías de ratón hembra tratadas con isoproterenol durante la gestación (de 15dpc a 7 días de nacidos).

OBJETIVOS PARTICULARES

- ⊙ Obtener corazones desde etapas fetales de 15 a 19 días postcoito (dpc), recién nacidos (inmediatamente después del parto) y 7 días de edad de ratonas gestantes inyectadas con 50µg/Kg/día de isoproterenol y de madres control tratadas con PBS.
- ⊙ Evaluar las características anatómicas y morfométricas en cada grupo experimental y control así como determinar la compactación miocárdica en cortes histológicos teñidos H-E.
- ⊙ Determinar la capacidad proliferativa y los cambios espacio-temporal de marcadores de HC, evaluados por inmunohistoquímica de PCNA, MEF2A, GATA4, CDK9 y NFAT. En cada caso cuantificar el número de núcleos positivos.
- ⊙ Analizar el patrón de expresión de α y β -MHC, mediante qRT-PCR tiempo real.
- ⊙ Correlacionar los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos, con la finalidad de establecer el tipo de hipertrofia cardiaca, así como la etapa de inicio de dicha patología.

MATERIAL

Material biológico

Ratones hembra *Mus musculus*, de la cepa BalbC, fueron sometidos a apareamiento con machos de la misma cepa. La observación del tapón vaginal se consideró como el día cero de gestación, las hembras fueron marcadas y separadas del macho. Se mantuvo control del peso durante la gestación.

Anticuerpos

IgG2a de ratón Anti-GATA4; IgG1 de ratón anti-MEF2 (B-4); IgG1 de ratón anti-NFAT-1 (7AG); IgG2a de ratón anti-Cdk9 (D-7) (Santa Cruz, C.A); IgG2a de ratón anti-PCNA (Dako, USA).

MÉTODOS

Para la obtención de fetos (15-19 dpc), recién nacidos (RN) y neonatos de 7 días (7D), se emplearon 25 ratones hembras preñadas, a partir del 5 dpc, poco después del implante embrionario, fueron inyectadas por vía intraperitoneal con 50 µg/kg/día de isoproterenol (solución 1), durante 7 días, modificación del procedimiento empleado por Iwasaki et al, (1990).

El grupo control o PBS estuvo conformado por 25 ratonas gestantes previamente inyectadas con solución PBS (solución 2) durante 7 días a partir del mismo día y por el mismo periodo que en el grupo experimental.

Con la finalidad de corroborar que el efecto del isoproterenol fuera exclusivo en crías, las ratonas gestantes tratadas con isoproterenol y con PBS, fueron pesadas desde el primer día de gestación hasta el sacrificio, se evaluó el número de crías y reabsorciones por camada. Después de la cesárea para obtener los fetos o posterior al parto el corazón de las ratonas se perfundió para lavarlo con PBS 1x y fijarlo en paraformaldehído 3.5% (solución 3), para su análisis. En los corazones obtenidos de cada grupo experimental y control se realizaron disecciones en 4

cámaras. Los cortes obtenidos fueron fotografiados en un microscopio estereoscópico acoplado a una cámara; en las micrografías se midió el grosor del tabique interventricular y las paredes libres de ambos ventrículos con el uso del programa ImageJ 4.4.3 de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) (Rasband, 1977).

Análisis morfológico

Con la finalidad de establecer cuáles fueron los cambios hipertróficos cardíacos en el modelo, se escogieron, al azar, 6 ratones para cada etapa [15, 17 y 19dpc; RN y 7D], los cuales fueron registrados en su tamaño y peso corporal. Una vez realizadas las mediciones, se extrajo el corazón el cual también fue pesado. El índice de masa ventricular fue calculado dividiendo el peso del corazón (mg) entre el peso del cuerpo del feto o neonato (mg) según el caso. Los corazones fueron perfundidos para lavarlos con PBS1x y fijados con paraformaldehído al 3.5% en PBS, se tomaron micrografías en un microscopio estereoscópico acoplado a una cámara en diferentes aumentos según el estadio.

Para evaluar el grosor de cada pared ventricular se emplearon tres corazones de cada etapa por cada grupo. Fueron cortados en dos, en paralelo al surco aurículo-ventricular. En cada cavidad se midió el grosor de la pared libre de ambos ventrículos y el grosor del tabique interventricular (Etzion et al., 2010).

El resto de las muestras fueron cortadas transversalmente, tomando como referencia la base ventricular (límite inferior de los tractos de entrada y de salida). En cada micrografía se determinaron, el grosor de la pared libre de ambos ventrículos y el grosor del tabique interventricular así como el área de la luz del ventrículo derecho, la del izquierdo y el total ventricular. Para determinar el volumen ventricular y la masa del ventrículo izquierdo, se realizaron las siguientes mediciones en micras: grosor del tabique interventricular (GTIV), diámetro del ventrículo izquierdo (DVI), grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (GPPVI). La masa ventricular y el volumen se determinaron según la fórmula, modificada del método de Penn por Devereux y Relchek (1976)

$$VVI = (DVI + GTIV + GPPVI)^3 - DVI^3 \quad (1)$$

$$MVI = 1.04 (GTIV + DVI + DPPVI) - DVI \quad (2)$$

En donde VVI es volumen del ventrículo izquierdo; MVI, masa del ventrículo izquierdo; 1.04 es una constante que hace referencia a la fuerza de gravedad del miocardio, o gravedad específica.

Para el análisis de imágenes y mediciones de micrografías ópticas se empleó el programa ImageJ 4.4.3 NIH (Rasband, 1977).

Histología

Los corazones disecados se deshidrataron con etanol desde 30% hasta absoluto, se transparentaron con aceite de cedro y se incluyeron en parafina. Los cortes fueron de 6 μm de espesor empleando un micrótopo. Las laminillas, una vez desparafinadas por una hora en un horno para histología a 60 °C y rehidratadas con una serie gradual de etanol (de absoluto a 30%), se lavaron en agua destilada y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H-E).

Para determinar los procesos hipertróficos más dominantes, en cada grupo, se emplearon 3 corazones por etapa para isoproterenol y 3 para control. En ellos se evaluó el espacio intersticial, para lo cual se obtuvieron micrografías con un microscopio convencional a 40X, se tomaron 3 campos de cada una de las estructuras (ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y tabique interventricular), en los cortes transversales, el análisis se hizo a través del programa UTHSCSA ImageTool versión 3.0. (Lukowsk et al., 2010, Brooks y Conrad, 2009).

Inmunohistoquímica indirecta

Con la finalidad de establecer la correlación entre la presencia de los factores de transcripción marcadores de HC, NFAT, MEF2C, GATA4 y Cdk9, y la proliferación celular (PCNA), se realizaron estudios de colocalización. Basados en las instrucciones del fabricante (EnVision™ DuoFLEX Doublestain System, Dako, USA), las laminillas con muestra fueron tratadas con solución de citratos a presión

(15lbs/pulg.²) para liberar al antígeno, posterior a los lavados con PBS-tween 20, se incubaron de 5 a 10 minutos con solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA), de 5 a 10 minutos con solución bloqueadora de peroxidasa (Dako, USA) y se aplicó el primer anticuerpo (anti-MEF2, anti-GATA4, anti-Cdk9, anti-NFAT), durante 30 minutos. El segundo anticuerpo fue un polímero acoplado a peroxidasa de rabano HRP, el complejo fue visualizado con una solución de 3-3'diaminobendina (DAB) como cromógeno. En todos los casos se incubó un segundo anticuerpo primario, anti-PCNA (30 minutos), el cual fue reconocido por un polímero acoplado a fosfatasa alcalina (AP) y visualizado con rojo permanente como cromógeno. Transcurridos los lavados se montaron las laminillas con PBS/glicerol 1:1. Las muestras fueron visualizadas con un microscopio óptico, se tomaron micrografías a 40x, aproximadamente 3 campos para cada una de las estructuras (ventrículo derecho e izquierdo y tabique interventricular). Se determinó el número de núcleos positivos para los marcadores de HC y el número de núcleos positivos para PCNA.

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Los niveles de expresión de la α -MHC y la β -MHC fueron analizadas por qPCR-TR para cada etapa y su control, para ello en cada grupo se obtuvo el RNA total mediante la técnica de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, USA), se separó la fase acuosa después de la aplicación de cloroformo. El RNA fue precipitado mediante adición de isopropanol y lavado con etanol al 70%. El botón de RNA fue resuspendido en 20 μ L de agua libre de RNasas, se cuantificó y determinó el grado de pureza, mediante el uso de un espectrofotómetro, absorbancia a 260/280 nm.

Para la síntesis de cDNA, se empleó 1 μ g de RNA total y la retrotranscriptasa reversa (Super Scrip II Rnase H Revers Transcriptase de Invitrogen Life Technologies, USA). La reacción fue realizada en un volumen total de 20 μ L que incluyó amortiguador de la transcriptasa reversa (20 Mm Tris HCL, 50 mM KCl pH 8.3), 10 mM DTT, hexanucleótidos al azar (25 μ M), inhibidor de RNase (20U)

(Invitrogene Life Technologies, USA), 1mM dNTPs (Promega,USA). La síntesis de cDNA consistió en 10 minutos a 70°C, 10 min temperatura ambiente, 45 min a 42°C, 3 min a 99°C y 2 min a 4°C.

PCR cuantitativa Tiempo Real.

El qPCR-TR, fue realizado en un sistema Mx30005Tm QPCR con un programa MxPro QPCR versión 3.00 (Stratagene, USA) y SYBR Green (Applied Biosystems, USA), como sistema de detección. Las reacciones fueron realizadas en placas de 96 pozos con cinta aislante óptica (Cultek) en un volumen total de 20 µl que contenía el Mix SYBR Green y el cDNA correspondiente a cada muestra (15, 17 y 19 dpc, RN y de 7D de isoproterenol y control). Se empleó como control interno o normalizador el gen 18S RNAr de ratón, el cual fue usado en paralelo para cada corrida. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización 10 min a 95°C; seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s. El paso final de elongación fue de 72°C por 10 min. Todos los cebadores (Tabla 1) fueron diseñados con un intrón de por medio, usando el programa en línea Primers3 (primer3 www.cgi.v0.2). Se usó un control negativo en la reacción de PCR que contenía agua. Cada reacción de PCR fue probada por triplicado para obtener el promedio representativo.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos.

Gen	Cebador	
	Sentido	Antisentido
α-MHC	GGCACAGAAGATGCTGACAA	CTGCCCTTGGTGACATACT
β-MHC	GGCATTGAGTGGACCTTCAT	TCGAGGCTTCTGGAAGTTGGT
RNA 18S	GAGGTGAAATTCTTGGACCGG	TCTTGGCAAATGCTTTCGCT

Análisis estadísticos

En el caso de los estudios morfológicos e histológicos, las diferencias significativas entre los grupos, (isoproterenol y control) se realizaron utilizando una prueba t de Student, con un valor de significancia de $p < 0.05$.

En las inmunohistoquímicas, se cuantificaron el total de núcleos positivos para cada factor de transcripción (GATA4, MEF2c, NFAT, Cdk9), y el total de núcleos positivos a PCNA, los resultados fueron representados en gráficas a partir del promedio calculado y la desviación estándar.

El método Livak (también denominado $\Delta\Delta Ct$), fue utilizado para analizar la cuantificación relativa de qRT-PCR-TR para lo cual se empleó el gen del RNA Ribosomal 18S como gen normalizador y los mismos genes de corazón de ratón adulto como calibrador relativo (Livak, 1997; Livak y Schmittgen, 2001). Los valores calculados fueron presentados en gráficas con su desviación estándar.

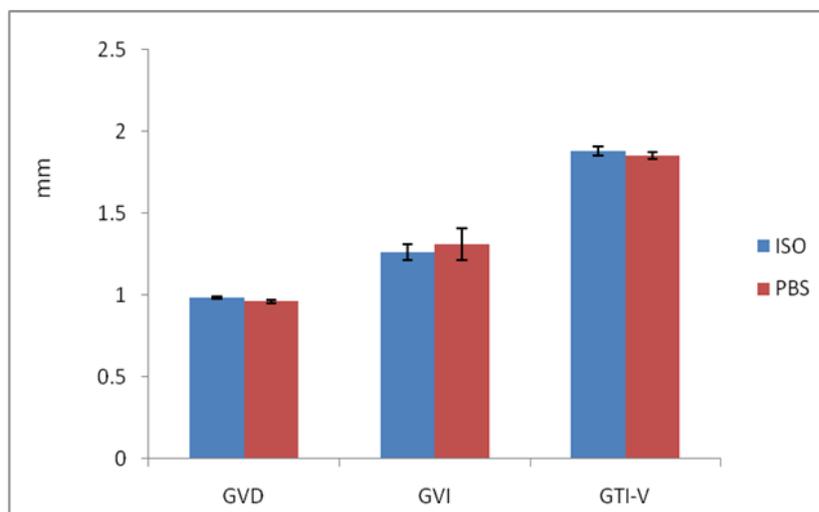
RESULTADOS

Corazones de los ratones hembra adultas

El análisis morfométrico de los corazones de los ratones hembra adultas tratadas con isoproterenol y PBS durante la gestación, fueron hechas en cortes en cuatro cámaras. En la gráfica 2, se muestran las medidas promedio representadas en milímetros (mm) de tres mediciones de cada estructura y de tres corazones, controles y tratados. En ningún caso se presentaron diferencias significativas. Sin embargo la medida en los tratados fue ligeramente mayor que en los testigos (Gráfica 1).

En la figura 1 se muestra la micrografía de corazón adulto control y tratado, con corte en cuatro cámaras en paralelo al surco aurículo-ventricular y transversal tomado como referencia la base ventricular (límite inferior de los tractos de entrada y de salida). Se determinó que no existen diferencias morfológicas evidentes.

El promedio de crías obtenidas de los ratones hembra gestantes en ambos grupos fue de entre 6 y 8, con una baja tasa de reabsorción (Gráfica 2).



Gráfica 1. Análisis morfométrico de un corte en cuatro cámaras de corazón adulto de ratón hembra tratado durante la gestación con isoproterenol. Promedio en milímetros (mm) de: GVD: Grosor de la pared libre del Ventrículo Derecho; GVI: Grosor de la pared libre del Ventrículo Izquierdo; GTI-V: Grosor del Tabique Interventricular.

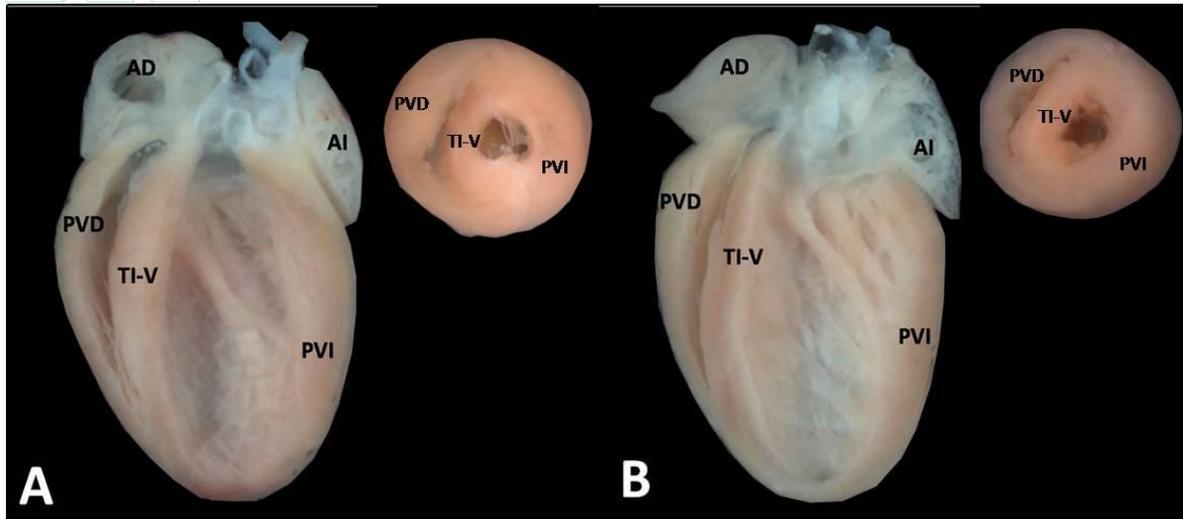
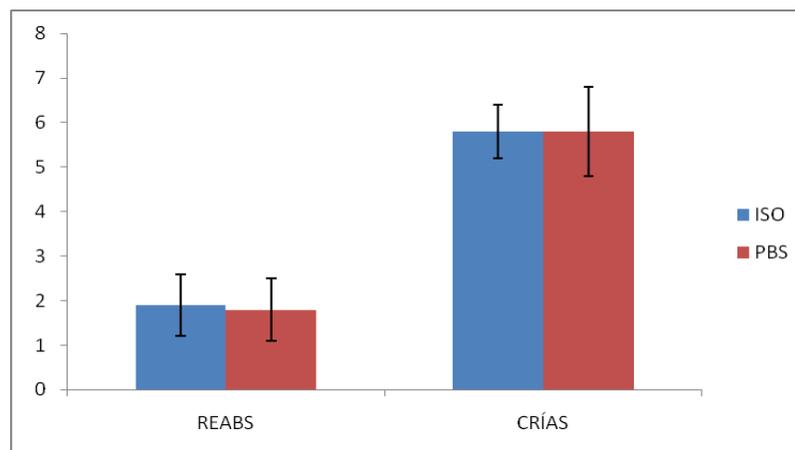


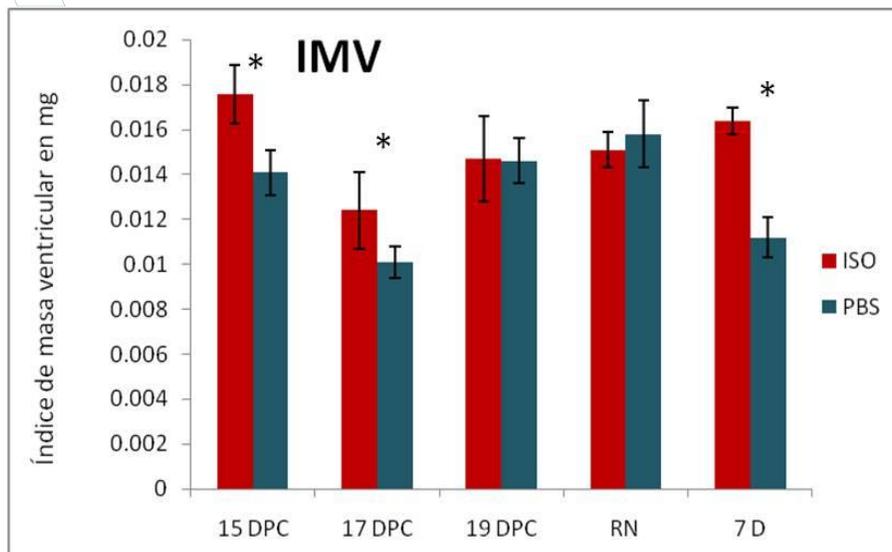
Figura 1. Micrografía de corazón adulto de ratón hembra después del nacimiento de sus crías. Corte en cuatro cámaras y transversal vista frontal 11x, A. Control; B. Tratado con isoproterenol; AD: Atrio derecho, AI: Atrio izquierdo, PVD: Pared del ventrículo derecho, TI-V: tabique interventricular; PVI: Pared del ventrículo izquierdo.



Gráfica 2. Número de crías y reabsorción por camada, de ratones hembra gestantes tratadas con isoproterenol (ISO) y controles (PBS).

Morfometría del corazón de las crías

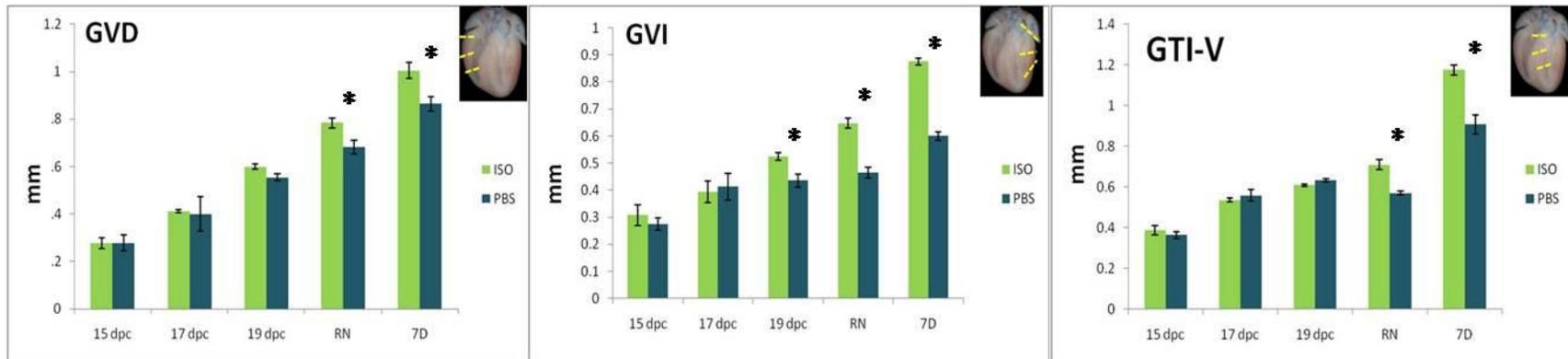
El índice de masa ventricular (IMV), en las crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol durante la gestación, fue mayor que en el grupo control. Se observó una diferencia significativa en el periodo prenatal a los 15 dpc, 17 dpc y 7 días después del nacimiento con una $p < 0.05$ (Gráfica 3).



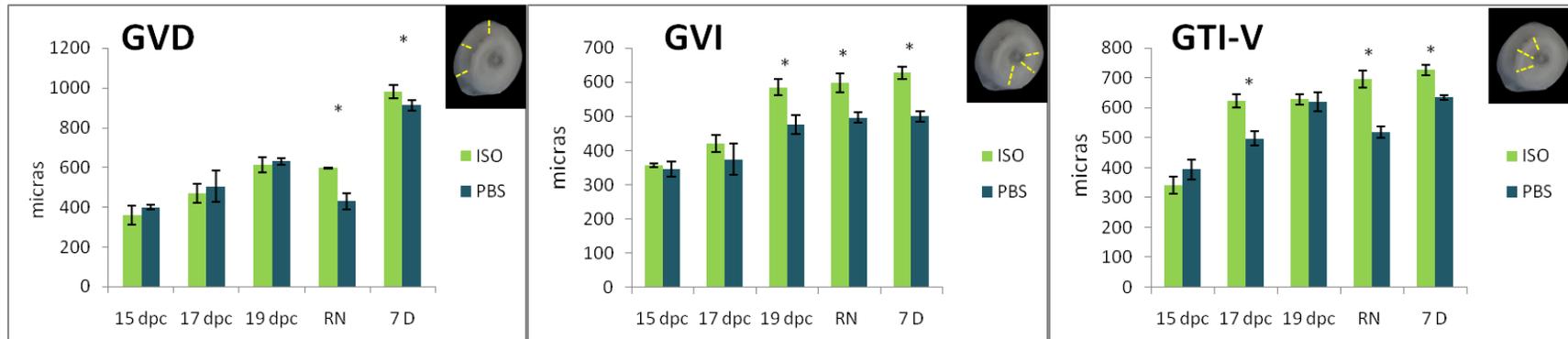
Gráfica 3. Índice de Masa Ventricular de fetos y crías de ratón de madres tratadas con isoproterenol y controles de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (DPC), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D), PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. *, Indica una diferencia significativa con $p < 0.05$.

El grosor de la pared libre de ambos ventrículos y el tabique interventricular, aumenta significativa y gradualmente solo después del 19 dpc comparado con el control. El incremento es más evidente después del nacimiento. Sin embargo, la estructuras más afectadas fueron la pared libre del ventrículo izquierdo y el tabique interventricular ya que aumentó su grosor (Gráfica 4 y 5).

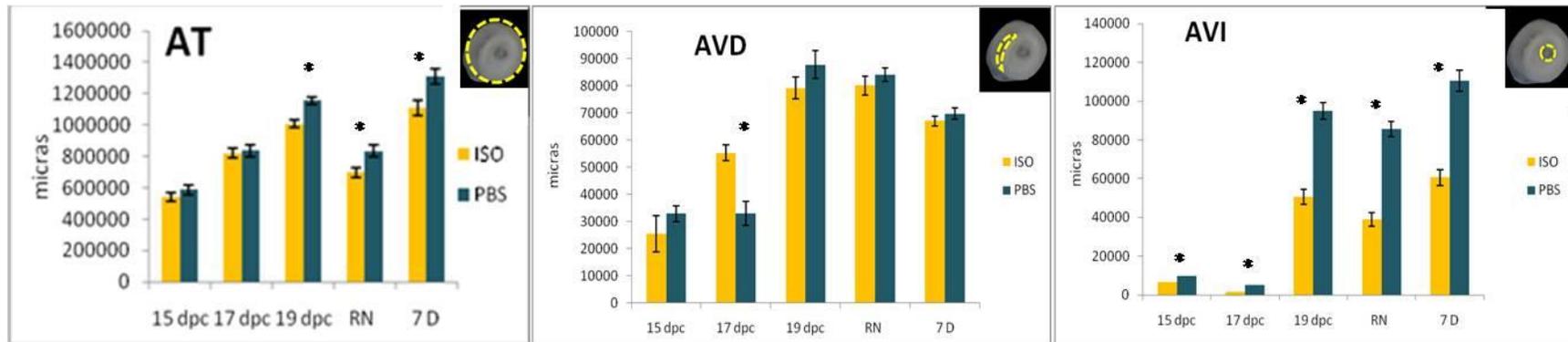
El área de la luz del ventrículo derecho se mantiene casi constante y sin cambios significativos comparado con el control, excepto en el día 17 después del coito, en donde el tratado con isoproterenol es mayor. Sin embargo, se mantienen el resto de los estadios, ligeramente por debajo del promedio del control. El área lineal de la luz del ventrículo izquierdo se reduce significativamente desde antes del nacimiento (19 dpc), aproximadamente a la mitad de los valores para los testigo. Pese a ello el área total lineal ventricular, se mantiene casi constante y sin cambios significativos y solo desde el 19 dpc se mantiene un ligeramente por debajo del control (Gráfica 6).



Gráfica 4. Grosor de la pared libre del ventrículo derecho (GVD), grosor de la pared libre del ventrículo izquierdo (GVI), y grosor del tabique interventricular (GTI-V), en corte en cuatro cámaras de corazones de fetos y crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol y controles de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D), PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. *, diferencia significativa con $p < 0.05$.

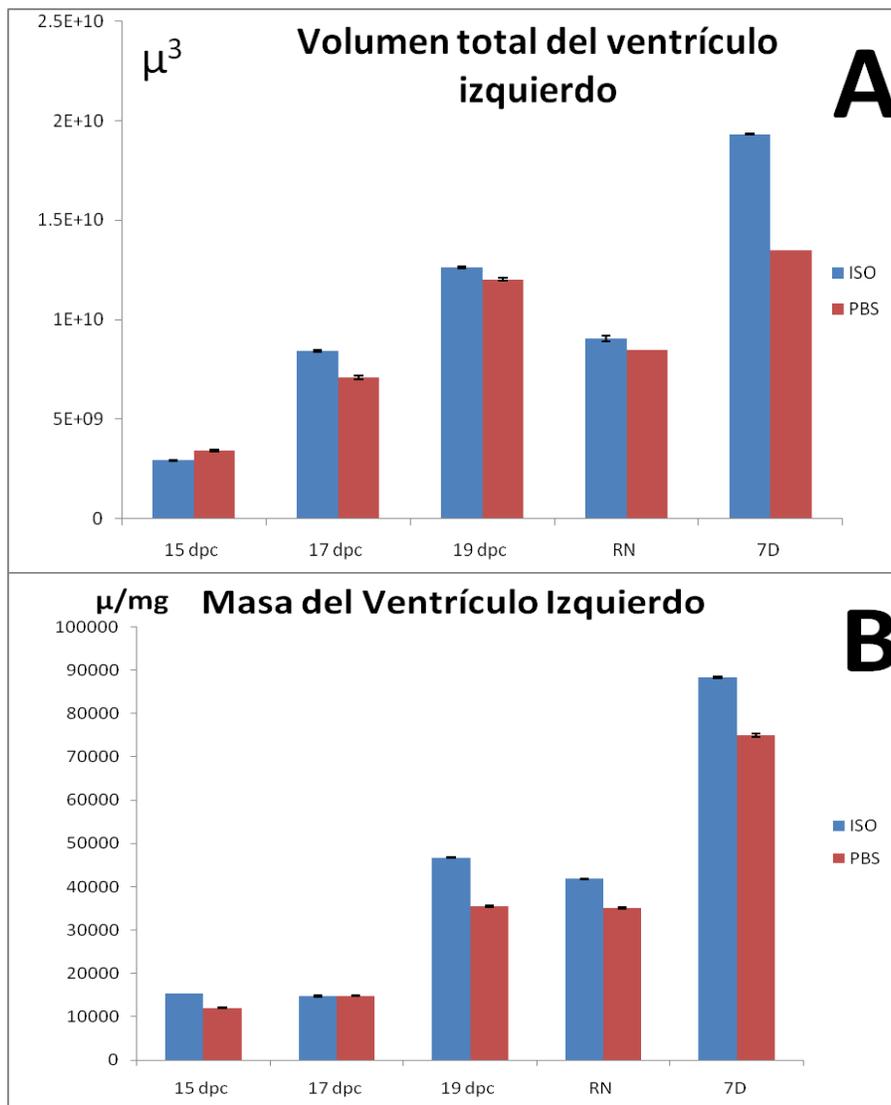


Gráfica 5. Grosor de la pared libre del ventrículo derecho (GVD), grosor de la pared libre del ventrículo izquierdo (GVI), y grosor del tabique interventricular (GTI-V) en corte transversal de corazones de fetos y crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol y controles de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D), PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. *, diferencia significativa con $p < 0.05$.



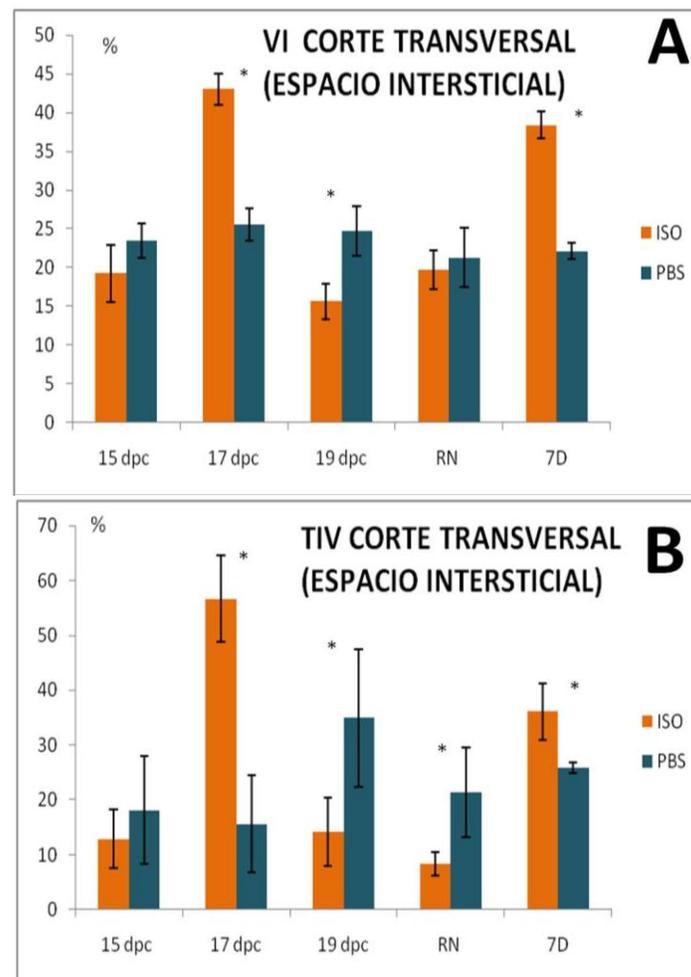
Gráfica 6. Área lineal total ventricular (AT), área lineal de la luz del ventrículo derecho (AVD), área lineal de la luz del ventrículo izquierdo (AVI) de corazones de fetos y crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol y controles de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D), PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. *, diferencia significativa con $p < 0.05$.

El volumen del ventrículo izquierdo del grupo tratado con isoproterenol, fue significativamente menor que el del control en todos los casos, siendo más evidente al día 7 después del nacimiento (Gráfica 7A). En comparación, la masa del mismo ventrículo se incrementó (Gráfica 7B).



Gráficas 7. Volumen del ventrículo izquierdo (A), masa del ventrículo izquierdo (B), de corazones de fetos y crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol y controles de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D), PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol.

El espacio intersticial nos permitió determinar el tipo de hipertrofia presente en el modelo. En ventrículo izquierdo de los controles (Gráfica 8A), el espacio intersticial se mantiene casi constante, sin embargo, en los tratados con isoproterenol, en el estadio 17 dpc y a los 7 días después del nacimiento el aumento del espacio intersticial es significativo, mientras que en el estadio 19 dpc disminuye un poco. En el caso del tabique interventricular (Gráfica 8B), el espacio es mucho más variable de estadio a estadio, Sin embargo sigue el mismo patrón de aumento que en el ventrículo izquierdo.



Gráfica 8. Espacio intersticial. Ventrículo izquierdo (VI), A, tabique interventricular (TIV) B. de corazones de fetos y crías tratadas con isoproterenol y controles de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D), PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol, *, indica una diferencia significativa con $p < 0.05$.

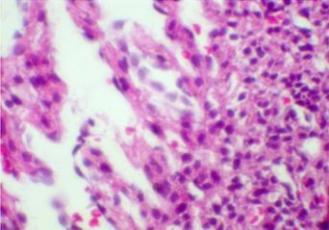
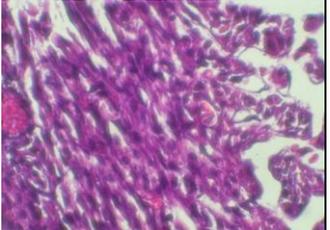
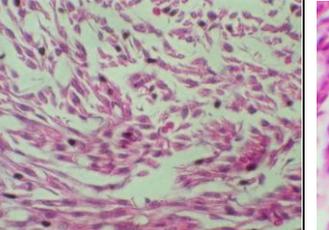
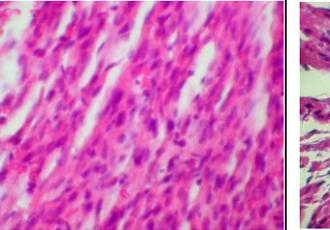
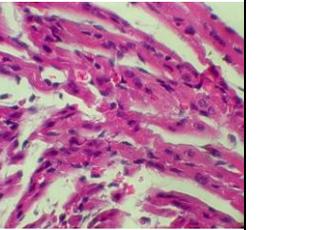
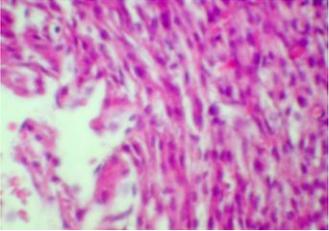
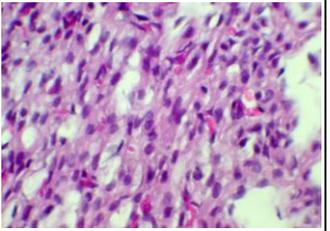
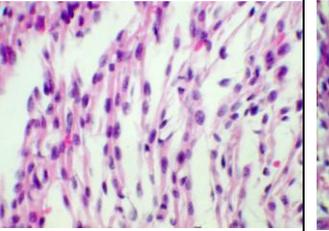
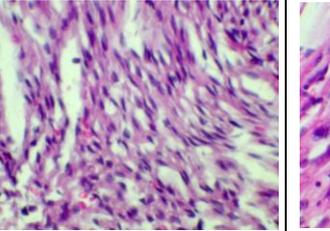
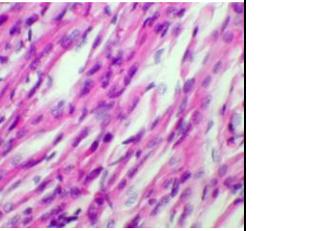
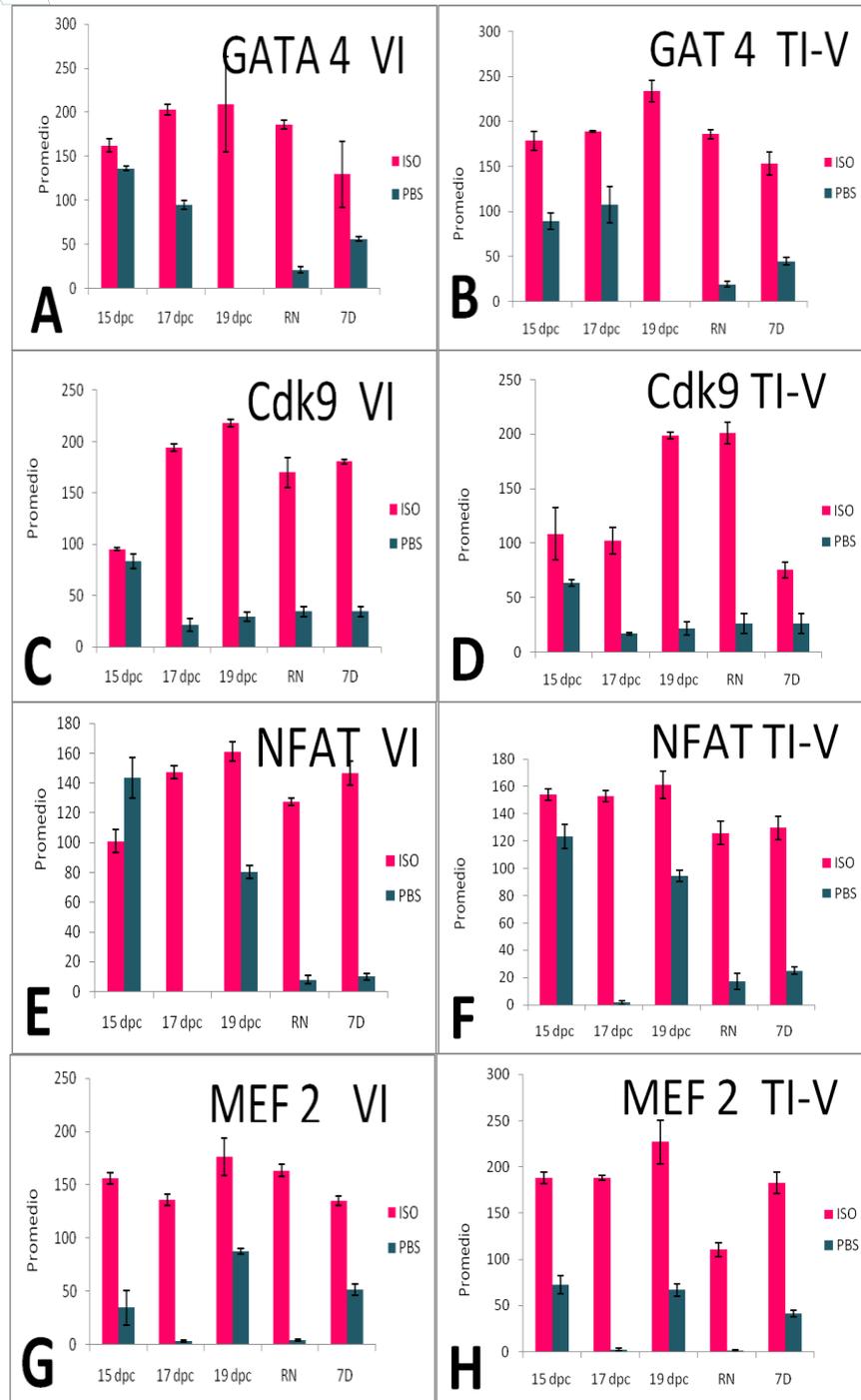
	15 dpc	17 dpc	19 dpc	RN	7D
ISO					
PBS					

Figura 2. Comparación de la región de la pared libre del ventrículo izquierdo en corte transversal, corazones de fetos y crías de ratones BalbC de madres tratadas con isoproterenol (50 µg/Kg de peso) de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D). Tinción con H-E, PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. Amplificación a 40x

Expresión espacio-temporal de los marcadores moleculares de la Hipertrofia Cardíaca en crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol y PBS.

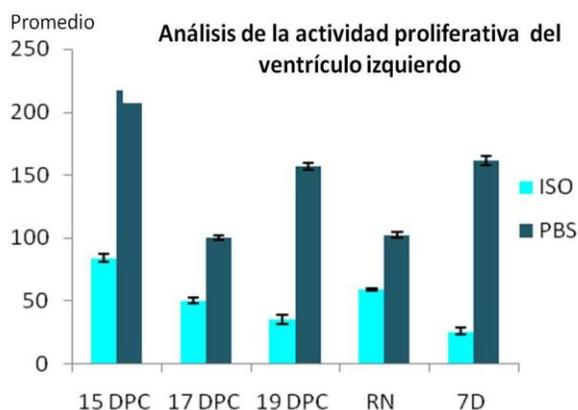
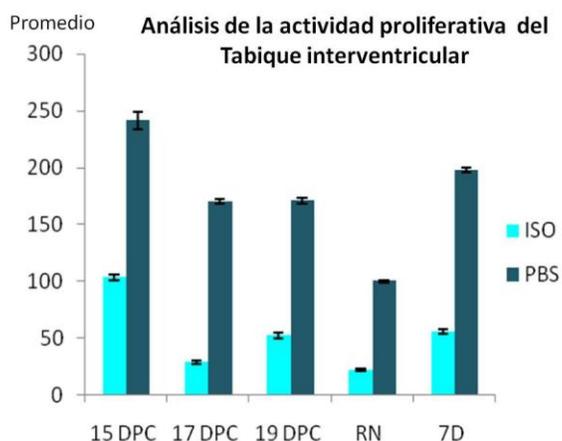
El análisis cuantitativo de todos los factores de transcripción estudiados (GATA4, MEF2c, NFAT y Cdk9), se mantuvo elevado significativamente en los corazones de fetos y crías tratadas con isoproterenol, mientras que, en el control disminuyeron gradualmente sin perderse completamente su expresión (Gráfica 9). En el caso de GATA4, tanto en la región del VI como en el TI-V, en el estadio 19 dpc de los controles, solo aparece citoplasmático, por lo que no fue posible expresarlo gráficamente (Gráfica 9 A y B). En el control, MEF2 es cíclico, comienza elevado, disminuye drásticamente, sin perderse y se vuelve a elevar, mientras que en el tratado con isoproterenol se mantiene elevado y con poca variación (Gráfica 9 G y H). En la gráfica 9F, NFAT, está disminuido significativamente para el tratado con isoproterenol en el estadio 15dpc, sin embargo, a partir del estadio 17 dpc aumenta significativamente.



Graficas 9. Nivel de expresión de marcadores de HC en el tabique interventricular (TI-V) y ventrículo izquierdo (VI) de corazones de fetos y crías de madres tratadas con isoproterenol, de las etapas 15, 17 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D). PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. Análisis por conteo de núcleos positivos de cada marcador: GATA4 (A y B); Cdk9 (C y D); NFAT (E y F); MEF2c (G y H).

Para comprobar que el aumento de tamaño del ventrículo se debe al aumento de tamaño del cardiomiocito y no al incremento en la proliferación celular, se analizó la presencia de PCNA (Gráfica 10).

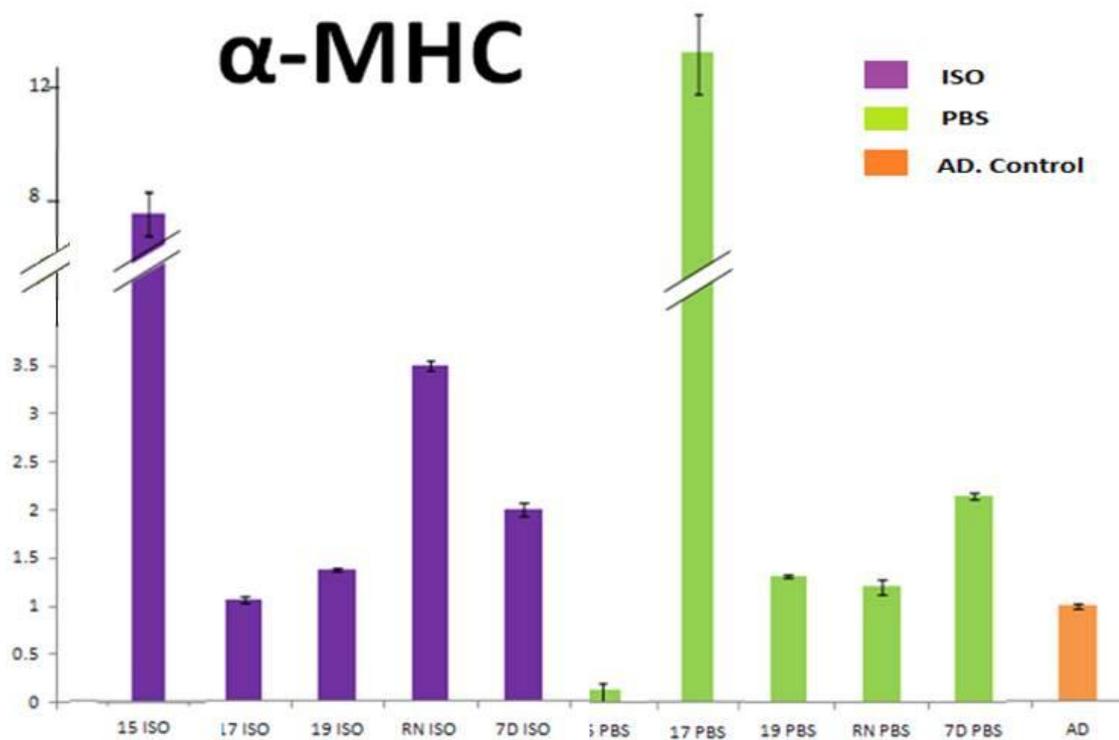
En los controles, tanto para la región del ventrículo izquierdo como el tabique interventricular, la presencia de PCNA varía de forma cíclica en un patrón repetido de aumento y disminución. Mientras que en los tratados con isoproterenol el patrón es similar, pero el número de núcleos marcados con PCNA fue menor a la mitad del valor encontrado en los cardiomiocitos de los controles.



Gráficas 10. Actividad proliferativa en las regiones del ventrículo izquierdo (VI) y tabique interventricular (TIV), de corazones de fetos y crías de ratones de madres tratadas con isoproterenol de las etapas 15, 17 19 días postcoito (dpc), recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D). PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol.

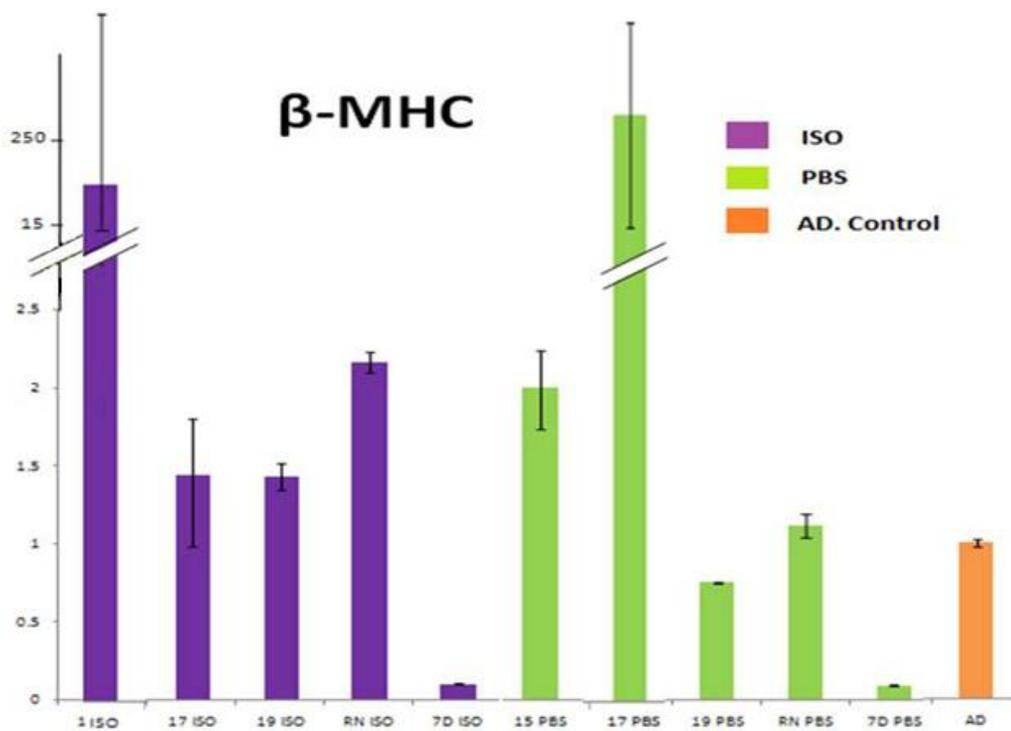
Expresión relativa de α -MHC y β -MHC en el corazón de crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol.

La expresión relativa del gen α -MHC (Gráfica 11), fue un poco mayor en las crías experimentales a partir de RN y 7 días después del nacimiento comparado con el grupo control. Sin embargo, el cambio más significativo fue que en los experimentales este gen tiene un pico mayor dos días antes que en los controles. De tal manera que el 15 dpc la expresión de α -MHC fue 8 veces mayor en los tratados y un incremento similar se observó a los 17 dpc en los controles



Gráfica 11 Expresión de α -MHC, del lado izquierdo los tratados con isoproterenol y del lado derecho los controles, de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D). PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. La última barra muestra al control adulto, normalizado a uno.

La expresión relativa del gen β -MHC (Gráfica 12) fue un poco mayor en las crías de ratones hembra tratadas con isoproterenol que en el grupo control, entre el 15dpc hasta RN, excepto en el 17 dpc del grupo PBS. Al día 7 después del nacimiento en ambos grupos la expresión cae por debajo de 0.05 con respecto al control relativo (AD). Sin embargo, el cambio más significativo fue que en los experimentales este gen tiene un pico mayor dos días antes que en los controles.



Gráfica 12. Expresión de β -MHC, del lado izquierdo los tratados con isoproterenol y del lado derecho los controles, de las etapas 15, 17 y 19 días postcoito, recién nacido (RN) y 7 días de nacido (7D). PBS, controles; ISO, tratados con isoproterenol. La última barra muestra al control adulto, normalizado a uno.

DISCUSIÓN

Frey et al. (2000), propusieron que en la HC del adulto, se presenta una reinducción del programa génico fetal, lo cual provoca cambios en la organización de la estructura sarcomérica, ya que afecta la síntesis proteica de la contractilidad lo que conlleva a un incremento del tamaño del cardiomiocito asociado al aumento de tamaño del corazón. Pese a esta información, hasta hoy en día se desconoce si en la HC infantil o temprana existe un proceso similar que conduce a dicha patología, la cual este asociada a cambios en la expresión de marcadores de HC. Por tal motivo, en el presente estudio se estableció un modelo murino para inducir mediante el suministro de isoproterenol a madres gestantes la HC en los fetos similar a la reportada en adultos.

El modelo consistió en tratar ratones hembra gestantes con isoproterenol. Mediante estudios morfométricos, se demostró, que una dosis de isoproterenol de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso, diaria durante 7 días después del implante (5 dpc), provoca HC en las crías, sin afectar la morfología del corazón de la madre, así mismo tampoco incrementa la tasa de reabsorción.

Respecto de las crías, en este estudio se encontró que la manifestación anatómicas de la HC se destacan después de nacimiento, contrario a lo observa por Iwasaki et al., (1990), quienes reportaron en ratas una HC septal desproporcionada solo durante la etapa fetal. Al respecto, mediante análisis morfométricos solo logramos evidenciar que el corazón de las crías producto de madres tratadas con isoproterenol es mayor que el grupo control.

De acuerdo con la descripción de la patología realizada por Frey (2000), en donde el aumento de tamaño del cardiomiocito conduce al aumento de tamaño del corazón característico de la HC. En las crías obtenidas tratadas con isoproterenol, el análisis del índice de masa ventricular reveló que el corazón es más grande con respecto a los controles, dicho incremento está ligado al índice de masa del ventrículo izquierdo, en el que se observó un incremento significativo del ventrículo

izquierdo, durante todo el estudio. Estos hallazgos, están asociados al incremento del grosor del tabique interventricular y de la pared libre del ventrículo izquierdo, conjuntamente con el decremento de la luz ventricular. Estos resultados demuestran que en nuestro modelo experimental se desarrolló una HC patológica ventricular izquierda, en la que también se ve afectada la compactación del miocardio ventricular, al mismo tiempo que cae la actividad proliferativa, similar a lo observado en una HC de tipo patológica, concéntrica.

Carreño et al., (2006), plantearon, desde un punto de vista fenotípico, que la HC patológica es la más importante, ya que destaca por la activación amplificada de genes marcadores de hipertrofia, además de ser la responsable en la mayoría de los casos de la muerte súbita, caracterizada por la reactivación desequilibrada de genes fetales como α -MHC y el aumento de expresión de diferentes factores de transcripción involucrados en sus síntesis. Al respecto, nosotros encontramos que en las crías experimentales la expresión espacio-temporal de los factores de transcripción, GATA4, MEF2c, NFAT y Cdk9, siempre fue mayor y constante desde la etapa fetal hasta 7 días después del nacimiento, en comparación con el grupo control, lo cual revela su alta actividad biológica en la inducción de la HC temprana, corroborando así nuestra hipótesis (Figura 3). Estos resultados indican que el isoproterenol tienen impacto sobre dichos marcadores, sin embargo, para corroborar este efecto, será indispensable evaluar la presencia de receptores del tipo alfa adrenérgicos y determinar si las vías MAPK (ERK 1/2 y p38) están activadas, lo que permitiría establecer la vía que el isoproterenol activa.

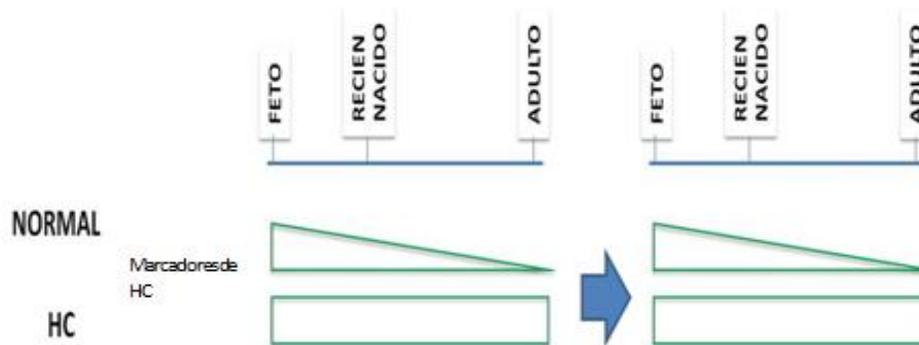


Figura 3. Hipótesis contra resultados. Expresión de marcadores de hipertrofia (GATA4, MEF2c, NFAT y Cdk9). En condición normal e inducción de HC.

Pese a que β -MHC es la isoforma predominante en condiciones normales de los corazones humanos adultos, se ha sugerido que incluso pequeños cambios en la expresión de la isoforma relativa puede alterar significativamente la fuerza del cardiomiocito, β -MHC se caracteriza por tener una menor actividad energética (gasto de ATP), y menor velocidad de acortamiento de los filamentos, pero puede generar mayor fuerza formando puentes cruzados y ahorrando energía que en el caso de α -MHC. Actualmente se sabe que los niveles relativos de expresión de α -MHC y β -MHC pueden estar alterados en enfermedades tales como la insuficiencia cardíaca o la HC, como respuesta adaptativa, a fin de conservar la energía, lo que sugiere, que durante la etapa fetal del corazón normal α -MHC es predominante y, posterior al nacimiento, hay una sustitución de la alfa por la β -MHC. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que los niveles de expresión del mensajero de la α -MHC tanto en los fetos de las crías tratadas con isoproterenol como con PBS, son mayores que en el corazón del adulto normal, incluso 7 días después del nacimiento; mientras que los niveles de expresión β -MHC, en ambos grupos son superiores a los niveles normales durante la etapa fetal, y posteriormente al nacimiento decaen, contrariamente a lo esperado. Por tanto, estos resultados sugieren que α -MHC y β -MHC, son marcadores indicativos del estado de la gravedad de la HC temprana o infantil. Similar a lo demostrado por Krenz (2004), quien, a través del uso de ratones transgénicos carentes de la expresión casi total de β -MHC, encuentra que tiene una función cardíaca contráctil

reducida significativamente, pero los animales estaban sanos, tenían una vida normal y no mostraron ninguna patología cardíaca a nivel microscópico

En este trabajo se muestran, por primera vez, los niveles de expresión del mensajero de la forma β -MHC, considerada como característica de la forma madura de etapas adultas; mediante qPCR-TR, hemos demostrado que dicha forma es muy constante en la etapa fetal hasta el RN de corazones normales, sin embargo, es preciso evaluar los niveles de expresión de la proteína β -MHC, con la finalidad de determinar el estado de madurez del corazón y en etapas más avanzadas.

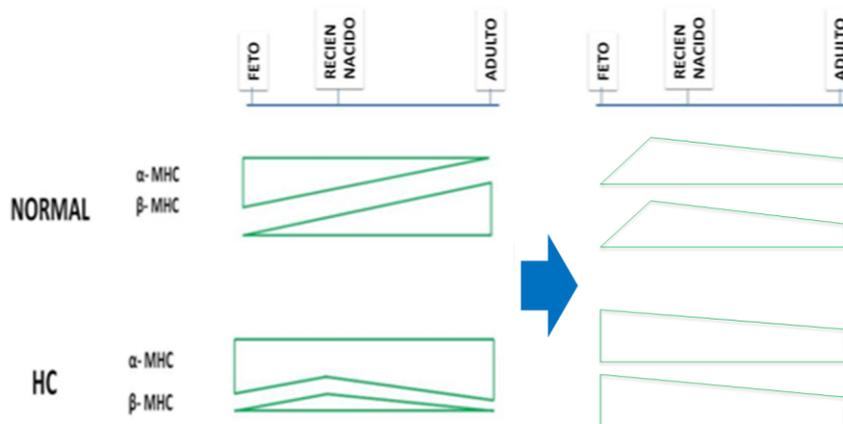


Figura 4. Hipótesis contra resultados. Expresión espacio-temporal de α -MHC y β -MHC, condición normal e inducción de HC.

Durante la miogénesis del músculo esquelético y el cardíaco, la expresión específica de genes es controlada por las redes de transcripción miogénica y la participación de los reguladores de la transcripción. Avances sustanciales logrados en los últimos años para dilucidar los mecanismos que conduce a la hipertrofia, han identificado un conjunto de mecanismos de señalización que se extienden a corto plazo (0.5 a 60 min) para la reprogramación de la expresión génica hacia un fenotipo cardíaco fetal (Fink et al., 2000). Hoy en día, se ha demostrado que otras moléculas, conocidas como microRNAs (miRNAs o miRs), regulan diversos procesos biológicos, incluyendo la autorenovación y la diferenciación de células

madre embrionarias, a través de la inhibición de la traducción de RNA transcrito (Tomohide et al., 2009). Actualmente, han sido considerados como agentes terapéuticos para silenciar genes causantes de enfermedades. Así mismo, datos recientes sugieren que los miRNAs están implicados en la etiología de la enfermedad cardíaca y la remodelación de los corazones, incluyendo la hipertrofia cardíaca (Markham y Hill, 2010).

Hasta la fecha, en la HC del adulto se han establecido experimentalmente 11 miRNAs, 9 prohipertróficos y dos antihipertróficos. Estos incluyen miR-1, 133, 129, 18 ter, 195, 21, 23 bis, 23 ter, 24, 208 y 212. Sin embargo, no se han establecido los niveles de expresión de dichos grupos de miRs en la HC temprana, por lo que consideramos, que el modelo de hipertrófica cardíaca temprana inducido con isoproterenol propuesto en este trabajo, sería una herramienta útil en la valoración de los microRNAs pro- y anti-hipertróficos. Los que podrían ser la clave para su diagnóstico temprano.

CONCLUSIONES

1. La dosis intraperitoneal de isoproterenol de 50 μ g/Kg/día durante siete días después del implante embrionario, no produce hipertrofia cardiaca en las ratonas hembras gestantes.
2. El análisis morfométrico reveló que las crías de madres tratadas con isoproterenol desarrolla un HC de tipo concéntrica, la cual carece de compactación miocárdica, con baja tasa de proliferación celular, además está dirigida al ventrículo izquierdo y con afección del tabique interventricular.
3. Los factores de transcripción MEF2A, GATA4, CDK9 y NFAT, en las crías tratadas con isoproterenol están sobre-expresados desde 15 dpc y se mantienen así hasta después del nacimiento asociados con los cambios morfológicos.
4. La expresión relativa del RNAm del α -MHC demuestra que la contractilidad en las crías de ratones hembras tratadas con isoproterenol debe ser lenta, mientras que la expresión de β -MHC, es menor, pero nunca decae por completo. Además de que el máximo de su expresión se muestra antes en el corazón de las crías de ratones hembras tratadas con isoproterenol.

PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de los marcadores de HC (GATA 4, MEF2c, NFAT y Cdk9), en el ventrículo derecho de neonatos y evaluar la expresión de los receptores tipo β -adrenérgicos y algunos MAPK (ERK1/2 y P38).
- Evaluar los niveles de expresión de β -MHC, para determinar el estado de madurez y seguirlo a mayor edad (extensión a 15 días después del nacimiento).
- Determinar si los niveles de α -MHC, son traducidos a proteína por medio del uso de la técnica de Western Blot.
- Establecer y correlacionar la expresión de microRNAs pro- y anti-hipertróficos en nuestro modelo, los cuales podrían ser la clave para el diagnóstico temprano de la hipertrofia cardiaca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahuja P, Sdek P, and Maclellan WR. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev* 2007; 87: 521-544.
2. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2003; 92:1079-88.
3. Beisvag V, Kemi OJ, Arbo I, Loennechen JP, Wisloff U, Langaas M, Sandvik AK, Ellingsen. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009; 16: 690-697
4. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen J, Rajagopal S, Son JK, MaQ, Springer Z Kang PM, Izumo S, Pu WT. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiol function and protection from pressure overload-induced heart failure. *PNAS.* 2006;103:14471-14476.
5. Brooks WW* and Conrad ChH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in Mice: Structural and functional correlates. *Comp Med.* 2009; 59: 339-343.
6. Burggren WW and Keller Bradley. Development of Cardiovascular systems, Molecules to organism. Cambridge 1997 1a Edición pp. 88-98.
7. Cannan CR, Reeder GS, Bailey KR, Melton LJ, Gersh BJ. Natural history of hypertrophic cardiomyopathy. A population based study. *Circulation.* 1976; 92: 2488-2495.
8. Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil J. Cardiac hypertrophy: Molecular and Cellular Events. *Rev Esp Cardiol.* 2006; 59: 473-486.
9. Cha H, Hong G, Yong K, Jong K, Jin D, So P. Deficiency of iNOS Does Not Prevent Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009; 13: 153-159.
10. Crilley JG, Boehm EA, Blair E. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy *J. Am Coll Cardiol.* 2003;41:1776-1782.
11. Devereux RB and Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation.* 1997; 55:613-618.
12. Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res.* 2003; 92: 1171-1175.

13. Ennis IL y Escudero E. Hipertrofia cardiaca. *Cardiol Mex.* 2004; 65: 123-148
14. Escudero E. y Pinilla OA. Paradigms and paradoxes of left ventricular hypertrophy: from the research laboratory to the clinical consultation. *Arch Cardiol Mex* 2007; 77: 237-248.
15. Etzion S, Etzion Y, Debosch B, Crawford PA, Muslin AJ. Akt2 deficiency promotes cardiac induction of Rab4a and myocardial β -adrenergic hypersensitivity. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:931-40.
16. Fink C, Ergun S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *The FASEB Journal* 2000; 14: 669-679.
17. Francis GS, McDonald K, Chu C, Cohn JV. Pathophysiologic aspects of end-stage heart failure. *Am J Cardiol* 1995;75:11A-16A.
18. Frey N, Katus HA, Olsen EN, Hill JA.. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?. *Circulation.* 2004; 109: 1580-1589.
19. Frey N, Richardson JA, Olson EN. Calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:14632-14637.
20. Frey N, y Olson EN. Cardiac Hypertrophy: The good, the bad and the ugly. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65: 45-79.
21. Galindo CL, Skinner MA, Errami M, Olson LD, Watson DA, Li J, McCormick JF, McIver LJ, Kumar NM, Pham TQ, Garner HR. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. *BMC Physiology.* 2009; 9: 1-23.
22. Gálvez G, Sandoval R, Armendáriz B. Transforming growth factor-beta as a therapeutic target. *Salud Publica Mex.* 2004; 46: 341-350.
23. Ganong WF. *Fisiología Médica. Manual Moderno 20a Edición* 2006 pp 61-78.
24. Georgakopoulos D, Tolis V. Hypertrophic cardiomyopathy in children, teenagers and young adults. *Hellenic J Cardiol.* 2007 48(4):228-33
25. Gómez H LLambi, Kuraja I, Massadi a, Gallo A, Fontan M, Taquini CM. Efecto de la alfa metildopa sobre el corazón en la hipertensión renovascular. *Medicina (Buenos aires)* 1998; 50: 135-140

26. Heather LC, Catchpole AF, Stuckey DJ, Cole MA, Carr CA, Clarke K. Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities: similar to those found in the infarcted rat heart. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 31-39
27. Ho YL, Wu CC, Lin LC, Huang CH, Chen WJ. Assessment of the coronary artery disease and systolic dysfunction in hypertensive patients with the dobutamine-atropinestress echocardiography effect of the left ventricular hypertrophy. *Cardiology*. 1998; 95:1592-1600.
28. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999; 341:1276-1283.
29. Iwasaki T, Takino Y, Suzuki T. Effects of isoproterenol on the developing heart in rats. *Jpn Circ J*. 1990; 54: 109-116.
30. Kajstura J, Zhang X, Liu Y, Szoke E, Cheng W. The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy. *Circulation*. 1995; 92:2306-2317.
31. Kajtura J, Cheng W, Reiss K, Anversa P. The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy in vitro. *Exp Cell Res*. 1994; 215: 273-283.
32. Kook H, Lepore J, Gitler AD, Lu MM, Yung WW, Mackay J, Zhou R, Ferrari V, Gruber P, Epstein J. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest*. 2003; 6: 863-871.
33. Krenz Maiké, Jeffrey MD, Robbins PD. Impact of Beta-Myosin Heavy Chain Expression on Cardiac function During Stress. *J. Am Coll Cardiol*. 2004; 44:2390-2397.
34. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990; 24:1706-1707.
35. Lijnen P, Petrov V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31:949-970.
36. Livak KJ. ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2. Relative quantification of gene expression ABI Company publication. 1997.
37. Livak KJ, Schmitlen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(t)} Method. 2001 25; 4: 402-408.

38. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. 2009. *Biología Celular y Molecular*. 5a Edición, Editorial Panamericana. pp 567.
39. Lukowski R, Rybalkin SD, Loga F, Leiss V, Beava JA. *PNAS* 2010; 107: 5646-5651.
40. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol*. 2001; 229:141-162.
41. Mariand AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophy cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:655-670.
42. Markham DW y Hill JA. MicroRNAs and Heart Failure Diagnosis MiR-acle or MiR-age?. *Circ Res*. 2010; 106: 1011-1013
43. Maron BJ. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979; 59: 689-706.
44. Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*. 2000;86: 386-390.
45. Molkenin JD, Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. 2001; 63:391-426.
46. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 37:449-471.
47. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 1990; 81: 1161-1172.
48. Ramírez CD, Padrón R. Cardiomiopatía Hipertrófica familiar: Genes, mutaciones y modelos animales. *Revisión. Invest. Clín*. 2004; 45:69-100.
49. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011.
50. Reiser PJ, Portman MA, NingXH, Schomisch Moravec C. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atrial and ventricles. *Am J Physiol* 2001; 280: H1814-H1820.
51. Reiss K, Kajstura J, Capasso JM, Marino TM, Anversa P. Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with

- activation of the myocyte IGF1 autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats. *Exp Cell Res.* 1993; 207: 348-360.
52. Rico A, Lucena J, Salguero M, Blanco M, Marín R, Barrero E, Luna MA. Hypertrophic cardiomyopathy presenting as sudden death in a young woman. *Cuad Med Forense* 2007; 13:57-63.
53. Russel B, Motlagh D, Ashley WW. Form follows function: How muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1127-1132.
54. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59:551-571.
55. Shore P, Sharrocks AD. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem.* 1995; 1;229(1):1-13
56. Sullivan JM, Van der Zwaag RV, el-Zeky F, Ramanathan KB, Mirvis DM. Left ventricular hypertrophy: efecto on survival. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22: 508-513.
57. Tomohide T, Koh O, Teruhisa K, Rieko T, Shinji K, Tatsuya M, Hiromichi W, Toru K, Akira S, Koji H. MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in Spontaneous Myocardial Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Circ J.* 2009; 73: 1492-1497.
58. Torpi MJ. Causas de Hipertrofia Cardiaca. *JAMA.* 2004; 292:19
59. Trend S. G. and Bruce N. W. Resistance of the rat embryo to elevated maternal epinephrine concentrations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1989; 160:498-501.
60. Vargas M, Rivera P, Paz OM, Jalil J. La vía de señalización Rho A/Rho Kinasa se encuentra activada en el miocardio en ratas con fibrosis cardiaca inducida por isoprotenerol. *Rev. Chil Cardiol* 2009; 1: 81-89.
61. Wang Y, Huang S, Sah V. Ross J, Brown, JH, Han J, y Chien KR. Cardiac Muscle Cell Hypertrophy and apoptosis Induced by Distinct Members of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Family. *The Journal of Bioll Chem* 273;23: 2161-2168.
62. Yan L, Li-Na W, Yu-Hui X, Hong-ZL, Feng GX, Ya-Jun Z, Ye T, Bao-FY, Chang QX. Arginine Inhibits Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy through Nitric Oxide and Polyamine Pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 103: 124-130

Xilol II	5 minutos
Alcohol absoluto	de 2 a 5 minutos
96%	de 2 a 5 minutos
90%	de 2 a 5 minutos
80%	de 2 a 5 minutos
70%	de 2 a 5 minutos
60%	de 2 a 5 minutos
50%	de 2 a 5 minutos
40%	de 2 a 5 minutos
30%	de 2 a 5 minutos
H ₂ Odd	5 minutos
Hematoxilina de Harris	de 1 a 3 minutos
H ₂ Odd	3 minutos
Alcohol al 70% más HCl	rápido
H ₂ O de la llave más amoniaco	3 minutos
H ₂ Odd	5 minutos
Eosina	2 minutos
Alcohol 96%	rápido
Alcohol 96%	rápido
Alcohol absoluto	rápido
Xilol III	3 minutos

Las laminillas se limpian y se montan con entellan.

3 Preparación de laminillas con Poli?- L-Lisina.

Se usa poli-L-Lisina, diluida 1:10 en agua destilada.

Se lavan las laminillas con detergente dextran, se enjuagan con agua corriente, se enjuagan con agua destilada, se dejan secar a temperatura ambiente, se lavan con alcohol al 70% en agua destilada por 10 minutos, se dejan secar a temperatura ambiente, se colocan en la solución de poli-L-Lisina de 10 a 20 minutos en agitación suave y se dejan secar a temperatura ambiente, y se guardan.

Soluciones

1 Isoproterenol. Bitartrate salt. Sigma Aldrich 129K5005

Se diluye en PBS 1x estéril a una concentración de 50µg por mililitro de solución, por ratón se administran 100µL.

Se mantiene en refrigeración y cubierto de la luz para evitar su oxidación.

2 PBS 1x

REACTIVOS	MOLARIDAD	GRAMOS
NaCl	137mM	4.00g
KCl	2.7mM	0.10g
Na ₂ PO ₄	4.3mM	0.72g
KH ₂ PO ₄	1.47mM	0.12g
H ₂ O _{dd}	500mL	

Se esteriliza bajo 120°C y 20 Lb de presión durante 20 minutos.

2 Paraformaldehído 3.5%,

Se prepara en PBS1x estéril, 3.5 gramos de paraformaldehído por cada 100ml de PBS. Se disuelve calentando ligeramente el PBS.



MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Reyna Carmen Fierre Pastrana

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis
Experimental. Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Karla G. Carvajal Aguilera

Laboratorio de Nutrición Experimental

Instituto Nacional de Pediatría

Dr. David Cruz Robles

Departamento de Biología Molecular

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez