

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA  
REMODELACION DEL TEJIDO CARDIACO DURANTE EL  
INFARTO EXPERIMENTAL INDUCIDO CON  
ISOPROTERENOL EN RATAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**  
P R E S E N T A :  
**LIDIA MARTINEZ PEREZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ

MEXICO, D. F.

FEBRERO, 2004.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Martínez Pérez Lidia

FECHA: 16 febrero 2004

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Martínez Pérez Lidia**, con número de cuenta 82156264, con la tesis titulada: "Estudio de los genes involucrados en la remodelación del tejido cardíaco durante el infarto experimental inducido con isoproterenol en ratas.", bajo la dirección del(a) **Dra. Victoria Chagoya de Sánchez**.

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Vocal:	Dr. Rolando Hernández Muñoz
Secretario:	Dr. Enrique Gijón Granados
Suplente:	Dra. Verónica Guamer Lans
Suplente:	Dr. Jorge Pablo Suárez Munguía

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de octubre de 2003.

Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



El presente trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y con el financiamiento a proyectos auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del donativo número 30979-M.

Durante la realización del proyecto el comité tutorial integrado por la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Rolando Hernández Muñoz y el Dr. Jorge Pablo Suárez Munguía quienes formaron parte de un grupo de trabajo en la corrección y enriquecimiento de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por su dirección y apoyo para la realización de esta tesis.

Agradezco al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz y Dr. Jorge Pablo Suárez Munguía, miembros de mi comité tutorial por sus valiosos consejos y orientación para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Enrique Gijón Granados, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Verónica Guarner Lans y Dr. Jorge Pablo Suárez Munguía por su apoyo en la corrección del manuscrito y su interés en la buena presentación de este trabajo.

A la Q.B.T. Cristina Trejo Solís por su asesoría técnica y académica que amablemente me otorgó durante el tiempo de estudio.

Al M. en C. Juan Antonio Suárez Cuenca por su valiosa ayuda en la realización de una de las gráficas de este trabajo, por su apoyo con el equipo de computo, por su buena disposición, por su amistad y por los buenos momentos.

A mi compañera de trabajo Biol. Susana Vidrio Gómez por su apoyo moral y por los buenos momentos en la realización de este estudio.

A mi compañera de trabajo Q.F.B. Lucía Yáñez Maldonado por su apoyo moral y por los buenos momentos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Lilia Loredó del departamento de patología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por su asesoría en la identificación del sitio de infarto experimental en el corazón de la rata.

A la Lic. en Diseño Gráfico Laura Sánchez Chagoya por su participación en las fotografías del infarto experimental.

Dedico esta tesis con mucho cariño

A mi hijo  
Fernando

## ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
HA	Ácido hialuronico
AcilCoA	Acil coenzima A
ATP	Adenosina 5' trifosfato
aa	Aminoácido
ATPasa de Na-K	ATPasa de sodio y potasio
ATPasa del C <sup>+</sup>	ATPasa del calcio
BSC-1	Células epiteliales de riñón de mono
MMPs	Colagenasas
Col I	Colágena tipo I
Col III	Colágena tipo III
GDP	Difosfato de guanina
NADH	Dicotina adenina dinucleótido reducido
NADPH	Dicotina adenina dinucleótido fosfato reducido
ARE	Elemento de respuesta a la activina
TAE	Elemento activador transformante
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
G1	Fase G1 del ciclo celular
S	Fase S del ciclo celular
PMSF	Fenilmetilsulfonil Fluoruro
FN	Fibronectina
NRK	Fibroblastos de riñón de rata normal
AKR-2B	Fibroblastos de riñón de ratón
FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido reducido
GTP	Guanina 5' trifosfato
ISO	Isoproterenol
IM	Infarto del miocardio
IAM	Infarto agudo del miocardio
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
KD	Kilo Daltones
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MEC	Matriz Extracelular
mM	Milimolar

MyoFb	Miofibroblastos
M	Molar
GroEL	Molécula chaperona de <i>E. coli</i>
$\beta$ 1-LAP	Péptido asociado a la latencia de beta 1
pM	Picomolar
LTBP	Proteína latente unida a TGF- $\beta$
BMP	Proteína morfogenética del hueso
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kilo Daltones
Hsp40	Proteína de choque térmico de 40 kilo Daltones
SARA	Proteína de anclaje que activa el receptor TR $\beta$
$\alpha$ (FAP- $\alpha$ )	Proteína alfa activadora de fibroblastos
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RS	Retículo sarcoplásmico
TR $\beta$ I	Receptor tipo I de TGF- $\beta$
TR $\beta$ II	Receptor tipo II de TGF- $\beta$
[ $\alpha$ - $^{32}$ P] CTP	Trifosfato de citocina marcado con fósforo 32

# I. ÍNDICE

I.	Índice.....	1
II.	Resumen.....	2
III.	Introducción.....	3
IV.	Antecedentes generales.....	5
	a) Patología del infarto.....	5
	b) Principales componentes de la Matriz Extracelular.....	10
	1. Fibroblastos.....	10
	2. Colágena.....	12
	3. Fibronectina.....	14
	c) Reguladores de la síntesis de la Matriz Extracelular.....	16
	1) Proteína de choque térmico Hsp70.....	16
	2) Factor de crecimiento transformante beta.....	18
V.	Antecedentes específicos.....	25
	a) Modelo experimental de infarto.....	25
VI.	Hipótesis.....	28
VII.	Objetivo.....	28
VIII.	Método.....	29
	a) Animales y preparación de las muestras.....	29
	b) Preparación del RNA e hibridización del DNAc.....	29
	c) Western blot.....	30
	d) Slot blot de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 y Fibronectina.....	31
IX.	Resultados.....	32
X.	Discusión.....	37
XI.	Conclusión.....	43
XII.	Aportaciones.....	44
XIII.	Perspectivas.....	46
XIV.	Referencias.....	47

## II. RESUMEN

El infarto agudo del miocardio (IAM) constituye la segunda causa de muerte en nuestro país, por lo que es importante conocer la evolución y secuencia de los cambios fisiológicos y bioquímicos involucrados en esta patología. Una isquemia prolongada puede originarse por obstrucción de la arteria coronaria, sin embargo en el modelo experimental establecido en el laboratorio se induce por el isoproterenol que provoca una isquemia funcional aunado a una sobrecarga de la frecuencia cardiaca que aumenta un 50-80% por un tiempo de aproximadamente 12 h, ocasionandose una falla congestiva del corazón. Subsecuente al infarto la matriz extracelular (MEC) del tejido cardiaco dañado se reemplaza para reparar la lesión. En este estudio se trató de conocer la tasa de expresión de algunos de los genes que inician el proceso de cicatrización del tejido cardiaco a nivel de la MEC así como los factores que lo regulan, midiendo las proteínas de la MEC como colágena tipo I y tipo III, fibronectina, factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1,3) y la proteína de choque térmico Hsp70, en una secuencia temporal del infarto experimental que comprende entre 0.25 h a 96 h, periodo en el que se inicia la formación de algunas proteínas de la MEC del tejido cardiaco y su transcrito.

Para ello se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar que corresponde a la especie *Rattus norvegicus* de 250 g de peso, a los que se les administró isoproterenol vía s.c. (67 mg/kg). Los animales se sacrificaron a distintos tiempos y se disecó el sitio del infarto en el ventrículo izquierdo. Se separó el RNA total y se hibridizó con su DNAc correspondiente marcado con fósforo 32 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP. Las proteínas se midieron por medio de las técnicas de Western blot y Slot blot y cada proteína se trató con sus respectivos anticuerpos.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran claramente la acumulación de la colágena tipo I y la disminución de la colágena tipo III en el tiempo estudiado. Se hace evidente la regulación de estos procesos por el TGF- $\beta$ 1 y la protección por la Hsp70. Los estudios previos del laboratorio sugieren la participación del estrés oxidativo y la hipoxia observadas en este modelo como inductores de algunos de los genes que participan en el proceso de cicatrización.



## II. SUMMARY

The myocardial acute infarction (MAI) constitutes the second cause of death in our country, and that's why it is important to know the evolution and sequence of the physiological and biochemical changes involved in this pathology. A long-time ischemia can be due to coronary artery obstruction; however, in the experimental model used in the laboratory a functional ischemia can be induced by isoproterenol, which causes an overload of the heart rate increasing up to 50-80% during approximately 12 h, leading to a congestive heart failure. After the infarction, extracellular matrix (ECM) of the damaged heart, shows a turnover in order to repair the damage. This study was developed to figure out the expression of some genes which increase along the scaring process at the ECM level, as well as their regulating factors. ECM proteins like type I and type III collagens, fibronectin, transforming growth factor beta (TGF-(1,3) and the heat shock protein Hsp70, were measured in a time course sequence (0.25 to 96 h.) of the experimental infarction. During this period of time, it starts the formation of some proteins of the heart ECM tissue, and their mRNA transcripts.

Wistar male rats belonging to the species *Rattus norvegicus* of 250 g weight, were used. Isoproterenol was administered by subcutaneous injection (67 mg/kg). The animals were sacrificed at different times, and the site of the infarction was dissected in the left ventricle. Total RNA was isolated and hybridized with its corresponding 32-phosphorus-dCTP-labelled cDNA ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP). The proteins were measured by means of Western blot and Slot blot techniques and each protein was treated with its respective antibody.

The results obtained in this study clearly show the deposition of type I collagen and the decrease of type III collagen during the studied period. It becomes evident that these processes are regulated by TGF $\beta$ 1 and they are protected by Hsp70. Previous studies of the laboratory suggest the participation of the oxidative stress and hypoxia in this model as inducers of some genes involved in the scaring process.

### III. INTRODUCCIÓN

El infarto agudo del miocardio constituye la segunda causa de muerte en nuestro país (1), por lo que es importante conocer la evolución y los mecanismos bioquímico-fisiológicos que faciliten su prevención y tratamiento. La mortalidad ha disminuído en los últimos años, principalmente por la disponibilidad de una mejor tecnología y terapias más efectivas aunque más costosas (2). A pesar de las técnicas de reperfusión a tiempos cortos después del infarto, la pérdida funcional del miocardio produce una falla cardíaca severa, difícil de superar y que continúa siendo un problema médico serio (3).

La isquemia generada durante el infarto produce numerosas alteraciones metabólicas en la célula cardíaca, tales como la disminución del ATP y del pH, pérdida del control osmótico, daño membranal inducido por la producción de los radicales libres generados durante el proceso isquémico, alteraciones que en su conjunto produce un estrés metabólico. Como respuesta a este estrés se induce la formación de proteínas que pueden tener un papel protector y reparador como Col I y Col III; entre ellas se encuentra la proteína de choque térmico Hsp70 (4), que promueve un rearrreglo de las actividades celulares hacia su normalización durante la recuperación del estrés (5). Existen evidencias recientes de que la proteína Hsp70 está relacionada con la protección del miocardio después de un tratamiento hipertérmico en animales experimentales (6), y posiblemente participe como un mecanismo cardioprotector durante el infarto del miocardio (7).

El daño subsecuente al infarto induce un cambio temporal o permanente en la arquitectura del tejido que involucra el rompimiento de barreras histológicas como es la lámina basal, ya que en el sitio de infarto aparece el tejido fibroso que inicia con la cicatrización de la lesión, activando los genes que regulan la formación de las proteínas de la matriz extracelular tales como la colágena tipo I, tipo III y fibronectina (8). Se ha descrito que el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1, regula la producción de estas proteínas y que la expresión del RNAm para este factor se incrementa durante la isquemia miocárdica (9), por lo que es factible que participe en la reparación del tejido cardíaco durante el infarto del miocardio.

Los radicales libres se han involucrado en el daño celular generado durante la isquemia-reperfusión del corazón perfundido (10) o en pacientes, que han sufrido infarto agudo del miocardio u otras alteraciones cardiacas. En los últimos años, se ha considerado a las especies reactivas de oxígeno como reguladores de la expresión génica (11), debido a que se ha demostrado un incremento en el nivel de RNAm de Hsp70 en las células del tubo renal después de una lesión causado por isquemia-reperfusión (12). Posiblemente de una manera semejante se induzca la expresión de los genes de los factores necesarios para la reparación funcional y estructural del tejido intersticial después del infarto del miocardio.

La medicina actual debe explicar cómo una estimulación inmediata en la célula después de la lesión, puede cambiar su función hacia su recuperación y con ello comprometer la supervivencia del individuo después del infarto. Uno de los mayores retos por resolverse actualmente, es el de delinear los mecanismos moleculares por las cuales los miocitos y las células de la matriz extracelular (MEC), adaptan su fenotipo en respuesta a mensajeros químicos, como factores de crecimiento, neurotransmisores y hormonas después de la lesión. El tejido cardiaco después del infarto se encuentra severamente dañado y para que la recuperación funcional y estructural se lleve a cabo exitosamente, dependerá de que ocurra simultáneamente una recuperación de la función cardiaca.

El proceso de remodelación ventricular se ha estudiado en humanos principalmente en los casos de infarto del miocardio y en muchos modelos animales por oclusión de la arteria coronaria, en las que se han encontrado un incremento en volumen y masa en la cavidad del ventrículo (13,14,15). Sin embargo, se conoce muy poco del mecanismo básico que lleva a cabo dicha remodelación. La remodelación del tejido cardiaco representa un modelo experimental conveniente para estudiar los mecanismos de regulación fisiológica y molecular que ocurren en las células del tejido cardiaco y que se han perdido durante el infarto del miocardio, ya que las diferentes etapas que comprenden el proceso de remodelación implica una regulación temporal y espacial de algunos componentes de la MEC, así como la función de estos. Es por eso, que en este trabajo se evaluó la expresión de varios genes a través de la actividad transcripcional midiendo la cantidad de RNAm que se forma como producto del gen y a la vez la cantidad de

proteínas que se sintetizan mediante la traducción del RNAm a proteína durante la remodelación de la matriz extracelular del tejido cardiaco.

Por otro lado, la remodelación es el proceso que modifica la forma, tamaño y función del ventrículo izquierdo de manera patológica como consecuencia de un infarto del miocardio. Dicho proceso se encuentra regulado por medio de factores mecánicos, neurohumorales y genéticos. La necrosis miocárdica provoca una importante sobrecarga que desencadena una cascada de señales intracelulares iniciando cambios dentro del ventrículo izquierdo, tales como dilatación, hipertrofia y la formación de una cicatriz de colágena. Estos cambios se mantienen hasta que las fuerzas de tensión son equilibradas por la fuerza tensora de las fibras de colágena en la cicatriz (16).

#### **IV. ANTECEDENTES GENERALES**

##### **a) Patología del infarto**

La palabra infarto, se refiere a la destrucción de una zona del tejido cardiaco debido a que el flujo de sangre es insuficiente para mantener la viabilidad de las células que se encuentran en dicho tejido. En el humano, la principal causa de ataque al corazón es la oclusión de una o más arterias coronarias debido a la formación de placas; estas placas se forman por la aparición de una forma oxidada de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que atrae células del músculo liso y macrófagos. Al parecer, estas células ingieren LDL y se depositan como células espumosas en la pared de la arteria. El depósito adicional de LDL, combinado con el crecimiento de las células del músculo liso en la pared arterial, conduce a la oclusión de la arteria fig. 1.

Además de reducir el flujo sanguíneo, las placas ateroscleróticas actúan como sitios para la formación de coágulos que pueden impedir por completo el flujo de sangre a través de la arteria, dando lugar a un infarto (17).

El infarto comunmente provoca una necrosis, y posteriormente evoluciona a una cicatriz acompañada de fibrosis. Cuando una zona del tejido queda desprovista de circulación, las células mueren relativamente rápido, y posterior a la necrosis sigue la autólisis y la hemólisis. El tejido periférico de la zona infartada, presenta una reacción

inflamatoria aguda con la consecuente infiltración de macrófagos, posteriormente se forma el tejido de granulación y esto transforma a la zona de infarto en un tejido fibrótico.

### Infarto apical por oclusión arterial

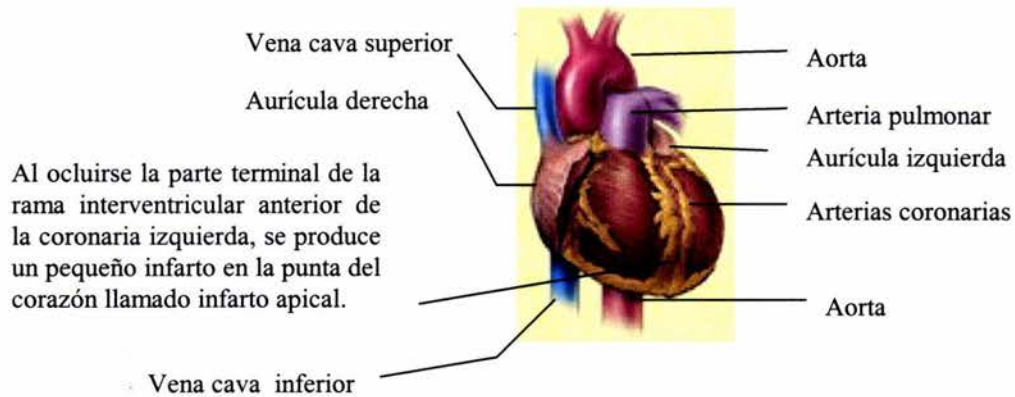


Figura 1. Diagrama de la pared anterior del corazón que muestra la ubicación de las venas, arterias, aurículas, ventrículos y el sitio donde se desarrolla el infarto apical. Netter (1998).

Durante el infarto se desencadena una serie de eventos que afecta la producción y consumo de ATP. Muchas de las funciones celulares como la bomba de sodio-potasio, la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico y el sistema de filamento miofibrilar dependen del consumo de ATP (18). Aún cuando los miocitos en condiciones de anoxia son capaces de degradar anaerómicamente el glucógeno, la producción de piruvato y lactato mediante esta vía altera el pH local provocando una acidosis, característica del tejido cardíaco anóxico.

Está comprobado que el nivel de calcio intracelular se eleva durante la isquemia, aunque no se sabe cual es el mecanismo que conduce a dicha elevación. Se cree que los factores que mantienen la homeostasis del calcio se interrumpen por la falta de ATP debido a que la maquinaria celular requiere de ATP para activarse, la falta de ATP puede



provocar la liberación del calcio del retículo sarcoplásmico, de la mitocondria y del sarcolema o posiblemente alterar el intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  (18). El nivel de sodio intracelular también se eleva durante la isquemia, y esta elevación puede darse mediante dos mecanismos: que se acumule durante el intercambio del protón  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  o por la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , por falta de ATP.

Se ha propuesto a la fosfolipasa membranal, como la responsable del daño durante la isquemia; posiblemente esta enzima se active por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , no solo en la membrana plasmática sino que también en el sarcolema, retículo sarcoplásmico, y en los lisosomas. La degradación de los fosfolípidos de la membrana después de la lesión, puede cambiar su permeabilidad e interrumpir la homeostasis de los iones, lo cual probablemente ocurre cuando el daño en la célula ya es irreversible (18).

Como consecuencia a las alteraciones iónicas, el metabolismo oxidativo de la mitocondria disminuye lo que promueve la acumulación de las coenzimas reducidas ( $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ ). Estos compuestos no solo inhiben la beta oxidación de los ácidos grasos, que son el principal sustrato oxidativo para el corazón, sino que también incrementan la concentración de intermediarios de la beta oxidación dentro de la célula, y entre ellos se encuentran las cadenas largas de acil CoA, que inhiben la adenina nucleotido translocasa, la acil CoA sintetasa y la lipasa. Las cadenas largas de acilcarnitina, inhiben la ATPasa de Na-K y la ATPasa del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, y a concentraciones altas de estos compuestos se inhibe la respiración mitocondrial. Las cadenas largas de acil CoA y de acilcarnitina, son detergentes activos que pueden dañar estructuralmente al miocito y especialmente a la mitocondria. El 95% de acilCoA y acil carnitina en las células se encuentra en la matriz mitocondrial del miocardio con isquemia (18).

Un fenómeno muy estudiado, consecuente al infarto que representa la oxigenación del tejido isquémico se le conoce como reperfusión. Durante este proceso se generan radicales libres derivados del oxígeno, como el oxígeno singulete, los peróxidos y radicales hidroxilos que contribuyen a empeorar el daño provocado en el tejido infartado (19).

## 1) Remodelación y fibrosis cardiaca

La remodelación del tejido cardiaco se caracteriza por la dilatación progresiva del ventrículo izquierdo generado después del infarto o por presión sanguínea elevada, se cree que el daño proviene por el incremento de tensión generado en la pared del ventrículo (20). La deficiencia cardiaca crónica en el hombre puede tener origen genético o puede ser adquirido, se define como una falla mecánica debido a que el corazón disminuye la capacidad de reperfusión sistémica tan indispensable en el tejido para mantener el metabolismo, se activa un mecanismo adaptativo dando lugar a una hipertrofia compensatoria.

La remodelación es un proceso dinámico, consiste en un rearrreglo estructural del tejido, se inicia primero con un adelgazamiento y alargamiento de la pared, dando lugar a una dilatación en donde el volumen del ventrículo se incrementa dando lugar a una hipertrofia cardiaca. El proceso de remodelación tiene un efecto regional y global ya sea en el grosor de la pared, en el tamaño de la cámara así como en la forma y función del corazón, en ello participa predominantemente la capa interna del miocardio, la capa media y las otras capas contribuyen moderadamente y mínimamente, de modo que la necrosis afecta principalmente a la capa interna provocando un adelgazamiento de la pared (21).

Durante la remodelación se reduce el funcionamiento del corazón proceso que repercute en el incremento en número de las unidades que generan la fuerza en los miocitos como las sarcómeras, algunas proteínas estructurales de los miocitos disminuyen su nivel en la MEC ( las proteínas contráctiles y muchos esqueletos de las sarcómeras), el contenido de proteínas de unión (conexina-43) se reduce significativamente, los miocitos crecen desproporcionadamente, el núcleo del miocito se alarga, el contenido de DNA disminuye así como el factor de empalme Sc-35 lo que podría explicar la disminución de la transcripción y la traducción observada durante la deficiencia cardiaca.

El contenido de tejido conectivo incluyendo la FN, laminina y los diferentes tipos de colágenas aumentan mientras que el número de microvasos disminuyen. La pérdida del tejido se debe a la muerte celular autofágica vía ubiquitina o muerte celular por isquemia aguda y en menor grado por apoptosis. Todas estas formas de muerte celular contribuyen



significativamente a la pérdida de la función contráctil, incrementándose así la rigidez ventricular y la arritmia (22).

A largo plazo la activación de un mecanismo compensatorio neurohumoral provoca efectos nocivos dando como resultado una deficiencia cardíaca crónica, las sarcómeras se desorganizan y se altera el flujo de calcio, muchas proteínas se degradan, el tejido pierde la capacidad de sintetizar proteínas, la pared se torna desorganizada y sobreviene la inflamación, se altera la comunicación de los miocitos, se da la disfunción y finalmente la fibrosis.

La acumulación de proteínas en la MEC da lugar a una fibrosis. La fibrosis cardíaca es un elemento constante durante el proceso de remodelación y está asociado con la cardiomiopatía isquémica, se extiende sobre la zona de necrosis aunque no siempre se encuentra asociada a la hipertrofia cardíaca. Existe evidencias de que la fibrosis cardíaca no solo se genera por una sobrecarga mecánica sino que se dispara por estímulos multifactoriales, esto se ha visto mediante estudios clínicos y por la etiología particular de la deficiencia cardíaca.

Teóricamente el incremento de colágena y la fibrosis severa en estados patológicos está ligado a un marcado incremento en el grosor del miocardio dando lugar a una reducción en la función diastólica como la sistólica debido a la reducción de la expulsión del ventrículo debido al ensanchamiento de la cavidad ventricular (20).

Se ha estudiado la fibrosis cardíaca en modelos experimentales de sobrecarga de presión, particularmente en modelos asociados con la estimulación del sistema renina-angiotensina. La fibrosis ventricular se puede inducir experimentalmente por infusión crónica de angiotensina II, endotelina o aldosterona. La fibrosis inducida por la angiotensina II provoca un efecto constrictor así como efectos tróficos directos. La fibrosis inducida por aldosterona es prometedor, al menos en parte, es una consecuencia de la estimulación de la angiotensina II a través de un mecanismo trans-regulatorio, que incrementa los receptores de angiotensina II. Finalmente es importante mencionar que la causa más común de la fibrosis ventricular es la senescencia (23).

## **b) Principales componentes de la MEC del miocardio**

La matriz extracelular (MEC) es una red organizada de materiales extracelulares que se halla más lejos de la vecindad inmediata de la membrana plasmática y sirve de soporte a las células endoteliales y epiteliales; no solo es un soporte físico, sino que también es un modulador de los procesos biológicos incluyendo la adhesión, migración, diferenciación y reparación. La MEC modula la regeneración y mantiene la arquitectura normal del tejido, también interviene en el proceso de diferenciación celular en diferentes vías: como un polipéptido que interactúa con los receptores de membrana en la superficie de la célula y también elimina o libera citocinas. Los componentes más comunes de la MEC del tejido cardíaco son: los fibroblastos, las proteínas estructurales tales como la colágena tipo I y III y elastinas; proteínas adhesivas como la laminina, fibronectina y colágenas tipo IV y VI, proteínas antiadhesivas como la tenasina, trombospondina y osteopontina; proteoglicanos y enzimas como las metaloproteinasas, que regula la organización y composición de la MEC. La colágena es un elemento importante que determina el grosor del tejido cardíaco, cuando esta se acumula se incrementa anormalmente el grosor del tejido alterando la función cardíaca. El depósito de colágena en el sitio de infarto es un prerequisite para reemplazar las células dañadas, sin embargo la acumulación excesiva de colágena provoca una disfunción diastólica y sistólica que finalmente contribuye a la falla cardíaca (23).

### **1. Fibroblastos**

Los fibroblastos son las células responsables del depósito y la remodelación de la MEC. Después del daño, la reparación del tejido se lleva a cabo mediante una serie de procesos bien caracterizados. Después de la formación del coágulo, las células inflamatorias como las células mononucleares y granulocitos, invaden el tejido dañado; posteriormente los fibroblastos migran, proliferan y sintetizan los componentes de la MEC participando en la formación del tejido de granulación. Finalmente sobreviene el proceso

de reepitelización y el cierre de la lesión. La remodelación implica la degradación de la MEC, decremento de la población celular y la formación de tejido fibroso (24).

Una vez que los fibroblastos invaden en el sitio de la lesión, adoptan un fenotipo llamado de síntesis, donde estas células contienen paquetes de fibrillas de actina; a este fenotipo se les llama miofibroblastos y son las células que se alinean en el sitio de la lesión y comienzan a sintetizar colágena y fibronectina. La transformación de los miofibroblastos se lleva a cabo a través de un antígeno llamado proteína alfa activadora de fibroblastos  $\alpha$ (FAP- $\alpha$ ); probablemente este antígeno es inducido por algún factor de crecimiento o durante la transformación maligna. El factor estimulador de la migración (MSF), es el responsable para la capacidad migratoria de los fibroblastos. La secreción de MSF durante la reparación de la lesión, puede representar una señal de migración de los fibroblastos, y dicha proteína puede incrementar la migración a través de la secreción del ácido hialurónico (AH), por los propios fibroblastos. Existe la idea de que el fibroblasto individual puede reorientar las fibrillas de colágena asociándolas nuevamente (24).

Los miofibroblastos aún presentan abundante retículo endoplásmico rugoso pero además expresan paquetes de microfilamentos con cuerpos densos semejantes a los de las células del músculo liso. Los miofibroblastos se encuentran interconectados a través de una abertura y están conectados a la MEC mediante unas estructuras llamadas fibronexus, que son complejos de microfilamentos transmembranales intracelulares en aparente continuidad con fibras de fibronectina extracelular.

Durante la reparación de la lesión, los fibroblastos participan en la formación de tejido de granulación, y se encuentran escasamente en la fase de granulación temprana pero aumentan en la etapa de reparación de la lesión, donde se organizan en el tejido de la superficie, mientras que se depositan pequeños vasos perpendicularmente a las capas de células formadas por los fibroblastos. Los miofibroblastos y los vasos pequeños desaparecen con el restablecimiento del tejido. Es posible que el fenotipo fibroblástico se revierta cuando se repara la lesión o desaparecen estas células selectivamente por apoptosis (24).

## 2. Colágena

A pesar de que los miocitos representan tres cuartas partes del volumen miocárdico, los fibroblastos son el tipo celular más abundante (75 % del total de células); siendo estos últimos los principales productores de colágena. Este conjunto celular se encuentra dentro de una estructura macromolecular de fibras con una organización tridimensional compleja, llamada matriz extracelular, que determina la integridad estructural y funcional del miocardio. El principal constituyente de la MEC es la colágena; el tipo fibrilar I forma parte del 85 % de las fibras gruesas que confieren fuerza tensil a la elongación y deformación; seguido por la tipo III (aproximadamente 11 %) relacionada con fibras delgadas que confieren resistencia, mientras que la colágena tipo IV es un componente de la membrana basal del miocito.

En condiciones normales, las fibrillas de colágena mantienen la relación espacial entre los miofilamentos y microcirculación capilar, así como la alineación entre miocitos adyacentes por medio de soportes intercelulares que permiten optimizar y distribuir las fuerzas en la pared del ventrículo previniendo la deformación de las sarcómeras ya que su fuerza de tensión y su elasticidad resiste la deformación, conserva su forma y el grosor, por lo que mantiene la rigidez del miocardio (25).

El incremento de fibras de colágena intercelular y pericelular, puede limitar la movilidad del miocito y como consecuencia disminuir la actividad del ventrículo o provocar una arritmia interrumpiendo así la difusión de señales a través del miocardio, también se le atribuye el papel de modulador durante la cicatrización, crecimiento y diferenciación celular. Varios estudios han demostrado que en la zona contigua al infarto como el ventrículo derecho, también se sintetiza y acumula colágena, y el nivel de colágena aumenta en la zona del infarto lo que corresponde a una respuesta de reparación del tejido, pero en el área no infartada, no se sabe el por qué se acumula la colágena. Se propone que esto se debe a un factor local que secretan las células vecinas y estos posibles factores pueden ser la angiotensina II, aldosterona o catecolaminas capaces de afectar el metabolismo de la colágena (26,27). Algunos laboratorios proponen al sistema renina-angiotensina-aldosterona como el regulador de la acumulación de colágena. Por otro lado, los cambios hemodinámicos después

del infarto pueden inducir la activación neurohumoral y afectar la remodelación en ambos ventrículos (28); sin embargo, estos efectos pueden ser indirectos, ya que es posible que estén involucrados otros factores como TGF- $\beta$ . Este es una citocina que juega un papel clave durante la embriogénesis y la cicatrización de las heridas, y se le conoce como un potente estimulador de la síntesis de colágena y de su RNAm (29).

Se sabe que el TGF- $\beta$  se encarga de regular la síntesis de la colágena durante la cicatrización de la herida, de modo que durante la etapa de transición entre el tejido de granulación y la maduración de la cicatriz, depende de la síntesis y del catabolismo de este factor (30). La acumulación de colágena por un lado es el balance entre su síntesis simultánea y su maduración en el espacio, y por otro lado su degradación se controla por las colagenasas procedentes de los granulocitos, macrófagos, células epidermales y fibroblastos. La colagenasa intersticial degrada la colágena tipo I, II, III, X, y XIII; la gelatinasa degrada la colágena desnaturalizada y la colágena tipo V y XI. Finalmente, la estromelina degrada la colágena tipo III IV, VII, y IX, así como proteoglicanos y glicoproteínas (31).

Se conoce muy poco acerca de la expresión del gen de la colágena después del infarto. Los estudios realizados sobre la remodelación del tejido cardiaco se limitan a determinar los cambios temporales de colágena en el área del infarto; sin embargo, los estudios realizados por Ritzenthaler et al (32), indican que el TGF- $\beta$ , activa la transcripción de la colágena a través del elemento activador transformante (TAE) (TGCCACGGCCAAG) localizado a 1.6 Kb del sitio de inicio de la transcripción en la región del promotor del gen de la colágena, pero las proteínas nucleares involucrados en este paso aún no se conocen.

Después de que el gen transcribe una molécula de colágena, se ensambla en un RNAm funcional que contiene  $\approx$  3 000 bases. El RNAm de cada cadena de colágena se transloca al citoplasma y pasa al retículo endoplásmico a través de los polisomas unidos a la membrana. Las células que sintetizan la colágena, lo hacen primero con un precursor conocido como procolágena, más tarde esta molécula es recortada en las terminales que no están organizadas en hélice, dando lugar a una molécula de colágena que espontáneamente forma fibras en el espacio extracelular.

La nueva molécula de colágena es un trímero, consta de 3 cadenas de polipéptidos denominadas cadenas alfa. La molécula de colágena tipo I, consta de 2 cadenas  $\alpha 1(I)$  y una cadena  $\alpha 2(II)$ .

En el humano, las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la colágena tipo I, están codificados en el cromosoma 17. La colágena tipo III está codificada en el cromosoma 2, el producto final es una pro-cadena  $\alpha$  con el amino terminal hidrofóbico. La cadena de colágena termina de sintetizarse en el retículo endoplásmico rugoso (RER), donde se requiere de un evento co-transduccional, el extremo amino terminal contiene una cadena señal que facilita la transferencia de la cadena hacia el lumen del retículo endoplásmico rugoso y probablemente es eliminado por una endonucleasa, después de haber orientado la cadena hacia el interior del RER. Los residuos de lisina de la procadena  $\alpha$  son hidroxilados en el RER, en donde se añaden los residuos de azúcar; este proceso de glucosilación lo catalizan dos enzimas específicas, la galactosiltransferasa y la glucosiltransferasa. La primera de estas enzimas añade galactosa al residuo hidroxililil y el segundo añade glucosa a la galactosilhidroxililina. En las células intactas, la glucosilación se inicia mientras los polipéptidos están todavía unidos al ribosoma y probablemente continúa después de que la procadena se libera por completo en la cisterna del RER; la síntesis termina cuando la cadena adquiere una conformación de triple hélice. Los oligosacáridos unidos al extremo C-terminal contienen N-acetilglucosamina y manosa, y a la vez están unidos por residuos de asparagina que al parecer se añaden en la vía intermedia dolicol-fosfato y la remodelación final ocurre después de que se forma la hélice. Una vez que la molécula ha pasado por los procesos de traducción, modificación y adición (proceso que dura 6-7 min.), la procadena individual está preparada para formar una triple hélice y se requiere de otros 8-9 min. después de la formación de la procadena  $\alpha$ .

### **3. Fibronectina**

Además de la colágena, la MEC del miocardio contiene una gran cantidad de fibronectina (FN), una glicoproteína que interviene en la adhesión de la célula a la matriz y además sirve como andamio en la cual los otros componentes de la MEC



pueden adherirse, de modo que esta proteína se encarga de organizar la MEC y el anclaje de las células en dicho tejido (33).

La molécula de FN es un dímero, está compuesta de 2 cadenas peptídicas similares pero no idénticas, que se encuentran unidas por un par de enlaces disulfuro, localizado cerca del extremo carboxilo terminal. Cada cadena presenta varios dominios en forma de un rodillo y cada rodillo está separado por regiones flexibles semejante a nódulos, y a su vez los dominios están subdivididos por módulos más pequeños; cada uno de los cuales se repite en serie, por lo que la molécula de la FN tiene repeticiones tipo I, II y III. Así la repetición tipo I se repite 12 veces, la tipo II 2 veces y la tipo III, de 15-17 veces.

Cada uno de los dominios de la FN contiene uno o más sitios de enlace para los diferentes componentes de la MEC, sitios de unión a la heparina y la fibrina o sitios de unión a la célula a través de receptores de membrana.

Un aspecto interesante del gen de la FN es su regulación postranscripcional a través del empalme alternativo, proceso por el cual muchos RNAs se producen selectivamente a partir de un pre-RNA. El RNA de la FN, cuenta con tres regiones de empalme alternativo; dos de ellas están en el exón EIIIA (conocido también como EDA y EDI) y en el exón EIIIB (también llamado EDB y EDDII). Debido a estas características del RNA, los transcritos primarios pueden procesarse en 2 o más vías, de manera que la secuencia que actúa como intrón en una vía, se convierte en exón en una vía alterna. Como resultado de este proceso, el mismo gen puede codificar varios polipéptidos diferentes para ser utilizados en diferentes funciones. Estos 2 exones son excluidos en el tejido adulto, y solo participan durante los eventos de re-arreglo del tejido. La expresión de las isoformas EIIIA y EIIIB, está regulada en cada célula, y pueden incluir uno u otro de estos exones en su RNA de manera independiente (34).

Existen 2 tipos de FN; la celular (FNc) y la del plasma (FNp). Se ha visto que la FNc, se expresa rápidamente después del infarto en modelos animales y humanos. Después de la inducción del infarto, la FNc se deposita alrededor del área del infarto, en los vasos sanguíneos de mayor tamaño, en el epi y endocardio, en el miocito del



ventrículo izquierdo y en el septo, lo cual indica que varias isoformas de la FN incluyendo la isoforma embrionaria se acumula en el corazón después del infarto (35). En el tejido cardíaco adulto, se incrementa el RNAm durante la hipertrofia experimental, Dalen y col. (36) encontraron que el depósito de FN en la MEC es un paso crucial durante la remodelación del tejido cardíaco.

### c). Reguladores de la síntesis de la MEC

#### 1). Proteína de choque térmico Hsp70

Las proteínas de choque térmico conocidas también como chaperonas moleculares se producen en las células como respuesta al estrés, durante el estrés por calor aumenta la expresión de dichas proteínas aumentando así la habilidad de las células para sobrevivir a altas temperaturas, las chaperonas moleculares también proporcionan protección en los casos de estrés fisiológico como la isquemia y reperfusión (37).

La chaperona mejor conocida como la Hsp70 y sus homólogos se localizan en el citosol, mitocondrias, cloroplastos y retículo endoplásmico rugoso de los organismos procariotas y eucariotas. La chaperona mejor estudiada es el GroEL, un homólogo de Hsp70, que se encuentra en el citoplasma de la bacteria *Escherichia coli* (38).

La chaperona que se induce con mayor frecuencia en condiciones de estrés térmico es la Hsp70, que aparece después de un incremento de la temperatura o en casos de daño mecánico de células en cultivo, en niños con fiebre, durante un ataque cardíaco y en los tratamientos de quimioterapia de pacientes con cáncer. Esta proteína se ha visto en el corazón o en el cerebro después de la isquemia y reperfusión, por lo que clínicamente se miden los niveles de esta proteína como marcador de daño en tejidos y órganos (39).

Las células que producen altos niveles de proteínas de estrés presentan mayor capacidad de sobrevivencia después del daño, las ratas transgénicas que sobreexpresan Hsp70 resisten la isquemia y reperfusión, por lo que posiblemente se pueda emplear esta proteína como fármaco para proteger a los tejidos y órganos dañados como un tratamiento terapéutico. Este podría reducir el daño provocado durante la cirugía o

mantener en buen estado los órganos para trasplante que frecuentemente sufren isquemia y reperfusión.

La proteína Hsp70 también interviene en la translocación de las proteínas a través de la membrana intracelular. La translocación postranslacional de algunas proteínas secretoras a través de la membrana del RE y la mitocondria son regulados por la Hsp70, proceso que requiere de ATP y posiblemente uno o más factores celulares, aún se desconoce cómo participa dicha proteína en la translocación, es posible que solo se encargue de mantener la proteína blanco en translocación previo a esta transferencia a través de la membrana.

El papel fundamental de los Hsps es el de chaperonas moleculares, por lo que es posible que intervenga en el plegamiento de los polipéptidos desnaturalizados por el infarto. Los chaperones moleculares no solo ayudan al autoensamblado, sino que también participan en el desplazamiento de las proteínas a través de las membranas para colocarlas en su posición apropiada dentro de los organelos específicos, como mitocondrias y cloroplastos. Dado que los mismos chaperones pueden facilitar el plegamiento de una gran variedad de polipéptidos, se presume que los intermediarios parcialmente plegados deben compartir características comunes que les permita enlazarse a los mismos chaperones. Cuando colaboran en el plegamiento de otras proteínas presentan afinidad por las zonas hidrofóbicas asequibles que muestran las proteínas plegadas de forma incompleta e hidrolizan ATP, posiblemente uniéndose y liberándose de su proteína en cada ciclo de hidrólisis del ATP. Las chaperonas se unen a las regiones hidrofóbicas expuestas, y dan un masaje a las regiones de las proteínas que están medio plegadas a partir del intermediario globular fundido, cambiando su estructura de tal manera que proporciona a la proteína otra posibilidad de plegarse. Una vez que la proteína asume su conformación final, estos sitios de enlace al parecer se ocultan en el interior de la proteína y ésta pierde su capacidad de interactuar de nuevo con un chaperón.

Se han descrito diferentes tipos de chaperones moleculares, y se ha demostrado que actúan en secuencia como estabilizadores de la cadena naciente, actúan en secuencia muy parecidas a un equipo de relevos. Un tipo de chaperón se une a un

polipéptido conforme se sintetiza sobre el ribosoma; luego el polipéptido pasa a otro tipo de chaperón que lo protege a la siguiente etapa de plegamiento (17).

La Hsp70 desempeña un papel protector durante el infarto del miocardio, sin embargo se desconoce el mecanismo exacto de protección por estas proteínas en el tejido cardiaco, posiblemente participe promoviendo las actividades celulares hacia la recuperación del daño; las evidencias sugieren contundentemente que uno o más miembros de estas proteínas juegan un papel importante en la protección del miocardio reduciendo significativamente el tamaño del infarto, y manteniendo al miocito en un estado fisiológico funcional. Los cambios en los niveles de Hsp70, ocurren en la fase terminal de la falla cardiaca y durante esta etapa el tejido cardiaco mantiene los niveles normales de ATP y se conserva la creatina fosfato. El nucleótido de adenina se incrementa en 3 hrs. después de la administración de calor y se mantiene elevada por más de 40 hrs., bajan los niveles de radicales libres derivados del oxígeno y aumenta la actividad de la catalasa y superóxido dismutasa, lo cual permite que las células resistan la apoptosis (38).

La contracción y relajación del tejido cardiaco depende del buen funcionamiento del retículo sarcoplásmico (RS), debido a que este organelo se encarga de regular adecuadamente la concentración de calcio en el citoplasma, lo que permite mantener estable el proceso de relajación y contracción. Sin embargo, cuando aparece la isquemia, el número de canales de calcio disminuye, lo que indica una disfunción en la ATPasa del calcio y los canales que lo liberan, al inducirse la proteína de choque térmico se restablece significativamente la presión del ventrículo y la contractilidad y mejora la función del RS.

## **2). Factor de crecimiento transformante beta**

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), pertenece a una familia de citocinas relacionadas con el crecimiento y diferenciación celular, se han descrito cerca de 40 miembros de esta familia en invertebrados y vertebrados. La familia de citocinas

generalmente se subdivide en tres categorías: las TGF- $\beta$ , las activinas y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP). Las 3 isoformas mejor conocidas de TGF- $\beta$  son los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, y todas ellas son similares pero no idénticas. Las 3 isoformas están codificadas por diferentes genes y cada uno tiene diferentes funciones: TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 son mediadores de la respuesta regenerativa e inductores de la síntesis de varias proteínas de la matriz extracelular mientras que TGF- $\beta$ 2 interviene en la formación del mesodermo a ectodermo de *Xenopus*.

A los factores de crecimiento transformante beta inicialmente se les descubrió como factores que indujeron un fenotipo transformante en las células NRK y AKR-2B, del cual deriva el nombre. Más tarde se observó que esta misma proteína inhibe el crecimiento de las células BSC-1 lo que sugirió que TGF- $\beta$  provoca diferentes efectos en la célula, dependiendo del tipo celular; por un lado, puede inhibir la diferenciación de algunas células del mesodermo (mioblastos), mientras que por otro lado puede inducir la diferenciación de otras células mesodermales (precondroblastos) (40).

Los fibroblastos del tejido cardiaco intervienen en la remodelación reemplazando la cicatriz en la zona infartada y la producción de fibrosis en la zona no infartada, en el sitio dañado se libera el TGF- $\beta$  de las plaquetas, de los linfocitos T y B, de los macrófagos activados, miocitos dañados y fibroblastos que se infiltran en la zona dañada para incrementar el depósito de la MEC con el fin de reparar el daño. Una vez que el TGF- $\beta$ 1 es liberado en la MEC, activa a los macrófagos y monocitos, desempeñan un papel importante en la regulación celular. Las funciones más importantes de estos péptidos se pueden agrupar en 3 niveles: intervienen en el ciclo celular; actúan en la matriz extracelular y modulan otros factores de crecimiento y sus receptores. Por ejemplo, el TGF- $\beta$  incrementan los niveles del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) secretado por los fibroblastos y las células del músculo liso, e incrementan la expresión de los receptores- $\alpha$  de PDGF en las células del escleroderma. En las células hematopoyéticas disminuyen los niveles de receptores de la interleucina-1. Indiscutiblemente, su papel más importante es el de mediador en el ciclo celular durante la mitosis, mientras que su intervención en la MEC y con otros factores de crecimiento son secundarios.

Después del infarto los fibroblastos del tejido cardiaco intervienen en la remodelación reemplazando la cicatriz y promoviendo la fibrosis en la zona dañada, entre otras funciones el TGF- $\beta$ 1 se encarga de incrementar la expresión de los receptores de las integrinas en las superficies celulares para reforzar la interacción célula-célula y célula matriz. Durante la reparación del tejido se liberan proteínas en la MEC como las colágenas, FN y proteoglicanos, se estimula la síntesis de los inhibidores de proteasas y se inhibe así la síntesis de las proteasas.

Existen pocos receptores de TGF- $\beta$  en los ventrículos de la rata en condiciones normales, sin embargo 4 semanas después del infarto se incrementa la cantidad de receptores tanto en la zona con infarto como la no infartada y anatómicamente coincide con el sitio de fibrosis (41). Los receptores de TGF- $\beta$  pueden tener alta o baja afinidad dependiendo de las condiciones del tejido, los sitios de unión con alta afinidad se encuentran en el miocardio de los pacientes con cardiomiopatía idiopática hipertrófica obstructiva, los cuales presentan mayor afinidad que los receptores de los pacientes con angina de pecho y con cirugía de transplante.

Los receptores de TGF- $\beta$ 1 se localizan tanto en los miocitos como en las otras células, se localizó por inmunohistoquímica en las membranas y en el citoplasma de los miocitos así como en las membranas de los fibroblastos de humano. El RNAm de los receptores están presentes en pocas cantidades en el corazón del ratón adulto.

Los estudios realizados en modelos experimentales indican que TGF- $\beta$ 1 se expresa en el corazón de la rata, los miocitos y los fibroblastos son los encargados de liberar dicha citocina. Después del infarto el TGF- $\beta$ 1 y el RNAm de Colágena tipo I se incrementa dependiendo de la extensión del infarto y durante la fase de cicatrización aumenta la actividad del gen de TGF- $\beta$ 1 y la expresión de la proteína smad (42). El aumento del nivel de RNAm de TGF- $\beta$ 1 en la zona del infarto experimental se induce al mismo tiempo la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo en la zona dañada, al parecer los fibroblastos y los miofibroblastos son los responsables de la producción de dicho factor.

El TGF- $\beta$ 1 se une con los proteoglicanos en la MEC o en la superficie de la célula y esta unión sirve como señal de término a la liberación de TGF- $\beta$ 1 una vez que el



tejido se encuentra reparado y en caso de que se repita el daño el TGF- $\beta$ 1 se autoinduce en grandes cantidades y continúa la producción de la MEC dando lugar a un tejido fibroso. La sobreproducción contraresta la señal de terminación que posiblemente crea así un círculo vicioso crónico de sobreproducción de TGF- $\beta$ 1.

El hecho de que se libera más TGF- $\beta$ 1 que los subtipos TGF- $\beta$ 2 y 3 durante la hipertrofia en el ventrículo en modelos experimentales sugiere que TGF- $\beta$ 1 es importante en la patogénesis de la enfermedad cardíaca asociado con la hipertrofia. El TGF- $\beta$ 1 puede actuar de manera autócrina para estimular a los miocitos a la hipertrofia y al aumentar el nivel de TGF- $\beta$ 1 en el miocito puede actuar de manera parácrina para estimular los fibroblastos y desencadenar así la sobreproducción de proteínas de la MEC, ya que los fibroblastos contienen receptores de TGF- $\beta$ 1 . (43).

La MEC no solo es un soporte para la estructura del tejido, sino que también es un sustrato molecular dinámico que puede modificar el fenotipo celular (44,45), de manera que puede afectar la proliferación, diferenciación, morfología, adhesión, migración y la interacción entre las células. En este contexto, el TGF- $\beta$  actúa como modulador en la síntesis de varios componentes de la MEC, de las interacciones célula-sustrato, la proliferación y diferenciación celular. El TGF- $\beta$ 1 por ejemplo, actúa directamente en la fase G1, inhibiendo la síntesis del DNA y la continuación de la fase S, interrumpiendo así el ciclo celular de las células epiteliales. Una excesiva actividad de TGF- $\beta$ 1 en el tejido mamario puede provocar un desarrollo raquítrico de las glándulas y provocar un defecto en la lactancia, mientras que un defecto en la señal de transducción da lugar a un crecimiento canceroso en el páncreas, colon, seno, mucosa oral y otros sitios. Se desconoce aún cómo actúa a nivel fisiológico y el mecanismo citostático que sigue el TGF- $\beta$ 1, intervienen muchos genes en este proceso pero no se sabe como intervienen y su relación de unos con otros.

El TGF- $\beta$  promueve la formación de la MEC durante la remodelación y la formación de la cicatriz, estimula la respuesta de las células epiteliales y fibroblastos los cuales disparan la síntesis de muchas proteínas como la colágena, proteoglicanos, fibronectina e integrinas, incrementa la síntesis de enzimas que catalizan la degradación de la MEC como la colagenasa y estromelisin (27).

Las 3 isoformas de TGF- $\beta$ , también están presentes en la MEC del tejido cardiaco (46), y se inducen por la epinefrina y por sobrecarga de presión. Actuando en una gran variedad de células blanco. El incremento de TGF- $\beta$ 1 está asociado con la actividad biológica del miocito (47). Recientemente se ha demostrado que interviene durante el desarrollo del miocardio y en situaciones patológicas como la isquemia-reperfusión e hipertensión.

Después de la insuficiencia cardíaca por isquemia, se desarrolla una fibrosis incrementándose la acumulación de colágena, y se altera la estructura de la MEC así como la presión diastólica (48). Los agentes mediadores de la fibrosis post-infarto, han atraído el interés de muchos investigadores y se ha involucrado a la colágena y la fibronectina en la remodelación del tejido cardiaco en la que TGF- $\beta$  modula la síntesis de estas proteínas. Los TGF- $\beta$ s son citocinas que se generan localmente y desempeñan un papel muy importante en la proliferación de muchos tipos celulares y refuerzan la síntesis de la colágena durante la reparación del tejido reduciendo la degradación de la colágena (49).

El TGF- $\beta$  se sintetiza a partir de una molécula precursora, que se mantiene en el tejido en forma inactiva; contiene una secuencia señal en el amino terminal de 29 aa, seguido por un dominio  $\beta$ 1-LAP con 249 aa y una región carboxilo terminal de 112 aa. Este homodímero a su vez está unido covalentemente mediante uniones disulfuro a una proteína llamada LTBP (proteína latente unido a TGF- $\beta$ ) en la región  $\beta$ 1-LAP. Esta es una glucoproteína de 120-160 kD asociado con el dímero maduro en su estado inactivo y además dicha proteína puede ser importante para el ensamblaje, secreción y activación de TGF- $\beta$ 1 (40). Los TGF- $\beta$ s están regulados a nivel postranscripcional y traduccional, previo a la secreción, el precursor latente o LTBP se digiere con proteasas, de este modo el TGF- $\beta$  se secreta como molécula activa.

El TGF- $\beta$ 3 es el miembro de una familia de proteínas compuesta de dos cadenas de aminoácidos que se unen mediante puente disulfuro, es un homodímero involucrado en la regulación del crecimiento, proliferación y diferenciación celular, estimula la matriz extracelular y modula la respuesta inmune. El TGF- $\beta$ 3 es una



proteína que pesa 25 kD, cada subunidad contiene 112 residuos de aminoácidos, el 80 % de los aminoácidos del extremo carboxilo es parecido al de TGF- $\beta$ 1 y 2.

El TGF- $\beta$ 3 al igual que las isoformas beta 1 y 2 transmite su señal a través de las células mediante los residuos de serina/treonina que se unen fuertemente con el receptor TR $\beta$ -II, su intervención puede ser requerida durante el desarrollo normal del pulmón y el paladar y aparentemente es degradado en los lisosomas.

El TGF- $\beta$ 3 es secretada por las células del sistema inmune, aunque también puede provenir de otro tipo de células, pero la gran mayoría lo producen las células T y en especial los subtipos llamados T-Helper-2 (T-H-2) y T-Helper-3 (T-H-3); en general, las células T-H-1 intervienen en la respuesta inflamatoria mientras que T-H-2 interviene en la respuesta anti-inflamatoria. La T-H-2 estimula la producción de anticuerpos a través de las células B pero no provoca daño en el tejido como las células T-H-1.

El TGF- $\beta$ 3 es la isoforma menos estudiada, se le ha localizado en el cordón umbilical de humano y se secreta en algunas células como en líneas celulares de miofibroblastos.

El TGF- $\beta$ 3 al igual que beta 1 y 2 estimula la quimiotaxis de los macrófagos en el humano y puede inhibir el crecimiento de los linfocitos B en el humano. Su expresión está regulada en respuesta a señales durante el desarrollo o a estímulos hormonales, en el estudio de algunos modelos experimentales se ha visto que se refuerza su expresión después de una herida.

El RNAm y la proteína de TGF- $\beta$ 3 se expresa abundantemente en los queratinocitos de la dermis intacta de humano, pero también se le ha localizado en las células del ganglio de la retina y en las mitocondrias del segmento interior de las células fotorreceptoras. El TGF- $\beta$ 3 puede actuar como regulador negativo de la inflamación, como un agente anticicatrizante al aplicarse exógenamente a una baja concentración, pero sin embargo, puede aumentar la angiogénesis mediante la estimulación de la fibronectina y proteoglicano induciendo así el fenotipo para la proliferación de las células endoteliales; también puede disminuir los niveles de

monocitos y el perfil de macrófagos. Cuando se neutralizan a las TGF- $\beta$ 1 y 2 por medio de anticuerpos específicos, aumenta el nivel de TGF- $\beta$ 3 (50).

### **Unión de TGF- $\beta$ con otras proteínas**

Varias proteínas se unen a TGF- $\beta$  (49), y se dividen en 2 grupos: las que son solubles o asociadas con la MEC, y las que se expresan en la superficie celular. Algunas proteínas como  $\alpha$ 2-macroglobulina, la trombospondina y el decorín proteoglicano puede servir para despejar a TGF- $\beta$  de la circulación, la proteína de unión a TGF- $\beta$  solo interviene cuando el TGF- $\beta$  está inactivo.

Como parte de la actividad biológica de estos factores, interactúan con los receptores tipo I (55 kDa), II(80kDa) y III (280 kD) con una constante de disociación del orden de 5-25 pM para el receptor tipo I y 200 pM para el receptor tipo II. Las 3 isoformas de TGF- $\beta$  pueden interactuar con el mismo receptor, sin embargo, existe cierto grado de especificidad que puede tener una función biológica significativa. La actividad cinasa del receptor tipo II, es esencial para la unión con el ligando, el dominio cinasa del receptor hacia el lado del citoplasma se autofosforila en el residuo de serina y treonina (49).

La superfamilia TGF- $\beta$ , transmite sus señales a través de los receptores tipo I y II (T $\beta$ R I y II), con un dominio cinasa relativamente conservado, ambos se caracterizan por una pequeña región extracelular con un gran número de cisteínas, un segmento transmembranal, un dominio intracelular con actividad de serina treonina cinasa y un extremo carboxilo terminal.

La señal se inicia cuando TGF- $\beta$ , se enlaza al receptor tipo II en el dominio extracelular; el receptor TBR II unido al ligando, se une al receptor tipo I, formando un complejo. El receptor T $\beta$ R I se fosforila en el sitio motif rico en serina-glicina y de este modo se activa la cinasa de dicho receptor.

A continuación la proteína SARA recluta a Smad 2 al receptor TR $\beta$  I, el complejo SARA, Smad 2 y el receptor de TGF- $\beta$  se asocian para formar un complejo transductor de señal, la cinasa activada fosforila específicamente a Smad 2, y esta fosforilación permite la

asociación de Smad 2 a Smad 4 y se transloca al núcleo. Smad 2 se asocia con el factor de transcripción Fast-1 y se activa la transcripción del gen (51).

## **V. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **a) Modelo experimental de infarto**

En la caracterización histológica, fisiológica y bioquímica del modelo experimental de infarto del miocardio inducido con isoproterenol, se encontraron los siguientes resultados ya descritos por nuestro laboratorio (52), y que se comenta brevemente por la relevancia que tiene en la correlación e interpretación de la información obtenida en este estudio. Desde el punto de vista histológico, bioquímico y fisiológico se detectó la presencia de una lesión semejante al infarto del miocardio entre las 12-24 horas de la administración del ISO. Histológicamente se detectó un infarto de tipo circunferencial con presencia de una necrosis coagulativa en la parte apical abarcando 30% de la pared del ventrículo izquierdo. En el periodo previo al infarto, se hacen evidentes la elongación y ondulación de las fibras, necrosis y bandas de contracción y fragmentación de las miofibrillas. Durante el infarto se aprecia una afluencia importante de células polimorfonucleares y macrófagos como signos de una respuesta inflamatoria intensa. La aparición de fibroblastos y fibras de colágena, se hacen evidentes desde las 48 h en que se puede considerar que se inicia el proceso de cicatrización como se aprecia en la tabla 1.

Estos cambios histológicos, corren paralelos a las alteraciones fisiológicas como son cambios importantes a los pocos minutos de la administración del ISO en la frecuencia cardiaca con un 80 % de aumento que permanece por 10-12 h y una brusca disminución del 60% en la presión arterial produciendo una hipoperfusión del corazón que se sostiene por un periodo de 8 a 10 horas, que produce una disminución importante del flujo sanguíneo y una hipoxia funcional prolongada que aunado a la sobrecarga de trabajo lo que posiblemente origina el infarto. Se observó una disminución paralela de la presión del ventrículo izquierdo y de la conducción aurículo-ventricular. Electrocardiográficamente, se observó al tiempo del infarto la inversión característica del segmento QT del

electrocardiograma. Después del infarto, estos parámetros funcionales tienden a normalizarse.

Tabla 1. Evaluación histológica de la lesión cardiaca inducido por el isoproterenol

Tipo de daño	Tiempo de tratamiento (h)							
	1	3	6	12	24	48	72	96
Elongación y ondulación de fibras	+++	+++	++	+	-	-	+	+
Necrosis y contracción de bandas	-	+	+++	++	+	-	-	-
Necrosis coagulativa	-	-	-	+	++	-	-	-
Fragmentación de miofibrillas	-	-	-	-	+	++	-	-
Celulas polimorfonucleares	-	-	+	++	+++	+	-	-
Macrófagos	-	-	-	-	+	+++	++	+
Fibroblastos y fibras de colágena	-	-	-	-	-	+	++	+++
Edema	-	-	+	++	+++	++	+	-

Nota: Animales que recibieron isoproterenol vía s.c. y se sacrificaron a diferentes tiempos después de la administración de la droga; el daño total después de la administración del isoproterenol se tomó como el 100%; +, 25%; ++, 50%; +++, 75%; -, no observado.

Bioquímicamente se demostró la presencia del infarto por las enzimas marcadoras creatina quinasa,  $\alpha$ -hidroxibutirato deshidrogenasa y transaminasa glutámico aspártico, y alteraciones importantes en la función mitocondrial, observándose al tiempo del infarto una disminución de la síntesis de ATP, potencial de membrana mitocondrial y disminución de los parámetros energéticos evaluados como carga energética y niveles de creatina y fosfocreatina. En la etapa de post-infarto estudiada hasta las 96 h de la administración de ISO, no se recuperan los parámetros mitocondriales y la carga energética; no así en una elevación importante en los niveles de creatina y fosfo-creatina durante el post-infarto.

Estudios previos del laboratorio (no publicado), han demostrado la participación de los radicales libres durante las tres etapas de cardiotoxicidad inducidas con ISO, pre-infarto infarto y post-infarto, destacando el papel del endotelio generando óxido nítrico y peroxinitritos, la degradación de nucleótidos de adenina y xantina oxidasa como fuente de ion superoxido, ambos en la etapa previa al infarto. Durante el infarto, la respuesta inflamatoria induce la formación de oxido nítrico y peroxinitritos, y durante la etapa de

post-infarto al recuperar el flujo sanguíneo y el nivel normal de oxigenación (etapas de reperfusión fisiológica) la disfunción mitocondrial, es una fuente de radicales libres. Ante este panorama surgió el interés de conocer algunos eventos moleculares del proceso de cicatrización y remodelación del tejido cardíaco como son los estudiados en este trabajo.

## **VI. HIPÓTESIS**

Durante el infarto al miocardio inducido por isoproterenol se han definido tres etapas pre-infarto, infarto y post-infarto de acuerdo a criterios bioquímicos, fisiológicos y estructurales. Después del infarto sobreviene la remodelación cardiaca, se espera a través de este modelo conocer la secuencia temporal de la expresión genética a través de la medición del RNAm y las proteínas de la matriz extracelular así como los factores reguladores y protectores del proceso.

## **VII. OBJETIVO GENERAL**

En este trabajo se trató de estudiar la expresión génica de algunos factores involucrados en la síntesis de los componentes de la MEC, como un primer intento de conocer los factores desencadenantes de la remodelación estructural del tejido cardiaco dañado durante el infarto experimental .

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Se midieron los niveles de expresión del RNAm de colágena tipo I y III, fibronectina y los factores reguladores como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 y Hsp70, durante la fase temprana de la remodelación cardiaca.
- b) Se determinaron los cambios en la expresión de algunas proteínas de la MEC como la colágena tipo I y III, la fibronectina, los TGF- $\beta$ 1 y 3 y la proteína de choque térmico Hsp70, después del tratamiento con isoproterenol.

## VIII. MÉTODO

### a) Animales y preparación de las muestras

Se utilizaron 78 ratas macho, cepa Wistar de 250-260 g, alimentadas *at libitum*. El isoproterenol se administró en forma subcutánea a una dosis de 67 mg/kg de peso corporal de acuerdo con el procedimiento descrito por Chagoya y col. (52). Se utilizaron 6 animales por cada tiempo experimental y 6 ratas testigos, se sacrificaron en diferentes tiempos después de la administración del ISO cubriendo la parte de preinfarto (0.25, 0.5, 0.75, 1,2,3 y 6 hrs.), infarto (12-24 hrs.) y postinfarto (48, 72 y 96 hrs.), se extrajo el corazón rápidamente, se colocó en solución salina estéril y posteriormente se obtuvo una sección transversal de la parte semiapical del corazón. La sección apical de los corazones aislados, se congelaron inmediatamente después del sacrificio en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la extracción posterior del RNA total, como se describe en el diagrama de la figura 2.

### b) Preparación del RNA e hibridización del DNAc

El RNA total del área del infarto, se extrajo por el método descrito por Chomczynski y Sacchi (53). Se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de RNA total para el northern blot. El RNA se desnaturalizó en una solución que contiene 50% de formamida, 2.2 M de formaldehído y se separó en un gel de agarosa al 1%. El RNA total se transfirió a una membrana de Nylon (Schleicher y Schuel).

La sonda se marcó radioactivamente con ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP) marca Amersham, utilizando para ello un Kit de marcaje de DNA de la marca Lifes Technologies.

La hibridización del RNAm con el DNA complementario (DNAc) para la fibronectina y las colágenas tipo I y III, se llevó a cabo en solución de prehibridización que contiene 50% de formamida, 5% de SSPE ( 3 M NaCl, 0.2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 20 mM de dietiltetracético), 2% de reactivo de Denhardt'-s (50X de solución de Denhat's contiene 5 g de ficoll, 5 g de albúmina de bovino y  $\text{H}_2\text{O}$ ), 0.1% de SDS (Sal Duodecil sulfato) y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de esperma de salmón  $42^{\circ}\text{C}$  por más de 24 h.



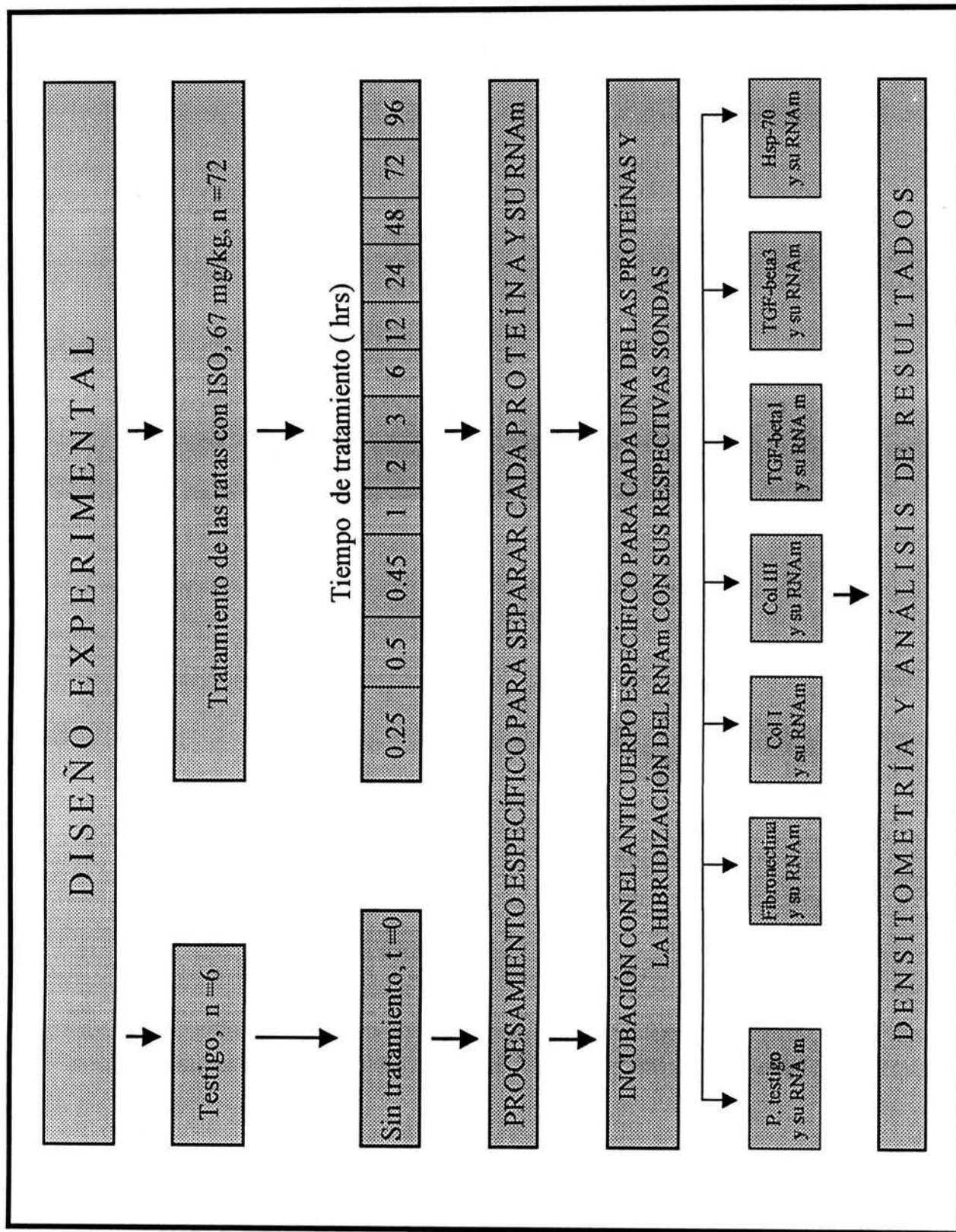


Fig. 2. Diagrama que representa el tratamiento de las muestras experimentales hasta la obtención de los resultados

Las membranas se lavaron en una solución que contiene 2% SSC ( 1X de SSC = 0.15 M de cloruro de sodio, 0.015 M de citrato de sodio y 0.1% de Sal Duodecil Sulfato (SDS)) a temperatura ambiente, el siguiente lavado se llevó acabo con 0.5X de SSC, 0.1% de SDS a 65° C para la Fibronectina y 0.2X SSC, 0.1% de SDS a 55° C para la sonda de colágena tipo I y tipo III.

La hibridación y el lavado de las membranas para TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, y Hsp70, se realizó de acuerdo con el método de Churt y Gilbert (54).

Las membranas fueron expuestas en Film de BIOMAX MR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) a -70°C. La cantidad de RNA presente en la membrana, se midió con el densitómetro y se obtuvo la densidad en unidades arbitrarias.

El DNAc de la fibronectina es de rata, contiene 875 pb de la región codificante 3', este DNAc se dirige al amino terminal de la fibronectina y reconoce todas las formas de la Fibronectina. La sonda de TGF- $\beta$ 1 contiene 985 pb y la de TGF- $\beta$ 3 que es de ratón contiene 1200 pb, la sonda de colágena- $\alpha$ 1(I) con 800 pb de la región no codificante y codificante, la sonda de colágena tipo- $\alpha$ 1 (III) de 500 pb de la región codificante.

### c) Western blot

Para obtener la proteína Hsp70, se homogenizó el tejido que corresponde al área del infarto ( zona apical del corazón) con un homogenizador ultraturax en un buffer que contiene: 0.1M de fosfato, 5% de SDS, 1% de mercapto etanol, 0.1% de Fenilmetilsulfonil fluoruro (FMSF) y 2  $\mu$ g de aprotinina, durante un minuto. Una vez homogenado, se centrifugó a 14 000 x g durante 3 min. Se tomó el sobrenadante y se almacenó a -70°C. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry (55).

La colágena se extrajo homogenizando el tejido en 1 ml de buffer ( 200 mmol/ sacarosa, 20 mmol/ HEPES a pH 7.4) que contiene inhibidores de proteasas ( 2  $\mu$ g/ml de aprotinina y 100  $\mu$ g/ml de PMSF).

Se utilizaron 50  $\mu$ g de proteínas totales y se desnaturalizaron en buffer de corrida que contiene 0.625  $\mu$ M de Tris/Cl a pH 6.8 1% de SDS, 10 % de clicerol, 0.01% de azul de bromofenol, 1% de mercaptoetanol y se incubaron 15 min. a 65° C.

Después de la desnaturalización de las proteínas, éstas se separaron por electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% de acuerdo con el método de Laemli (56). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, utilizando para ello un buffer que contiene 58% de tris, 0.29% de glicina, 0.037% de SDS y 20% de metanol. La membrana se incubó en PBS que contiene el 0.2% de tween 20 y 5% de leche descremada por 2 horas a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión no específicos de la proteína. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS 1X durante 10 min. agitando levemente; posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4 grados centígrados en presencia del primer anticuerpo (Rbt X anti-colágena tipo I, anti-colágena tipo III de rata y anti-Hsp70), en una dilución de 1:10 000. Después de esta incubación se lavaron 3 veces como se indicó anteriormente y enseguida se volvió a incubar con el segundo anticuerpo (AP-cabra Anti-Conejo IgG), en una dilución de 2:10 000 durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación leve. Se volvieron a lavar 3 veces, el complejo antígenos-anticuerpo se visualizó después de haber revelado las membranas con Nitro Blue Tetrazolium (NBT) y 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP).

#### **d). Slot blot de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 y Fibronectina**

Para obtener las proteínas de TGF- $\beta$ 1 y 3, la parte apical del corazón se homogenizó en un homogenizador ultra-turrax, en un buffer que contiene 0.05 M de tris, 0.15 M NaCl, 0.002 M de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0.002 M fenilmethylsulfonilfluoruro, 2  $\mu$ g/ml de aprotinina a pH 7.4, después de sonicar el homogenado se añadió tritón X-100 a una concentración final de 0.5%. El tejido se colocó en hielo durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 12 000 x g por 20 min. a 4 grados centígrados.

La fibronectina se obtuvo homogenizando el tejido con buffer que contiene 1% de SDS, 8% de sacarosa, 2 mM de EDTA, 3mM de etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetileter)-

tetraacetato y 50 mM de fosfato (pH 8). La concentración de la proteína se determinó por el método de Lowry (55).

Se gotearon 50  $\mu$ g de proteína directamente en la membrana de nitrocelulosa montada en la cámara de slot blot. Las membranas se bloquearon con 5% de leche diluida en PBS 1X, con 0.1% de Tween 20, se incubó con un Anti-TGF- $\beta$ I y 3 y Anti-fibronectina monoclonal diluido 1:1000 durante 12 horas a 4 grados centígrados. Después de haber lavado 3 veces la membrana con PBS 1X, se incubó con el segundo anticuerpo (Anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina), durante 2-3 hrs. a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados como se mencionó anteriormente, finalmente las membranas se revelaron con 44  $\mu$ l de NBT y 33  $\mu$ l BCIP diluido en 10 ml de una solución que contiene 0.1M de tris-Cl pH 9.5, 0.1M de NaCl, 50 mM de MgCl. Las bandas se cuantificaron por densitometría.

## **IX. RESULTADOS**

En este estudio se evaluaron los cambios transitorios de la FN, las colágenas tipo I y III, los TGF- $\beta$ 1 y 3, y la proteína de choque térmico con sus respectivos transcritos durante la remodelación de la MEC del tejido cardiaco después del infarto experimental, como un primer intento para conocer la dinámica de expresión en este proceso y para ello se tomaron rebanadas de la parte apical del corazón infartado, como se muestra en la fotografía de la siguiente página en donde se representa una comparación entre el corazón normal e infartado.

Cada experimento se repitió, al menos 3 veces, con diferentes ratas para confirmar que cada resultado fuera reproducible. Se utilizó la misma cantidad de proteína en cada tiempo, los resultados se normalizaron de acuerdo al testigo y se expresaron como porcentaje del testigo. La densidad de las proteínas y el RNAm, se midieron por densitometría para determinar su nivel de expresión en el ventrículo izquierdo durante el desarrollo del infarto.



CORAZON NORMAL



CORAZON NORMAL



CORAZON INFARTADO



CORAZON INFARTADO



## **FIBRONECTINA.**

Los resultados obtenidos al evaluar el RNAm de fibronectina desde los 15 minutos de la administración de ISO hasta las 96 h, cubriendo las tres etapas de cardiotoxicidad de la droga, se presentan en la Fig. 3. Se observa una gran constancia en la actividad transcripcional del gen de la FN, notándose una pequeña disminución en los niveles de RNAm a los 15 minutos y 1 h ( $p < 0.01$ ), el máximo nivel se encontró a 2 h después del tratamiento ( $p < 0.01$ ), representando un 20% por encima del nivel de los testigos.

La FN (fig. 3), no se acumula en una etapa específica del infarto, oscila en forma constante, a lo largo del tiempo experimental, el máximo nivel se encontró a las 48 h post-infarto (26 %), y el mínimo nivel estuvo en el momento del infarto, representando un 15 % por debajo del los testigos.

El nivel del transcrito obtenido en este trabajo, no refleja una gran actividad transcripcional del gen durante el infarto. La matriz extracelular tampoco sintetiza fibronectina en forma acelerada, los niveles se mantienen mas o menos constantes durante las 96 h.

## **COLÁGENA TIPO I**

A través del análisis por (figura 4) Western blot, en el área infartada del tejido cardíaco se observaron pequeños aumentos transitorios de colágena tipo I, entre los 15 minutos hasta las 6 h postratamiento, alcanzando un incremento de 61% por encima del testigo a las 3 h ( $p < 0.01$ ). Durante el infarto disminuye un 39% bajo el nivel del testigo ( $p < 0.01$ ), y a partir de entonces se incrementó paulatinamente llegando a un nivel de 50% sobre el nivel del testigo. Éstos resultados indican que la lesión inducida durante el infarto, provocó una disminución drástica en la maquinaria de síntesis de la colágena. Incrementos subsecuentes hasta las 96 h correlacionan con los cambios de la actividad de transcripción.

El daño provocado por el beta adrenérgico en el tejido cardíaco se refleja en el contenido de RNAm de colágena tipo I en el área del infarto, la actividad transcripcional del gen aumentó a los 15 minutos, observándose un aumento de 1.3 a 2.1 veces, a las 3 h postratamiento, durante el infarto disminuye hasta alcanzar casi el nivel del testigo. En la



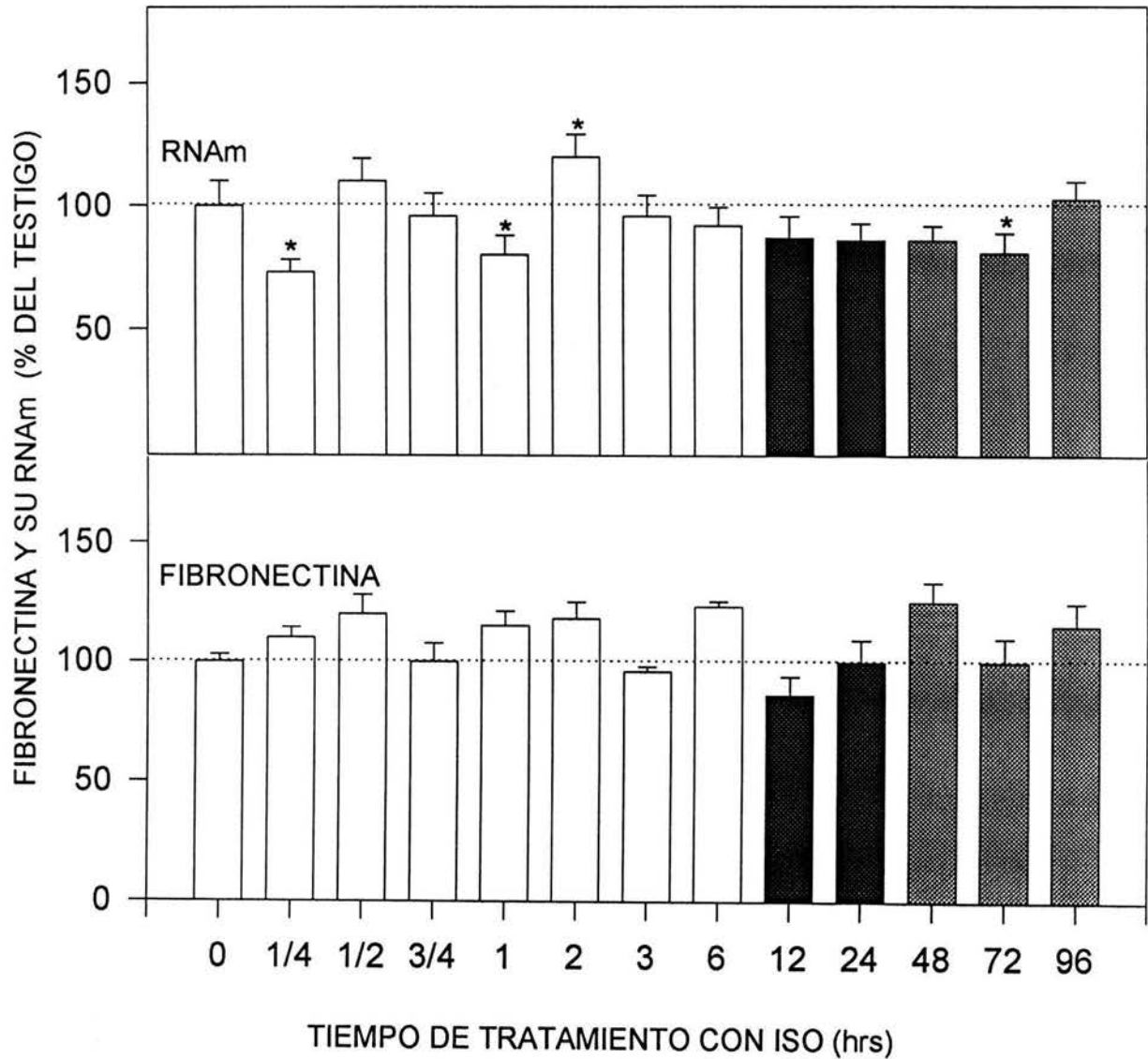


Fig. 3. Expresión de RNAm y el contenido de la proteína específica de fibronectina en la zona del infarto expresado en unidades arbitrarias, cada una de las barras representa el promedio de las muestras utilizadas.

El valor 100% del RNAm que corresponde al testigo es de  $263 \times 10^3$  y de la proteína es de  $2.3 \times 10^3$ ,  $n=3$ .

\* Testigos vs Tratadas con ISO  $p < 0.01$ . ( $\square$  preinfarto;  $\blacksquare$  infarto;  $\boxtimes$  postinfarto)

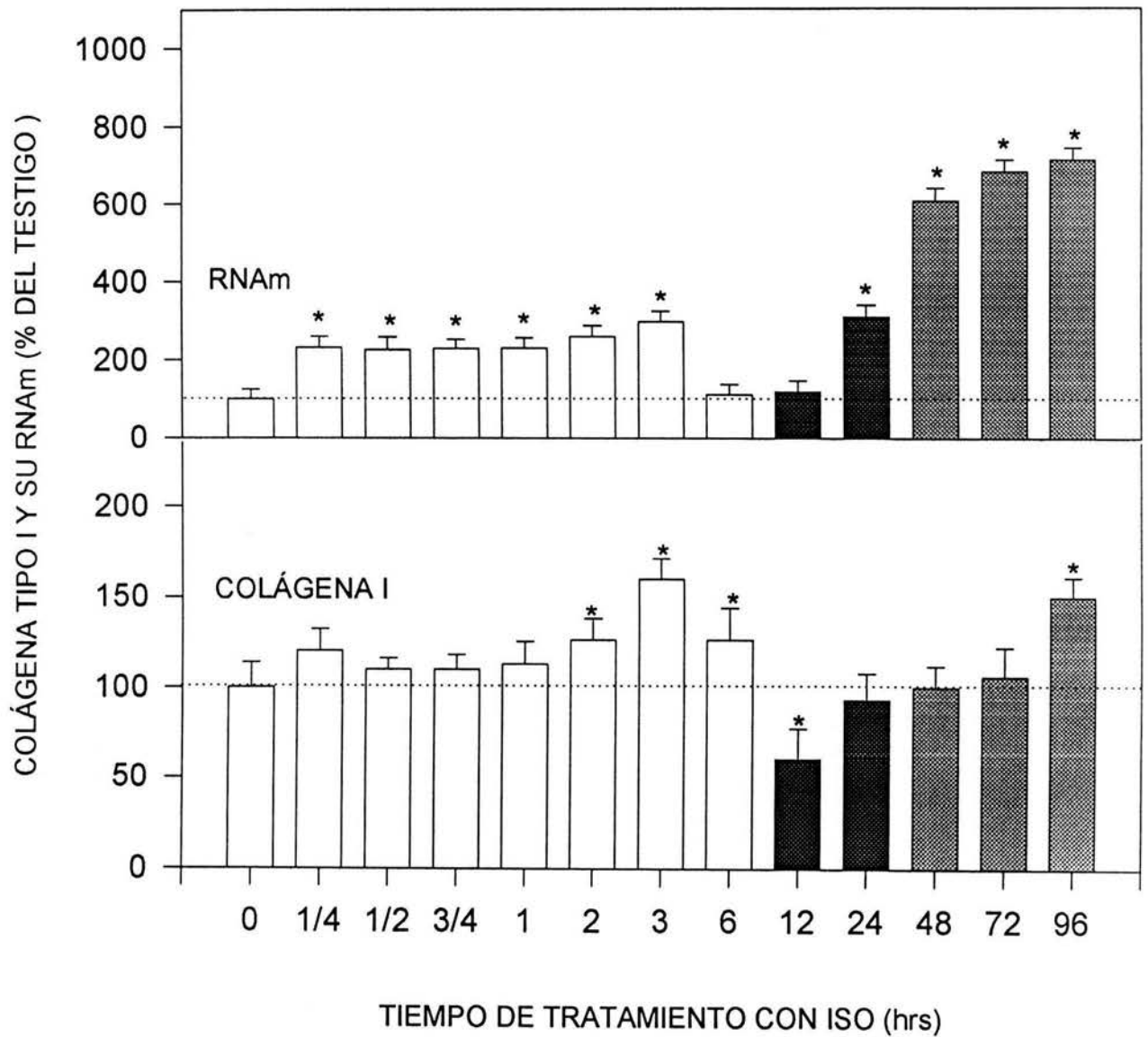


Fig. 4. Acumulación de colágena tipo I en la zona de infarto de los animales experimentales. La cantidad de RNAm liberada en el tejido cardiaco está expresada en unidades arbitrarias obtenidas con la lectura del densitómetro y el valor real de cero que corresponde al control es  $13.5 \times 10^3$  y de la proteína es  $2.2 \times 10^3$ ,  $n=3$ .

\* Testigos vs Tratadas con ISO  $p < 0.01$ . (□ preinfarto; ■ infarto; ▨ postinfarto)

etapa postinfarto aumenta paulatinamente alcanzando un máximo de 6.6 veces mayor que el testigo al finalizar el período de tratamiento. El aumento en RNAm precede al aumento en la proteína.

### **COLÁGENA TIPO III.**

Después de haber cuantificado el RNAm de colágena tipo III, se puede decir que los animales con tratamiento no presentan una actividad transcripcional aumentada en la etapa preinfarto y tampoco durante el infarto, excepto a los 45 minutos postratamiento donde la Col III alcanza un incremento significativo. Sin embargo, inmediatamente después del infarto se acelera la maquinaria transcripcional, y hubo un incremento de RNAm hasta los 3 días después del infarto. El ISO desencadenó la acumulación de RNAm de colágena tipo III de 1 a 4 días después del infarto ( $p < 0.01$ ); la figura 5 proporciona una evaluación cuantitativa de la acumulación de RNAm de colágena tipo III. En el área del infarto, la acumulación de RNAm de colágena tipo III se elevó de 4 a 10 veces comparado con las ratas no tratadas de 1-4 días después del infarto.

Al estudiar los niveles de colágena tipo III en la secuencia temporal estudiada figura 5, el comportamiento de esta proteína refleja una disminución de 11% a partir de las 2 h postratamiento, el mayor decremento se localiza a las 12 h ( $p < 0.01$ ), tiempo en que ocurre el infarto, y permanece disminuido hasta 96 horas. Estos parámetros sugieren una disociación entre la actividad de transcripción evaluada por los niveles de RNAm y la proteína tisular encontrada.

#### **a) Relación Col I/Col III**

La relación de Col I/ Col III ( tabla 2) de los animales testigos es de 0.76, sin embargo en los animales experimentales este valor se incrementa a partir de que inicia el tratamiento, llega a ser significativa a partir de las 6 h cuando la colágena tipo III disminuye (fig. 5) mientras que la colágena tipo I aumenta (fig. 4). la relación Col I/ Col III en los animales experimentales llega a ser hasta 5 veces mayor en relación a los

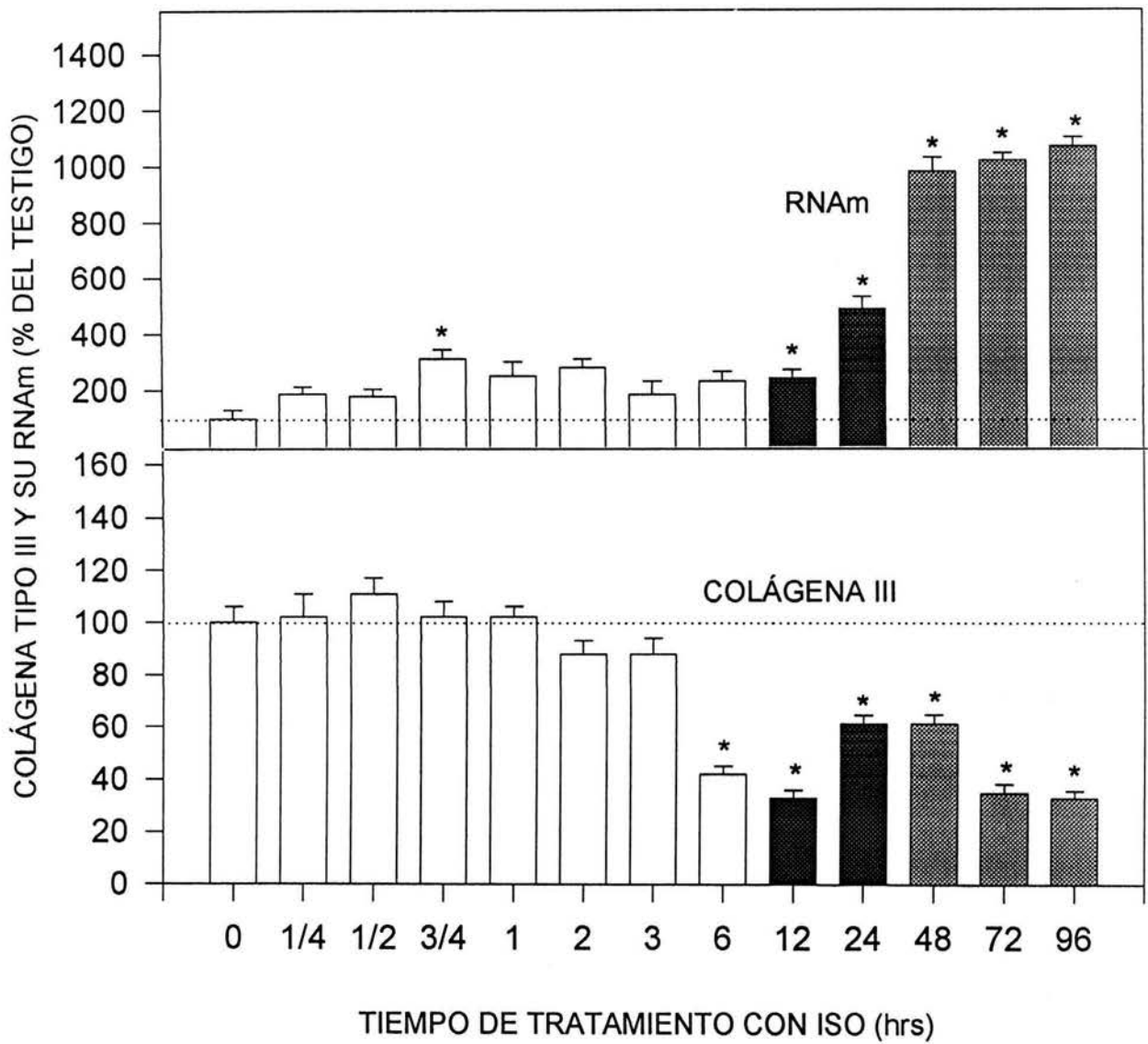


Fig.5. Densitometría de colágena tipo III cardiaca, estimado como porcentaje del testigo. El valor 100% de cero es  $6.6 \times 10^3$  y de la proteína es  $5 \times 10^3$ ,  $n=3$ . \* Testigos vs Tratadas con ISO  $p < 0.01$ . (□ preinfarto; ■ infarto; ▨ postinfarto)

corazones testigos, lo cual indica que la estructura del tejido cardiaco se modifica después del infarto.

Tiempo de tratamiento (hrs.)	Colágena tipo I	Colágena tipo III	Relación
0.00	3.80	5.00	0.76
0.25	4.56	5.10	0.89
0.50	4.18	5.55	0.75
0.75	4.18	5.10	0.82
1.00	3.60	5.10	0.70
2.00	4.78	4.20	1.13
3.00	6.08	4.20	1.44
6.00	4.78	1.75	2.89
12.00	2.28	1.40	1.62
24.00	3.50	2.55	1.37
48.00	3.80	2.54	1.49
72.00	4.00	1.53	2.60
96.00	5.70	1.48	3.85

**Tabla 2.** relación entre la Colágena I y Colágena III expresada en unidades arbitrarias. Al relacionar las concentraciones de la Colágena tipo I y tipo III observamos que se modifica entre 2-3 hrs después del tratamiento con ISO. La relación Col I / Col III se modifica inversamente a las 72 y 96 h sugiriendo que el sustrato colagénico es diferente.

### TGF- $\beta$ 1

Se midió la cantidad de TGF- $\beta$ 1, en el área apical de los corazones con y sin tratamiento con ISO. En general la expresión de TGF- $\beta$ 1, disminuyó un 40% 2 h después de la administración de ISO ( $p < 0.01$ ), y 6 h después del tratamiento recuperó su nivel alcanzando un máximo nivel (40%) por arriba del testigo a las 72 h como se observa en la

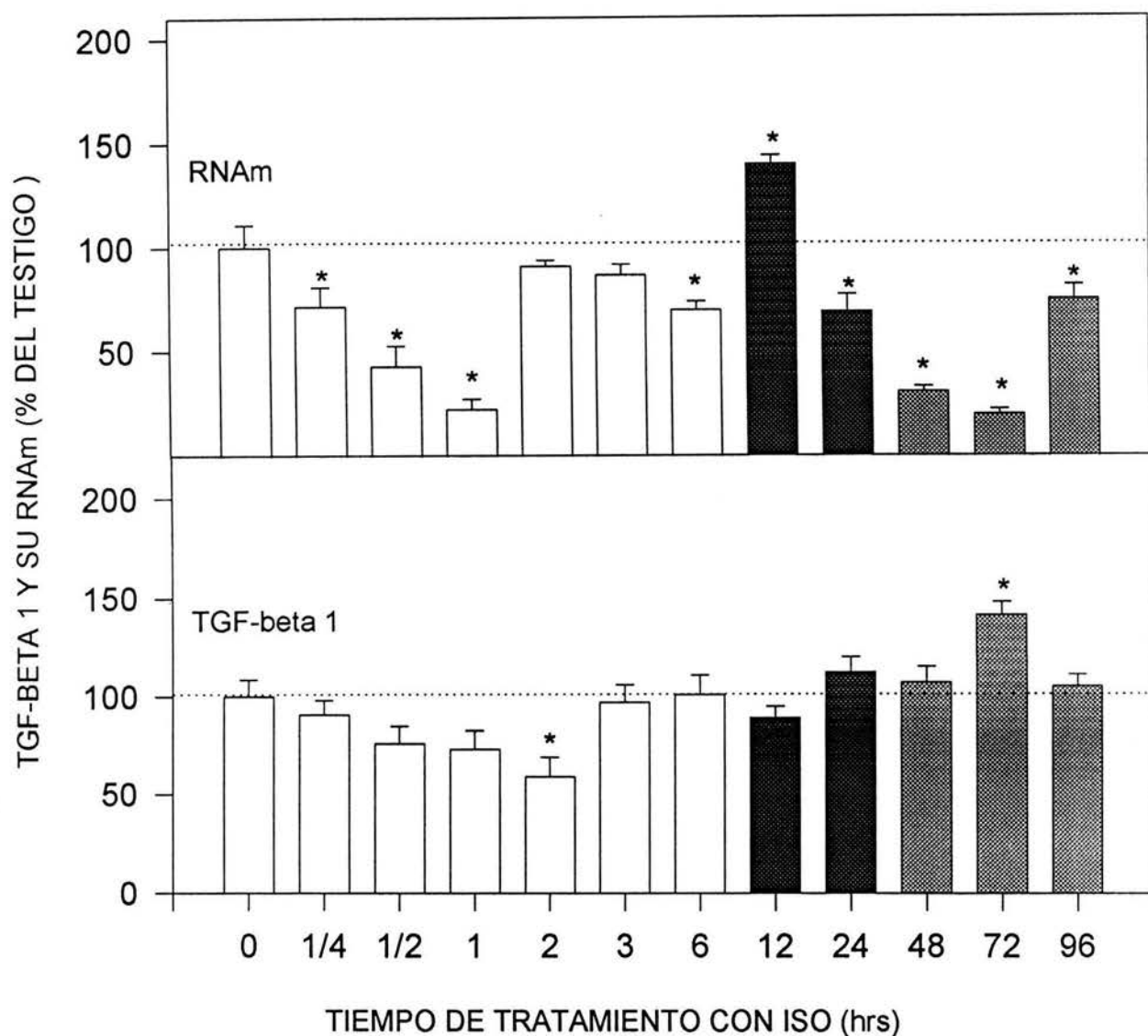


Fig. 6. Expresión de RNAm en la zona del infarto, cuantificado en el densitómetro en unidades arbitrarias utilizando para ello 20 microgramos de RNA total. El valor real 100% corresponde al testigo, equivale a  $2.3 \times 10^3$ ,  $n=3$ .

La proteína específica de TGF-beta también está expresada en unidades arbitrarias, el valor del testigo corresponde a  $166.7 \times 10^3$ ,  $n=3$

\* Testigo vs Tratadas con ISO  $p < 0.01$ . (□ preinfarto, ■ infarto; ▨ postinfarto)



figura 6. Algunos autores han reportado un incremento importante de este factor después de la constricción de la aorta suprarrenal de la rata; sin embargo, solo se han detectado los precursores de dichos factores.

La gráfica superior de la figura 6, ilustra el nivel de RNAm para el TGF- $\beta$ 1 en el grupo testigo y en el experimental, en un lapso de 15 min. hasta 96 h de tratamiento. La primera barra de la izquierda corresponde al testigo sin tratamiento alguno y las siguientes barras de la derecha corresponde el nivel de RNAm obtenido de los animales tratados con ISO. En términos generales el nivel de RNAm decrece por debajo del testigo a partir de que se inicia el tratamiento, a excepción del tratamiento de 12 h en la que hubo un incremento de 40% por arriba del testigo y la expresión más baja se encuentra en 1 y 72 h ( $p < 0.01$ ), representando un 80% por debajo del testigo, posiblemente después de 96 h tanto el mensajero como la proteína retorna al nivel del testigo. El aumento del mensajero precede el aumento de la proteína en el tejido.

### TGF- $\beta$ 3

Para poder medir el nivel de TGF- $\beta$ 3, se cargaron 50  $\mu$ g de proteína en cada pozo de la cámara de slot blot y después de haber revelado la membrana, se observa una disminución 1-3 h después del tratamiento, pero a partir de entonces aumenta gradualmente hasta las 96 h como se observa en la fig. 7. (3-96 h). El incremento fue de un 56% sobre el testigo en el área apical del corazón de las ratas experimentales, esta proteína por lo regular en su forma inactiva se encuentra asociada a otra proteína y migra en el gel de acrilamida como una banda de 28 kD.

Para determinar la expresión del transcrito de TGF- $\beta$ 3, durante el desarrollo del infarto se midió el nivel de RNAm de las ratas testigos y tratadas. A partir de los 15 min. hasta la hora, el RNAm disminuye, pero 2 h después se incrementa drásticamente un 12% arriba del testigo y vuelve a disminuir hasta llegar a las 72 h un 80% ( $p < 0.01$ ) por debajo del testigo. Al examinar la relación entre el nivel del transcrito y la proteína se encontró que el aumento del RNAm precede al incremento de la proteína y que la síntesis de TGF- $\beta$ 3 en el tejido cardiaco se relaciona inversamente con el transcrito. El comportamiento de

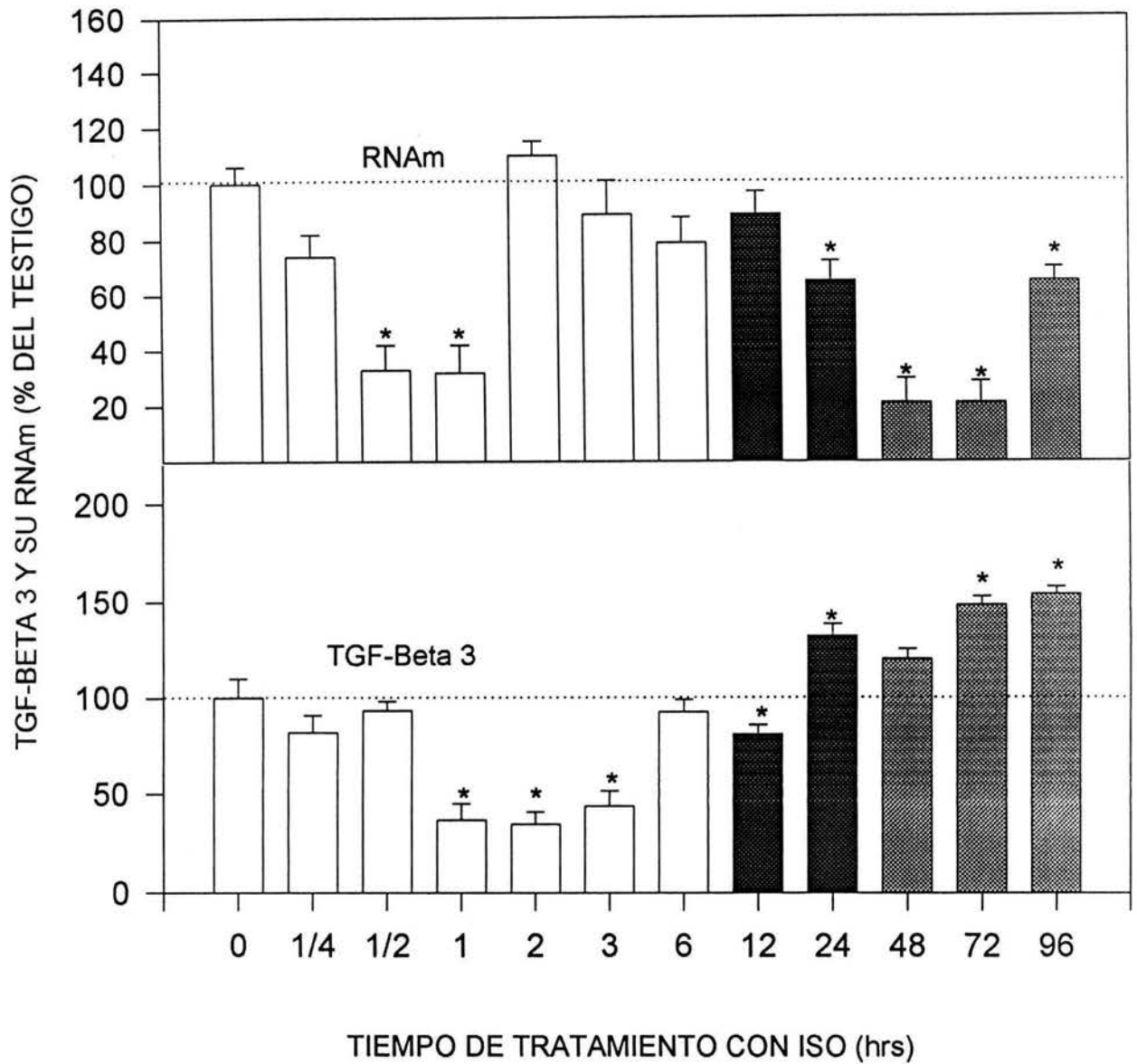


Fig.7. Concentración de TGF-beta 3 en la zona apical del corazón, se cuantificó por densitometría, el contenido de RNAm como el 100% del testigo equivale a  $9.4 \times 10^3$  y de la proteína es de  $2.2 \times 10^3$  expresada en unidades arbitrarias. n=3

\* Testigo vs Tratadas con ISO  $p < 0.01$ . (□ preinfarto; ■ infarto; ▨ postinfarto)

TGF- $\beta$ 3 es semejante al de TGF- $\beta$ 1al parecer las dos proteínas están reguladas por los mismos factores.

### **Hsp70**

Para poder detectar la proteína de choque térmico, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la Hsp70 inducible de humano, que reacciona fuertemente con el Hsp70 de la rata. Se extrajo la proteína del citosol para poder medir la síntesis de la proteína después del infarto, una cantidad considerable de la forma inducible de Hsp70, estuvo presente en la zona apical del corazón y muy pocas cantidades en la zona apical de los corazones no tratados. En la Fig.8 se ilustra la importancia de Hsp70 durante el infarto. El patrón de las bandas observadas indica que durante y después del infarto es requerida por el tejido cardiaco.

El transcrito de Hsp70, se acumula en tres etapas, la primera de 45 min. ( $p < 0.01$ ) a 1 h, de 3 a 6 h ( $p < 0.01$ ) y de 48 a 72 h ( $p < 0.01$ ), en cada etapa se va incrementando cada vez más, de modo que el incremento va de 6 a 20 veces con respecto al valor del testigo.

La proteína tiende a incrementarse con el tiempo, y este incremento se da a partir del momento del infarto, con un nivel máximo de 2 a 2.5 veces en relación al testigo a las 72 h, posteriormente decrece ligeramente a las 96 h.

## **X. DISCUSIÓN**

El infarto experimental inducido por isoproterenol se localiza en la zona apical del corazón y las condiciones experimentales establecidas de dosis y condición de los animales permite el establecimiento de tres etapas bien definidas de preinfarto, infarto y postinfarto. Durante el infarto se origina una necrosis que altera la arquitectura del tejido tanto en la zona infartada como en la no infartada. Durante la lesión, el ventrículo izquierdo se dilata y se adelgaza la pared ventricular por la pérdida de la matriz extracelular; la zona de infarto se expande y se presenta una respuesta inflamatoria que precede al proceso de cicatrización.

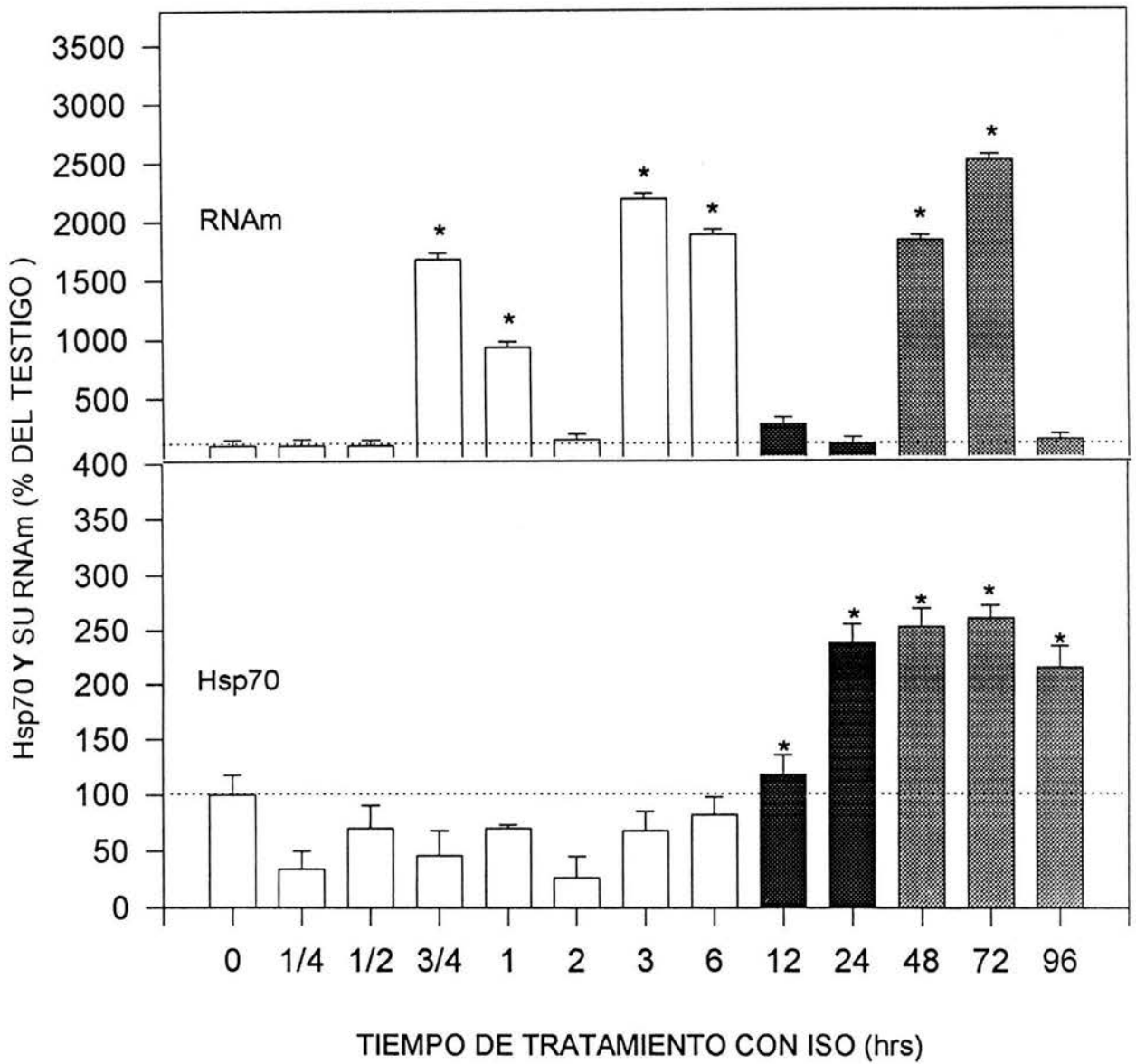
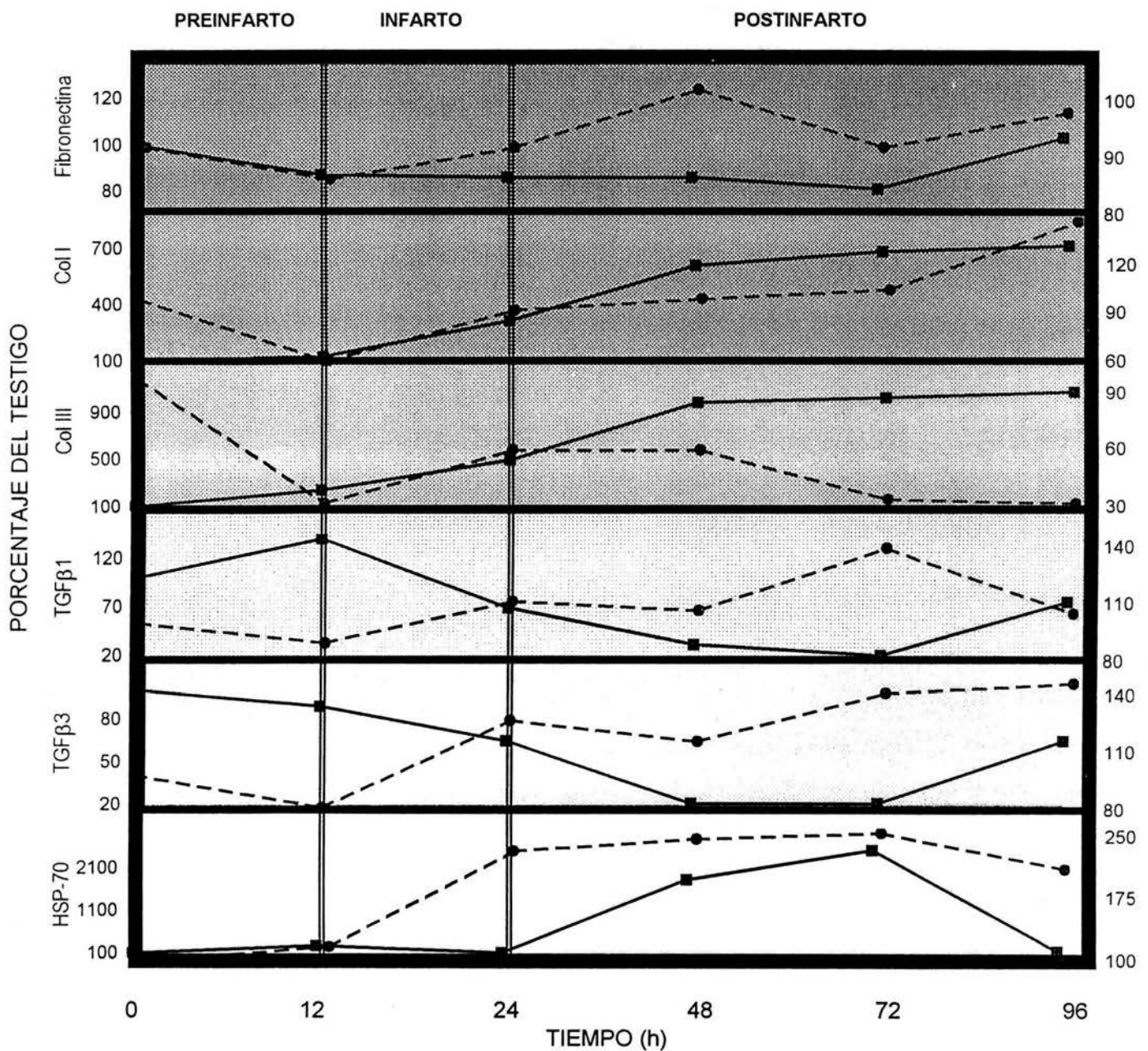


Fig. 8. Las dos gráficas representan la acumulación de la proteína así como el transcrito de Hsp70 en la zona apical del corazón. El valor real del 100% del RNAm es de 12.6 y de la proteína es de 8.4, expresado en unidades arbitrarias. n=3

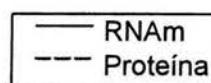
\*Testigos vs Tratadas con ISO p < 0.01. (□ preinfarto; ■ infarto; ▨ postinfarto)

En la figura 9, se presenta una secuencia temporal de los principales eventos estudiados, en la etapa del preinfarto se observa una disminución de las proteínas principales que forman la MEC, fibronectina, Col I, Col III, sugiriendo una preparación del tejido al adelgazar la pared del ventrículo, observándose un incremento discreto una vez que ocurre el infarto. Este proceso continúa en la etapa de postinfarto, excepto en el caso de Col III, en que se observa una franca disminución sugiriendo que la colágena formada en la etapa de cicatrización no va a tener las mismas características de la colágena normal del tejido al alterarse la relación Col I/Col III. El mensajero de fibronectina se incrementa hasta las 48 h, no así los de Col I y Col III. Se hace evidente en el caso de Col III que, aunque existe el mensajero, debe haber algún problema a nivel transcripcional que no permite la formación de la proteína. Las citocinas fibrogénicas TGF-beta 1 y 3 se incrementan después del infarto para estimular la fibrosis del tejido cardiaco y recuperar la MEC perdida., estos incrementos son precedidas por el aumento del mensajero, la señal para la síntesis de estas proteínas se inicia inmediatamente de que ocurre el infarto. Posiblemente estos factores se forman por un mensajero ya existente y disminuye drásticamente durante la primera fase de cicatrización, incrementándose hacia las 72 h. Es posible que estos cambios estén relacionados con la vida media de estos mensajeros. El caso de la proteína de choque térmico Hsp70 realmente aumenta después del infarto e inicia su disminución en las 96 h, indica que los cambios en el RNAm están desfasados en tiempo pero siguen el mismo perfil. El patrón de expresión de esta proteína, sugiere que en la dinámica del tejido para alcanzar el equilibrio después del infarto, la Hsp70 desempeña un papel primordial, quizá el más importante sea el de ensamblar las proteínas desnaturalizadas en la MEC.

Es interesante poder integrar estos cambios en el marco de los cambios fisiológicos y bioquímicos que se describe previamente en este modelo (52). Se puede decir que las respuestas funcionales más rápidas observadas en este modelo son el aumento de la frecuencia cardiaca y la caída brusca de la presión arterial y la presión del ventrículo izquierdo, afectando la conducción aurículo-ventricular, cambios fisiológicos que resultan en una modificación inminente del electrocardiograma durante el preinfarto y el infarto. Bioquímicamente, durante estas etapas se nota una degradación importante de los



**FIGURA 9. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. COMPARATIVO DE PROTEÍNAS Y RNAm.** Se muestran algunos componentes de la matriz expresados como niveles de proteína determinados mediante ensayo de Western blot junto con los niveles del RNAm determinados mediante Northern blot. Ambos ensayos fueron evaluados densitométricamente.





nucleótidos de adenina, principalmente el ATP, originando una disminución de la carga energética. Esta disminución causa un aumento de sustratos degradables por la xantina oxidasa que juega un papel muy importante ya que en las condiciones fisiológicas que se detectan en esta situación se convierte en una fuente importante de radicales libres, principalmente ión superóxido, notándose una disminución del mensajero y las proteínas de Col I, Col III y FN, así como el aumento del mensajero de TGF- $\beta$ 1 y 3. En la etapa postinfarto, se observa la recuperación de algunos de los parámetros fisiológicos alterados como frecuencia cardíaca, presión arterial y no de la presión del ventrículo izquierdo, conducción A-V y recuperación de los parámetros energéticos. Por el momento no se visualizó la relación molecular que existe entre los cambios fisiológicos y bioquímicos previamente estudiados con los cambios estructurales consecuentes de las alteraciones observadas en la MEC y en sus factores reguladores, pero pudiera ser muy interesante localizar esta relación a nivel de factores de transcripción, entre ellos el NF- $\kappa$ B y AP-I que se sabe son inducidos por especies reactivas de oxígeno (ROS).

La reparación de la lesión originada por el infarto al miocardio, es un proceso complejo en el que juega un papel importante la remodelación de la MEC. Se sabe que las células responsables de este proceso son los miofibroblastos que se originan de la diferenciación de los fibroblastos, que aparentemente solo ocurre en situaciones patológicas. Estas células expresan colágena e inician el proceso de fibrogénesis. Una vez que se ha instalado la colagenasa en la MEC, cesa la formación de colágena, y los miofibroblastos sufren apoptosis y gradualmente se forma la cicatriz (25). La remodelación de la MEC conlleva un cambio estructural del tejido, transitorio o permanente en algunos casos, de tal manera la MEC cercana a la lesión difiere cualitativa y cuantitativamente de la MEC normal, resultados que se muestra en la tabla 2 (58).

La secuencia de aparición de las proteínas de la MEC durante la remodelación, depende en gran parte de los estímulos fibrogénicos y de los factores antifibrogénicos; es decir, los factores que promueven la formación y los que estimulan su degradación. En este estudio se exploraron el proceso de la formación y regulación de algunas proteínas de la MEC, la formación de la colágena (tipo I y III), como principal componente de la MEC y la fibronectina así como los factores de crecimiento transformante beta (59).

Al analizar los cambios de los transcritos de colágena tipo I y III, se observó una respuesta temprana y prolongada de incremento de 1.4 a 2 veces los transcritos durante la etapa de pre-infarto, (0-3 h) en la colágena tipo I y de 0-12 h en la colágena tipo III. Poco antes del infarto y durante su fase inicial, se observa la disminución significativa del transcrito de colágena tipo I. Estas respuestas pueden ser debidas a la alteración de la función cardiaca originada por la administración del isoproterenol, la caída brusca de la presión arterial, a la hipoxia o a la producción aumentada de óxido nítrico (ON) liberado del endotelio, o la formación de radicales libres generados por la xantina oxidasa (60, 61).

En la secuencia estudiada de infarto de miocardio experimental, en las etapas observadas de preinfarto, infarto y postinfarto, los cambios funcionales de disminución en la presión arterial y aumento en la frecuencia cardiaca, especialmente durante la etapa de preinfarto, van acompañadas de una hipoxia funcional que resulta en la formación de especies reactivas de oxígeno. Estudios realizados en el laboratorio señalan dos incrementos importantes de radicales libres, uno observado durante el periodo de preinfarto y se explica por la formación de ión superóxido generado por un incremento de la forma oxidante de la xantina oxidasa actuando sobre la degradación de los nucleótidos de adenina observados en este periodo y posiblemente por los peroxinitritos generados por el óxido nítrico de las células endoteliales y el ión superóxido generado a través de la xantina oxidasa. El otro incremento importante de radicales libres, posiblemente de origen mitocondrial, se observa durante la etapa de postinfarto ya que al recuperarse la presión arterial se normaliza el flujo sanguíneo y el aporte de oxígeno, encontrándose este con un menor número de mitocondrias y con deficiencia de la función mitocondrial originándose una mayor formación de las especies reactivas de oxígeno.

De momento no es posible integrar los cambios funcionales y bioquímicos previamente observados en este modelo, pero es posible que la presencia de radicales libres en el núcleo preparen los factores de transcripción modulando los genes involucrados. En nuestro modelo, el infarto estimuló el transcrito de colágena tipo I y III en el área del infarto durante la etapa del post-infarto. Una observación interesante es en relación a la transcripción coordinada de los genes de colágena tipo I y III que, por otra

parte, coinciden con la observación histológica durante la caracterización de este modelo de la aparición de las bandas de colágena a las 48 h del tratamiento.

Al medir las proteínas de estos transcritos en el área del infarto, se observó que no obstante el incremento de los transcritos en la etapa de preinfarto (0-6 h), los niveles de colágena tipo I y III, permanecen casi constantes sugiriendo una posible degradación del transcrito, algún problema a nivel de traducción o degradación de la proteína misma. Durante el infarto, estas 2 proteínas disminuyen significativamente, especialmente colágena tipo III, posiblemente como protección al hacer más flexible y elástica la zona del miocardio dañada y puede deberse a un aumento de la actividad colagenolítica y/o disminución de los factores inhibidores (TIMP) de esta actividad (31). A las 24 h, en la etapa final del infarto, se observa un aumento paulatino de Col I, alcanzando su nivel máximo a las 96 h. Aunque no se sabe los mecanismos moleculares que controlan la síntesis y degradación de la colágena, se puede considerar que su presencia en el área del infarto como una respuesta tisular ante el daño. Es interesante señalar que estudios previos sobre la presencia de radicales libres y defensas antioxidantes en este modelo indica que a 24 y 48 h se detecta el mayor estrés oxidativo (trabajo no publicado del laboratorio). En el caso de Col III, no aumenta la proteína en post-infarto sugiriendo que el RNAm se acumula después del infarto, sin traducirse a proteína posiblemente por algún problema postraduccional que evita la formación de Col III; sin embargo a 24 y 48 h se observa un aumento de Col III, cabe mencionar que a esos tiempos se observa el mayor estrés oxidativo (trabajo no publicado del laboratorio). Estos cambios se reflejan en una estructura diferente de la colágena que se está formando, si calculamos la relación Col I / Col III, en los testigos es de 0.76 y a partir de las 3 horas de tratamiento, empieza a modificar alcanzando cambios importantes durante el infarto y el post-infarto (tabla 2), hasta 3.86 principalmente por un aumento de Col I y no de Col III.

La fibronectina es un componente clave durante la reparación de las heridas y se eleva en los tiempos durante la etapa de remodelación y fibrosis. La fibronectina es una molécula de adhesión que promueve la migración celular y la quimiotaxis de los monocitos. En este estudio tanto el transcrito como la proteína (Fig 3), no variaron

significativamente a lo largo del periodo experimental en el ventrículo izquierdo, lo que pudiera pensarse que el gen de fibronectina se expresa de manera constitutiva (62).

Las isoformas del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1), tienen una gran analogía y frecuentemente con actividad biológica intercambiable, son codificadas por distintos genes con un promotor único (40, 63). Su capacidad para mejorar y acelerar la reparación del tejido dañado, ha sido muy estudiada en diferentes modelos experimentales. El TGF- $\beta$ 1 es liberado por numerosas células como las plaquetas, linfocitos, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, por lo que tienen una gran diversidad de respuestas celulares (63). La expresión de TGF- $\beta$ 1 responde a varios estímulos tales como heridas, isquemia o fibrogénesis. El TGF- $\beta$ 3 se induce por estímulos hormonales.

El TGF- $\beta$ 1 actúa como regulador en el proceso de reparación y adaptación del corazón al estrés o al infarto (9). Se ha mostrado la presencia de TGF- $\beta$ 1 en las células que rodea la zona de infarto por ligadura de la arteria coronaria izquierda. Existe una expresión basal en los corazones de los animales testigos, que disminuye durante la primera hora del tratamiento con subsecuente elevación alcanzando un máximo a las 12 h el TGF- $\beta$ 1 y a las 2 h el TGF- $\beta$ 3, volviendo a disminuir durante el infarto y la etapa inicial del post-infarto (24-72 h). Claramente se observa que el máximo incremento del TGF- $\beta$ 1 precede la expresión del transcrito de Col I y Col III. Existe la posibilidad que el estrés oxidativo máximo observado a las 24-48 h de tratamiento, participe en la expresión de los transcritos de TGF- $\beta$  y de las colágenas. En el ventrículo derecho que no presenta lesión, también se estudió la expresión de los transcritos y se observaron variaciones semejantes pero en menor magnitud sugiriendo la posibilidad de que la señal de remodelación no esté ligada únicamente a la lesión, sino a una disminución de la función que percibe el órgano completo o a factores que se liberan como la angiotensina, aldosterona y otros factores que afectan el metabolismo del TGF- $\beta$ 1. Se ha señalado que la angiotensina II induce la formación de TGF- $\beta$  en el área del infarto y regula la formación de los miofibroblastos y la formación de tejido fibroso (23). El ISO disminuye la formación del mensajero, posiblemente desencadena algún factor represor, proceso que se revierte durante el infarto, la proteína disminuye cuando sube el mensajero durante el infarto pero no

después. La baja expresión de este factor de crecimiento en su forma activa, puede atribuirse a su naturaleza adhesiva, probablemente una gran parte de la proteína se pierde durante el proceso de extracción (57).

Estudios realizados sobre la acción protectora de Hsp70 en el corazón, han demostrado que protege contra el daño oxidativo especialmente los generados en la mitocondria al nivel del sistema NADH-cOQ, de la cadena respiratoria, por el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido (64). Estudios previos del laboratorio demuestran la presencia de radicales libres provenientes del endotelio, de la xantina-oxidasa, de los macrófagos y polimorfonucleares así como de la mitocondria. Posiblemente así se explique el hecho de que los transcritos de Hsp70 de este estudio, se expresen por primera ocasión, entre 3 y 6 h y posteriormente entre 48 y 72 h. Sin embargo, en cuanto a la expresión de la proteína solo se observa marcadamente de las 24-96 h, durante el infarto y el post-infarto. Se ha especulado el papel de estas proteínas Hsp70, como protectores de la integridad y función mitocondrial; sin embargo, estudios previos del laboratorio en donde se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial, cociente respiratorio, síntesis de ATP, potencial de membrana, nivel de ATP y carga energética en donde no reflejan una franca recuperación de los valores disminuídos durante el preinfarto e infarto, solo se aprecia una leve recuperación (52).

## **XI. CONCLUSIÓN**

Durante el infarto experimental inducido con ISO, hay una reducción de la capacidad funcional del corazón subsecuente a una necrosis que promueve una remodelación del tejido dañado. En esta remodelación se observan cambios en los niveles de RNAm y proteínas de la matriz extracelular como la colágena tipo I y III, fibronectina y los reguladores de la síntesis de la MEC como la proteína de choque térmico Hsp70 y los factores de crecimiento TGF- $\beta$ 1 y 3.

Primero se degrada la red de colágena que puede adelgazar la pared del ventrículo izquierdo y provocar dilatación. Posteriormente se sintetiza la colágena y se forma la cicatriz que previene la dilatación. En estos resultados se observó que durante el infarto



12-24 h, disminuye la colágena tipo I, aumentando posteriormente, y la colágena tipo III disminuye desde las 6 h antes del infarto.

La fibronectina no cambia significativamente, no obstante llama la atención una disminución máxima a las 12 h, lo que pudiera pensarse como una respuesta a la disminución de la función cardiaca.

Al medir los niveles de Hsp70 se observó un incremento significativo a las 24-96 h, en la etapa postinfarto, indicando que esta proteína pudiera desempeñar un papel importante durante la remodelación del tejido cardiaco.

Los cambios en los niveles de proteína en la MEC va acompañado de factores que inducen la transcripción, para regular la formación de las proteínas durante la remodelación, por ejemplo TGF- $\beta$ 1 interviene en el crecimiento y proliferación celular promoviendo la síntesis de las proteínas que forman la fibrosis al igual que TGF- $\beta$ 3.

De acuerdo con los resultados obtenidos, tenemos una idea de como se inicia el proceso de cicatrización y remodelación cardiaca. La síntesis de las proteínas de la MEC, ocurren después del infarto siendo precedida a tiempos tempranos por TGF- $\beta$ 1 y las proteínas Hsp70, que se sintetizan durante el infarto y 48 h después del mismo.

## **XII. APORTACIONES**

En el país un alto porcentaje de la población muere de trombosis y no se sabe mucho acerca de su tratamiento clínico porque se desconoce el marco bioquímico y fisiológico que conlleva a la recuperación de los pacientes después de un infarto.

Con este modelo de infarto experimental estudiado y caracterizado en el laboratorio en donde el isoproterenol induce una hipoxia funcional se ha establecido tres etapas bien definidos que son el preinfarto, infarto y postinfarto podemos estudiar los procesos de recuperación del tejido cardiaco después de la necrosis puesto que la dosis de isoproterenol permite a los animales sobrevivir al infarto lo cual nos ha facilitado observar mediante estudios histológicos la estructura del tejido, se han hecho estudios



hemodinámicos y bioquímicos, cambios temporales de algunos parámetros en el balance de energía y función mitocondrial, se ha monitoreado la frecuencia cardiaca mediante la actividad eléctrica, se ha podido medir la temperatura del cuerpo de los animales y la medición de enzimas marcadores del tejido cardiaco en el suero, sin embargo con estos estudios era difícil establecer los mecanismos de cardiotoxicidad del isoproterenol por lo que hacía falta aclarar varios puntos para elucidar los eventos celulares y moleculares que se llevan a cabo después de la administración del isoproterenol y en base a estos resultados surgió el interés de estudiar algunas proteínas de la matriz extracelular durante la remodelación del tejido cardiaco para identificar la secuencia de aparición y la intervención de algunas proteínas que se forman en la MEC durante la remodelación y cicatrización del tejido cardiaco en la fase temprana de recuperación.

En este estudio se encontró que durante la remodelación del tejido cardiaco refleja un cambio en el contenido de colágena tipo I y III en la MEC, después del infarto predomina la colágena tipo I sobre la colágena tipo III, lo que indica que el infarto estimuló el transcrito de col I y que existe una transcripción coordinada de los genes de Col 1, por otra parte coincide con la observación histológica realizado previamente a este estudio con la aparición de bandas de colágena a las 48 h de tratamiento.

En este modelo la FN al parecer se expresa de manera constitutiva debido a que no se observaron cambios importantes durante el tiempo de estudio. La proteína de choque térmico desempeña un papel importante durante el infarto, su incremento en la etapa postinfarto indica que esta proteína es indispensable durante el proceso de remodelación, posiblemente ensamblando las proteínas que se forman en la MEC, por otro lado puede proporcionar resistencia a las células a la apoptosis o actuar directamente en la mitocondria y en el citoesqueleto que son las estructuras dañadas durante el infarto.

En términos generales este estudio nos proporciona una información en la forma como inicia el proceso de cicatrización y remodelación del tejido cardiaco, en donde la síntesis de las proteínas de la MEC ocurren después del infarto, siendo precedidas por el TGF- $\beta$ 1 que es uno de los factores reguladores que controla el depósito de proteínas de la MEC y la proteína de choque térmico Hsp70 que se sintetiza durante el infarto y 48 h después del mismo.

### **XIII. PERSPECTIVAS**

La secuencia temporal del proceso de cicatrización de la lesión producida por el infarto nos sugiere una expectativa que nos permitirá conocer la recuperación funcional y estructural del corazón infartado que originan que este tejido caiga en una insuficiencia cardiaca .

- 1) Estudiar las colagenasas (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs) para completar las características de la primera etapa.
- 2) Una expectativa interesante es continuar la evaluación de la matriz extracelular durante la etapa de remodelación prolongando los tiempos experimentales a 1, 2 y 3 meses ya que observaciones preliminares del laboratorio indican la presencia de insuficiencia cardiaca en el corazón.

#### XIV. REFERENCIAS

1. Lozano- Asencio R, Escamilla JA, Escobedo de la Peña, López Cervantes M. 1990. Salud Pública de México 32: 432-40.
2. Wittels EH, Hay JW, and Gotto AM. Medical costs of coronary artery disease in the United States. *A J Cardiol* 1990; 6(57): 432-40.
3. American Heart Association 1990. American Assosiation National Center Dallas, pg. 1.
4. Knowlton Annie A, Kapadia Samir, Torre-Amione Guillermo, Durand Jean-Bernard, Bies Roger, Young M James, Douglas LM. Differential Expression of Heat Shock Proteins in Normal ND Failling Human Heart. *J Mol Cardiol* 1998; 30: 811-818.
5. Lindquist S. The heart-Shock response. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 1151- 91.
6. Hutter MM, Shavers RE, Barrosa V, Wolfe CY. Heat-shock protein induction in rats hearts, a direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Cir* 1994;89(1): 355-60.
7. Mestril R, Dillman WH. Heat shock protein and protection against myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1): 45-52.
8. Villarreal JF, Dillman WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- $\beta$ 1, fibronectin and collagen. *Am J Physiol* 1992; 262(6 pt 2 )31: H1861-H1866.
9. Thompson NL, Bazoberry F, Speier EH, Cassels W, Ferrans VJ, Flanfer KC, Komdaiah P, Geiser AG, Sporn MB. TGF- $\beta$ 1 in acute myocardial infarction in rats. *Sporn Grow Factor* 1988;1: 92-99.
10. Kobayashi A, Watanabe H, Osawa K, Hayashy H, Yamasaky N. Oxigen-derived free radicals related injury in the heart during ischemia and perfusion. *Jap Cir J* 1989; 53(9): 1122-1131.
11. Sen ChK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; 10(7): 709-720.

13. Kurremeyer-K, Karla-D, Bozkurt-B, Wang-F, Dibbs-Z, Seta-Y, Baumgarten G, Engle D, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac remodelling as a consequence and cause of progressive heart failure. *Clin Cardiol* 1998; 21(12 suppl): 114 -19.
14. Solomon-SD, Pfeffer-MA. Myocardial infarction, ventricular remodeling, and angiotensin-converting enzyme inhibition: where we stand today. *American-Heart-Journal* 1998; 136 (6): 931-33.
15. Nguyen-QT, Cermacek-P, Calderoni-A, Stewart-DJ, Picard-P, Sirois P, White-M, Rouleau-JL. Endothelin A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat. *Circ* 1998; 98(21): 2323-30.
16. Sutton MG, Shape N. Left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Circ* 2000; 101: 2981-2988.
17. Karp Gerald. 1998. *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana. Traducido e impreso en México. p.p. 314-315
18. Kissane M J. 1990. *Anderson' s Pathology*. Vol. One, The C. V. Mosby Company. St. Louis Missouri. U.S.A. pp. 630-38.
19. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch Phatol* 1959; 67: 443-455.
20. Opie H Lionel, MD, Dphil. 1998. *The Heart Physiology, from Cell to Circulation*. Lippincott- Raven. New York. USA.
21. Visser CA. Left ventricular remodelling after myocardial infarction: importance of residual myocardial viability and ischemia. *Heart* 2003;89:1121-1122.
22. Sohaper J, Kostin S, Hein S, Elsasser A, Arnon E ND Zimmermann R. Structural remodelling in heart failure. *Cardiology* 2002;2:64-68.
23. Bendall JK, Heymes C, Ratajczak P, and Samuel JL. Extracellular Matrix and Cardiac Remodelling. *Carediovascular Res* 2002; 12: 1226-1228.
24. Clark AF Richard. 1996. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Plenum Pres, New York. p.p. 139-412.
25. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Am Cell Cardiol* 1989;13: 1637-52.

26. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smits JF, Mat JA Daemen. Collagen Remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147: 325-338.
27. Sun Yao, Zhang Q, Zhang Jiakun and Ramirez JA Félix. Angiotensin II, Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Repair in the Infarcted Heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1559-1569.
28. Petrov VV, Fagard R H, Lijnen PJ. Transforming growth factor-beta 1 induces angiotensin-converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblasts during their differentiation to myofibroblasts. *J Ren Angiot Ald Syst* 2000; 1(14): 342-352.
29. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF and Joly AH. CTGF Expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32 (10): 1805-19.
30. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Kapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *Inves Dermatol* 1996; 107: 404-411.
31. Li You Yun, Feng Yiqin, McTiernan FC, Pei Wei, Moravec SC, Wang Ping, Rosenblum Warren, Kontos LR, Felman MA. Downregulation of matrix Metalloproteinase and reduction in Collagen Damage in the failing Human Heart After Support With Left Ventricular Assist Devices. *Cir* 2001; 104: 1147-1152.
32. Ritzenthaler DJ, Goldstein HR, Fine Alan, Lichtler Alexander, Rowe WD, Smith DB. Transforming-growth-factor- $\beta$  activation elements in the distal promoter regions of the rat  $\alpha$  1 type I collagen gene. *Biochem J* 1991; 280: 157-162.
33. Magnusson K. Magnus and Mosher F. Deane. Fibronectine: Assembly, and Cardiovascular Implications. *Arterioscler Tromb Vas Biol.* 1998; 18: 1363-1370.
34. Lee PL, Phillip AS. Alternative Splicing of the Fibronectin EIIIB Exon Depends on Specific TGCATG Repeats. *Mol Cell Biol* 1998; 18(7): 3900-3906.
35. Ulrich M, Janssen Anique AM, Daemen Mat MJ, Rappaport Lydie, Jane-Lyse Samuel FC, Smits Jos FM, Cleutjens Jack PM. Increased expression of fibronectin isoform after Myocardial infarction in rats. *Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2533-2543.
36. Dalen Helge, Saetersdal Thorvald, Roli Jakob, Larsen H. Effect of Collagenase on surface Expression of Immunoreactive Fibronectin and laminin in Freshly Isolated Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 947-955.
37. Kontos MC, Shipley Michael B, Kukreja RC. Heat Stress Improves Functional Recovery and Induces Synthesis of 27- and 70-kDa Heat Shock Protein Without



Preserving Sarcoplasmic Reticulum Function in the Ischemic Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(9): 1885-1894.

38. Mestril R, Dillmann WH. Heat shock protein and protection against myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1): 45-52.
39. Welch JW. How Cell Respond to Stress. *Sci Am* 1993; 268(5): 56-64. Welch JW. How Cell Respond to Stress. *Sci Am* 1993; 268(5): 56-64.
40. Leroith Dereck, Bondy Carolyn. 1996. Growth Factors and Cytokines in Health and Disease. Vol. 1B, *JAI PRESS INC*. London, England. pp. 319-393.
41. Allen-Hoffmann BL, Crankshaw CL, Mosher DF. Transforming growth factor increases cell surface binding and assembly of exogenous (plasma) fibronectin by normal human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1988;8(10): 4234-4242.
42. Massagué Joan, Hata Akiko, Fang Liu. TGF- $\beta$  signalling through the Smad pathway. *Trends in Cell Biol* 1997; 7:187-91.
43. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of Cardiac Fibrosis by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Mol Gene Metabol* 2000; 90(3): 297-304.
44. Cleutjen JP, Creemers EE. Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodelling after myocardial infarction. *J Card Fail* 2002; 8(6suppl): S344-8.
45. Villarreal J. Francisco MD, PhD, and Kim N. Noel, PhD. Regulation of Myocardial Extracellular Matrix Components by Mechanical and Chemical Growth Factors. *Cardiovasc Pathology* 1998; 7(6):1-7.
46. MccLlelan Brand T, Schneider MD. Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. *Cir Res* 1993; 73(5):783-791.
47. Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic Stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1994; 94(4): 1470-1476.
48. Swan HJ. Left ventricular dysfunction in ischemic heart disease: fundamental importance of the fibrous matrix. *Cardiovasc Drug Ther* 1994; 8: 305-12.
49. Hebert YL, Harvey FL. Receptors for the TGF- $\beta$  superfamily: multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends in Cell Biol* 1993; 3: 14-19.
50. Taya Yuji, O kane Sharon and Ferguson WJ Mark. Pathogenesis of cleft palate in TGF- $\beta$ 3 knockout mice. *Development* 1999; (126): 3869-3879.

51. Lin H.Y. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992; 69: 775-785.
52. Chagoya de Sánchez Victoria, Hernández-Muñoz Rolando, López-Barrera Fernando, Yáñez Lucía, Vidrio Susana, Suárez Jorge, Cota-Garza Ma. Dolores, Aranda Alberto, Cruz David. Sequential Changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1300-11.
53. Shomczynsky P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-Chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.
54. Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *PNAS* 1984; 81(7): 1991-95.
55. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
56. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259): 680-85.
57. Li JM, Brooks G. Differential protein expression and subcellular distribution of TGF-beta 1, beta 2 and beta 3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(8): 2213-24.
58. Masson Serge, Arosio Beatrice, Luvara Giuseppina, Gagliano Nicoletta, Fiordaliso, Fabio, Santambrogio Daniela, Vergani Carlo, Latini Roberto, Annoni Giorgio. Remodeling of Cardiac Extracellular Matrix during  $\beta$ -Adrenergic Stimulation: Upregulation of SPARC in the Myocardium of Adult Rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1505-1514.
59. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of Cardiac Fibrosis by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Mol Gene and Metabol* 2000; 90(3): 297-304.
60. Saavedra F, Paolocci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marban E, Kass DA, Hare JM. Imbalance between xantine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Cir Res* 2002; 90(3): 297-304.
61. Sorescu D, Griendling KK. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD (P) H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail* 2002; 8(3): 132-40.



62. Farhadian Farahnaz, Contard Francis, Cobier Alan, Barrieux Alice, Rappaport Lydie, Samuel Lyse Jane. Fibronectin Expression During Physiological and Pathological Cardiac Growth. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 981-990.
63. Kigsley MD. The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Develop* 1994; 8: 133-146.
64. Bornman Liza, Steinmann ML, Gericke SG, Pollas SB. In vivo Heart Shock Protects Rat Myocardial Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246: 836-840.