



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**MiR-23a DESDE LA ETAPA FETAL HASTA LA
NEONATAL: MODELO MURINO DE HIPERTROFIA
CARDIACA INDUCIDA CON ISOPROTERENOL**

TRABAJO DE TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
CALZADA TORRES ALAYDE**

**ASESORA: M. EN C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS
COASESORA: M. EN C. ARLETT DEL OLMO TURRUBIARTE**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

MiR-23ª desde la etapa fetal hasta la neonatal: modelo murino de hipertrofia cardiaca inducida con Isoproterenol

Que presenta la pasante: Alayde Calzada Torres

Con número de cuenta: 408017943 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Junio de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	QFB. Sara Hernández Matilde	
2do. SUPLENTE	QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

AGRADECIMIENTOS

A mis padres *Consuelo* y *Froylán*, y a mi hermano *Pablo*, que me han apoyado incondicionalmente en todo sentido, no solo en mi carrera, sino a lo largo de toda mi vida, y cada uno con sus ejemplos me han enseñado que no existe obstáculo que no se pueda superar para alcanzar las metas, gracias a eso he podido llegar hasta este punto, y saben que seguiré adelante.

A la M. en C. *Arlett Del Olmo* porque siempre estuvo brindándome su tiempo y su paciencia para enseñarme cosas nuevas, y que me ha apoyado en todo momento para no rendirme, seguir adelante y alcanzar mi meta.

A la Dra. *Alejandra Contreras Ramos* por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, en el laboratorio de Biología Molecular, dándome su confianza e impulsándome en mi trabajo sin limitarme. Además agradezco los empujones que me dio, porque me sirvieron bastante para crecer no solo en lo académico sino en lo personal.

A todas las mis compañeras del laboratorio de Biología del Desarrollo del HIMFG, en especial a las que ahora considero unas grandes amigas *Naye, Tania, Karen y Cristy*; así también a dos geniales mujeres la Dra. *Lupita* y a la técnico *Lucy*, por el apoyo brindado.

A mis increíbles amigas *Liz, Karla y Sofía*, que las quiero y las aprecio mucho, porque me han apoyado a lo largo de mi carrera y más allá; agradeciéndoles a cada una la confianza y el cariño que me tienen, y por esos momentos divertidos y no tan divertidos que hemos pasado juntas, esperando que sigan un buen rato más.

A la Profesora *Maritere Domínguez* que me brindo su tiempo y apoyo durante todo este proceso.

Índice General

Índice de Figuras, Gráficas y Tablas	V
Resumen	VI
I. Introducción	1
1.1. Hipertrofia Cardíaca	1
1.2. Factores de Transcripción	3
1.2.1. <i>GATA-4</i>	4
1.2.2. <i>NFAT</i>	5
1.2.3. <i>MEF-2C</i>	6
1.3. MiR-23a implicado en la HC	7
1.3.1. <i>Biogénesis</i>	8
1.3.2. <i>MiR-23a</i>	9
1.4. Modelo de HC inducida con Isoproterenol	10
II. Justificación	12
III. Planteamiento del Problema	13
IV. Hipótesis	13
V. Objetivo General	13
5.1. Objetivos Particulares	13
VI. Materiales y Métodos	14
6.1. Material	14
6.1.1. <i>Material biológico</i>	14
6.1.2. <i>Anticuerpos Primarios</i>	14
6.1.3. <i>Anticuerpos Secundarios</i>	14
6.1.4. <i>Reactivos</i>	14
6.1.5. <i>Oligonucleótidos</i>	15
6.1.6. <i>Equipos</i>	15
6.2. Métodos	16
6.2.1. <i>Obtención de hembras gestantes</i>	16
6.2.2. <i>Inducción de HC durante la gestación</i>	16
6.2.3. <i>Inducción de HC durante la etapa adulta</i>	16
6.2.4. <i>Análisis Anatómico e Histopatológico</i>	16
6.2.5. <i>Inmunofluorescencia indirecta</i>	17
6.2.6. <i>Extracción de RNA y síntesis de cDNA</i>	17

6.2.7. <i>qPCR-Tiempo Real</i>	18
6.2.8. <i>Análisis de Datos</i>	18
VII. Resultados	19
7.1. Análisis anatómico e histopatológico de corazones hipertróficos en etapa fetal y postnatal tratados con ISO durante su gestación	19
7.2. Factores de Transcripción determinantes en la HC	23
7.2.1. <i>GATA-4</i>	23
7.2.2. <i>NFAT</i>	27
7.2.3. <i>MEF-2C</i>	31
7.3. Expresión Relativa de miR-23a	31
7.4. Correlación de la expresión del miR-23a con los factores de transcripción GATA-4, NFAT Y MEF-2C en la HC postnatal	36
VIII. Discusión	37
IX. Conclusión	40
X. Apéndice (soluciones, parámetros y técnicas)	41
XI. Referencias	45

Índices de Figuras

Figura 1. Diferencia entre corazón normal y un corazón con Hipertrofia Cardiaca	1
Figura 2. Esquema de los patrones principales de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica que las origina	2
Figura 3. Activación de las Vías de señalización del miocito por diferentes estímulos produciendo la Hipertrofia Cardiaca	3
Figura 4. Biogénesis de los miRs	9
Figura 5. Análisis Anatómico de corazones de ratones tratados con isoproterenol (ISO) y controles (CTR) durante su gestación	20
Figura 6. Análisis Histopatológico del VI en el corazón de ratones tratados con isoproterenol (ISO) durante su gestación	21
Figura 7. Inmunofluorescencia de GATA-4 en el VI del corazón de ratones tratados con isoproterenol durante su gestación	24
Figura 8. Inmunofluorescencia de NFAT en el VI del corazón de ratones tratados con isoproterenol durante su gestación	28
Figura 9. Inmunofluorescencia de MEF-2C en el VI del corazón de ratones tratados con isoproterenol durante su gestación	32

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Índice de Espacio Intersticial	22
Gráfica 2. Análisis de la expresión proteica de GATA-4	25
Gráfica 3. Análisis de la expresión relativa del mensajero de GATA-4	26
Gráfica 4. Análisis de la expresión proteica de NFAT	29
Gráfica 5. Análisis de la expresión relativa del mensajero de NFAT	30
Gráfica 6. Análisis de la expresión proteica de MEF-2C	33
Gráfica 7. Análisis de la expresión relativa del mensajero de MEF-2C	34
Gráfica 8. Análisis de la expresión relativa de miR-23a	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el qPCR- Tiempo Real.	15
Tabla 2. Análisis de variables mediante Correlación de Spearman	36
Tabla 3. Condiciones para síntesis de cDNA de GATA-4, NFAT y MEF-2C.	43
Tabla 4. Condiciones de qPCR-Tiempo Real para GATA-4, NFAT y MEF-2C.	43
Tabla 5. Condiciones para síntesis de cDNA de miRs.	44
Tabla 6. Condiciones de q-PCR Tiempo Real para miRs	44

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, superando de manera notable a otras enfermedades como el cáncer (Kannel, 2000, Maisch et al., 2004). La hipertrofia cardiaca (HC) es una respuesta secundaria irreversible del miocardio a un conjunto de alteraciones de tipo genético, mecánico o estructurales, generalmente diagnosticada en personas de edad adulta y que conduce a una insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita (Galindo et al., 2009). Anteriormente, se pensaba que era una patología rara en niños pero con el avance de la tecnología y el uso de ecocardiogramas, se ha logrado detectar en niños y niñas que presentan trastornos metabólicos como diabetes y obesidad (Gonzalez-Rave et al., 2011); o cardiopatías congénitas, un ejemplo es la estenosis aórtica y valvulopatías (CENETEC, 2009).

Se sabe que los Factores de Transcripción cardiacos (GATA-4, NFAT y MEF-2C) que participan durante una HC de adulto han sido reportados como reguladores de la embriogénesis y en la etapa postnatal, estando relacionados con la cardio-protección ante el estrés citotóxico. (Akazawa and Komuro, 2003). Adicionando el descubrimiento de los microRNAs o mirR's, los cuales participan en la regulación de procesos biológicos incluyendo el desarrollo normal y patológico de los organismos, se conocen más de 150-200 miR's que participan como reguladores cardiacos durante la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis celular, algunos de ellos se destacan por su implicación en las enfermedades cardiacas (Fernandes et al., 2011), como es el caso del miR-23a considerado un miR pro-hipetrófico, en base a modelos de estudio de edad adulta o *in vitro*.

El uso del isoproterenol para el estudio de la HC es muy adecuado, por ser un método de inducción simple, reproducible, de fácil administración y de baja mortalidad (Yan L, 2008; Akasu et al., 1993; Brooks and Conrad, 2009). Recientemente Del Olmo (2011), desarrolló un modelo de HC postnatal al administrar isoproterenol en ratones hembras gestantes revelando alteraciones en el VI y TIV, asociadas con los cambios de expresión de α -MHC/ β -MHC similares a la descrita en la HC de tipo patológica. Sin embargo, hasta el momento no se conocen sí los mecanismos que regulan la HC patológica adulta son los mismos durante la HC postnatal o infantil. Por lo que el presente trabajo de investigación se dedicará a responder sí la HC generada desde una etapa temprana mantiene estos mecanismos o vías, a través de detección y medición de los FT, similar al de un modelo adulto; y si el miR-23a tiene alguna relación en con los factores o la patología según su análisis.

I. Introducción

1.1. Hipertrofia Cardíaca

La hipertrofia cardíaca (HC), se presenta como una respuesta secundaria a diversos factores que alteran los cambios hemodinámicos del corazón, caracterizada por el aumento en el grosor de la pared ventricular izquierda (VI) y tabique interventricular (TIV) (**Figura 1**) (Carreno et al., 2006, Marian and Roberts, 2001), debido al crecimiento en el tamaño de los cardiomiocitos, los cuales constituyen el 76% del volumen del órgano (Niimura et al., 2002).

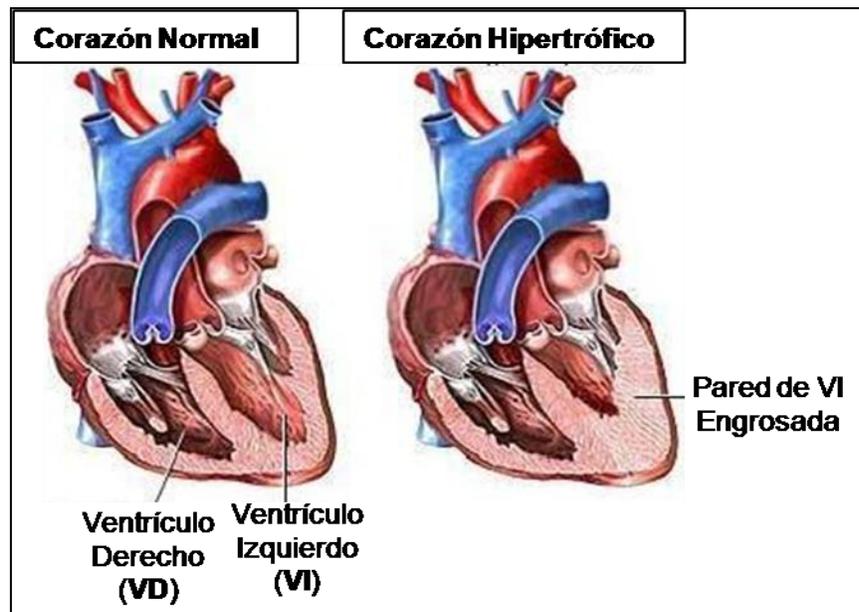


Figura 1. Diferencia entre corazón normal y un corazón con Hipertrofia cardíaca (Modificada. *Salud Siglo XXI*. (s/f). http://elmercaderdelasalud.blogspot.mx/2011_04_01_archive.html).

Dependiendo de la organización de los sarcómeros, a lo largo o a lo ancho en el cardiomiocito, la HC se puede clasificar en HC Fisiológica e HC patológica. La HC fisiológica o adaptativa, es reversible, generada en respuesta a la sobrecarga de volumen inducida por la práctica de la actividad física regular e intensa (Carreno et al., 2006). La HC patológica o inadaptable, no es reversible, se produce en respuesta a la sobrecarga de presión, caracterizada por presentar fibrosis (**Figura 2**). A nivel molecular, la HC patológica está asociada a la reprogramación genética fetal (Beisvag et al., 2009), ejemplo de esto es el cambio en la expresión de isoformas de la cadena pesada de la miosina de tipo α de respuesta rápida (α -MHC, *alpha myosin heavy chain*) por β de respuesta lenta (β -MHC, *beta myosin heavy chain*) (Nakao et al., 1997).

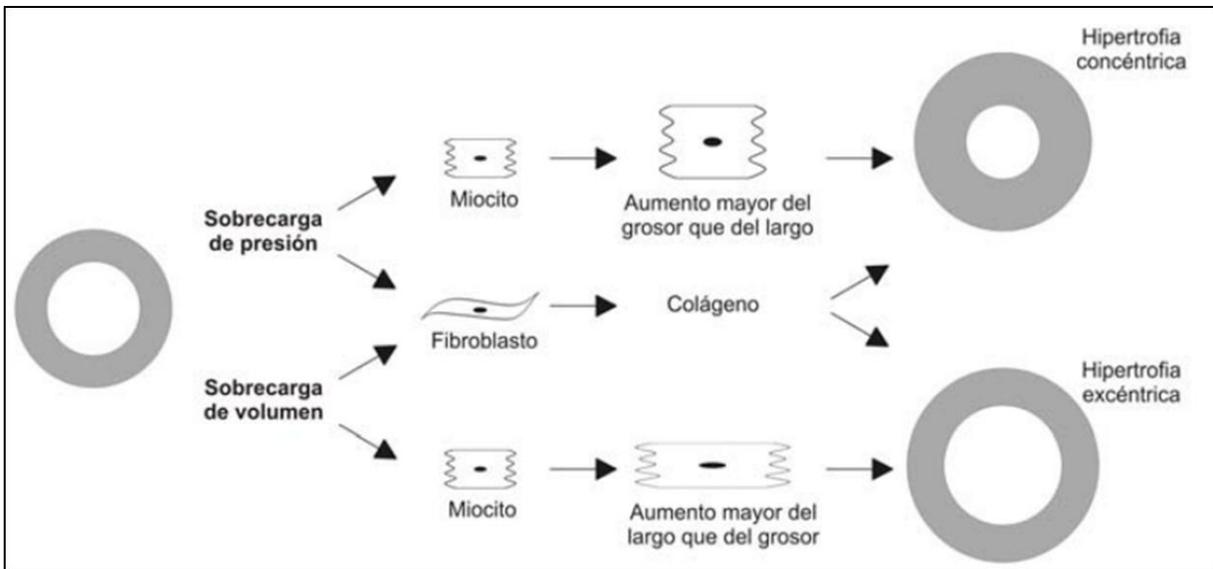


Figura 2. Esquema de los patrones principales de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica que las origina. (Modificado de ENNIS, I. y Escudero E. (s/f). http://www.fac.org.ar/1/publicaciones/libros/tratfac/hta_01/hipertrofia.pdf)

Entre los estímulos que promueven la HC patológica se encuentran factores humorales (adrenalina y noradrenalina); factores de crecimiento (insulínico, transformante, tisular); el óxido nítrico (NO); y agonistas adrenérgicos (fenilefrina e isoproterenol), y vasoconstrictores como angiotensina II (Ang II), o endotelina-1 (ET-1) (Marian and Roberts, 2001); que convergen en la activación de receptores de tipo tirosin-cinasa, o acoplados a proteína G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*), este primer contacto en la superficie celular desencadena la movilización de diferentes proteínas como PKC, Akt, y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *mitogen activated protein kinase-like*), estimuladas por el incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular, ya sea por la apertura de canales de membrana o por su salida desde retículo sarcoplásmico. El incremento de este ion en el citoplasma favorece diferentes rutas como por ejemplo la activación de Calcineurina (Cn) y el factor nuclear activador de células T (NFAT, *nuclear factor of activated T-cells*) asociados al crecimiento celular, a través de la activación de calmodulina (CaM) (**Figura 3**).

Por otro lado, la vía de señalización de las MAPKs activa a tres proteínas principales: p38, c-Jun (JNK, *c-Jun NH₂-terminal kinase*), y las reguladas por señales extracelulares (ERK, *erk-related tyrosine kinase*), encargadas de activar diversas funciones biológicas como el crecimiento celular, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (Liang et al., 2001b). Las cinasas JNK y p38 generalmente sirven como sensores especializados de estrés, a estímulos de factores de crecimiento o de respuesta a lesiones; mientras que ERK actúan

como un punto de integración para múltiples señales bioquímicas de los procesos biológicos antes mencionados. Tales características de activación indican un papel causal para la señalización de MAPK en la mediación o modulación de la respuesta HC (Molkentin, 2004). Estas vías culminan en la activación de Factores de Transcripción (FT) como: GATA-4, NFAT, MEF-2C y, comúnmente determinados en el adulto como activadores de la HC (Figura 3).

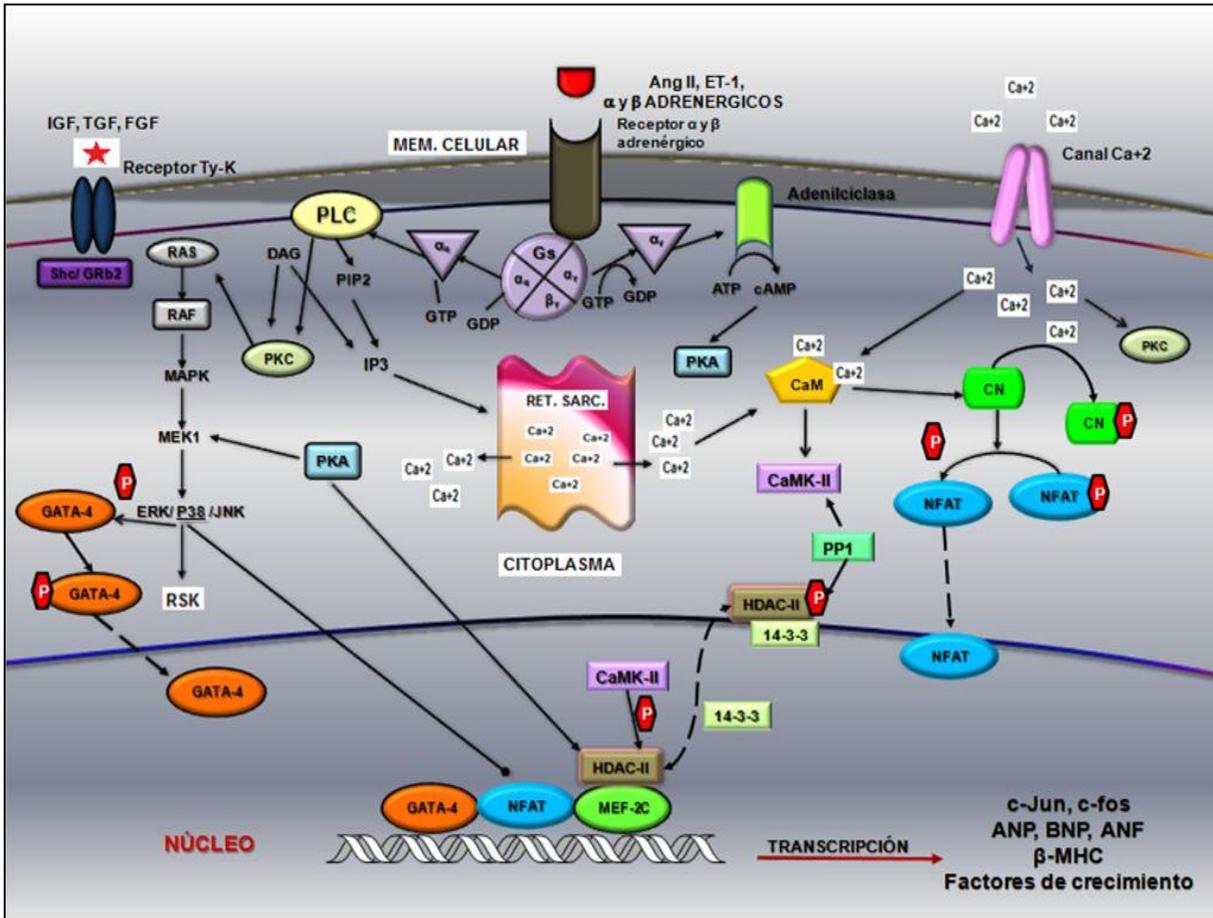


Figura 3. Activación de las Vías de señalización del miocito por diferentes estímulos produciendo la Hipertrofia Cardíaca. (Molkentin et al., 1998; Liang et al., 2001b; Lu et al., 2000; Molkentin, 2004; Jang et al., 2007; MacDonnell et al., 2009; Sunagawa et al., 2010; Kaichi et al., 2011; Katanasaka et al., 2013).

1.2. Factores de Transcripción

Los FT, son proteínas con la capacidad de unirse a una región potenciadora o promotora específica de un gen, dependiendo de su interacción activan o reprimen la transcripción génica. Los FT cardíacos, han sido reportados como reguladores transcripcionales de la embriogénesis, en la etapa postnatal, están relacionados con la cardio-protección ante el estrés citotóxico (Akazawa and Komuro, 2003).

1.2.1. GATA-4

GATA-4, es miembro de la Familia de Factores de Transcripción GATA, caracterizados por uno o más dominios de dedos de Zinc (Zn), se unen a la secuencia de DNA 5'-AGATAG-3', presente en los promotores de muchos genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2626>), entre ellos, el que se traduce para la cadena pesada de α -MHC, las cadenas ligeras de la miosina 1 y 3 (MLC1 y 3), la troponina cardiaca I y C, el péptido natriurético atrial (ANP por *atrial natriuretic peptide*) y el péptido natriurético cerebral (BNP, *brain natriuretic peptide*); durante la morfogénesis cardiaca regulan procesos como diferenciación, proliferación, migración, crecimiento, contractibilidad y sobrevivencia celular (Pikkarainen et al., 2004).

El FT GATA-4 posee 7 fosfopéptidos en dominios amino (N-) y carboxilo (C-) terminales, localizados principalmente en los dedos de Zinc, por lo que adquiere la característica de fosfoproteína. En cultivo de miocitos de ratón adulto, la activación de la proteína cinasa C (PKC, *protein kinase C*), por señales dependientes de Ca^{+2} y diacilglicerol (DAG, *diacylglycerol*), dirige la fosforilación del dominio N-terminal de GATA-4, favoreciendo su actividad transcripcional como regulador de la diferenciación, el crecimiento y la contractibilidad.

GATA-4 también está implicado en la HC, ya que su expresión es regulada por diferentes rutas de señalización que responden a estímulos de sobrecarga de presión, agonistas adrenérgicos o factores de crecimiento (Charron et al., 2001, Pikkarainen et al., 2003, Wang et al., 2005, Hasegawa et al., 1997, Liang et al., 2001a, Oka et al., 2006); entre los que destacan la vía de señalización reguladas por la familia de las MAPKs de las cuales p38, proteína de tipo cinasa, fosforila a GATA-4 en su región N-terminal, promoviendo su exportación al núcleo celular y activando su función transcripcional (Kobayashi et al., 2006). Por su parte Kaichi y colaboradores (2011), y Sunagawa y colaboradores (2010) demostraron en cultivo de miocitos de rata neonatal tratados con fenilefrina (PE) que los receptores acoplados a proteínas G, son parte importante en el proceso de activación de los segundos mensajeros como la PKC o PKA, los cuales a su vez, interactúan con la ciclina dependiente de cinasa 9 (Cdk9, *cyclin-dependent kinase 9*), molécula encargada de fosforilar a la histona acetiltransferasa (HAT, *histone acetyltransferase-like protein*) p300, la cual agrega un grupo acetil al dominio C-terminal de GATA-4, favoreciendo la unión al DNA, desencadenando así la transcripción sinérgica del ANF y la cadena pesada de β -MHC (Kaichi et al., 2011, Sunagawa et al., 2010). En cambio, sí las histonas desacetilasas de tipo II (HDAC-II, *histone deacetylase II*) actúan sobre GATA-4, éste disminuye su actividad

transcripcional sobre los genes hipertróficos antes mencionados (Katanasaka et al., 2013) (**Figura 3**).

Cuando GATA-4 interactuar con otros factores de transcripción como GATA-6, NFAT-3, MEF-2C y SRF, juntos conservan río abajo la activación de la respuesta hipertrófica al potencializar la transcripción de genes como: BNP, importante regulador del volumen sanguíneo y gasto energético cardiaco (Sunagawa et al., 2010), o por el complejo Calcio/Calmodulina ($\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$). Al respecto Molkenin y colaboradores (1998) demostraron que la sobre-estimulación del complejo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ en cultivo de cardiomiocitos neonatos de ratón por PE, es suficiente para desarrollar HC con fibrosis intersticial que evoluciona en insuficiencia cardiaca, asociado al incremento en la expresión de GATA-4 y NFAT-3 (Molkenin et al., 1998).

1.2.2. NFAT

NFAT está compuesto por 5 miembros NFAT-c1, NFAT-c2, NFAT-c3 y NFAT-c4, en citoplasma y NFAT-5 nuclear; conformados por un dominio citosólico que trasloca al núcleo, al unirse al receptor de estimulación de células T (TCR), y un dominio nuclear inducible (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4772>). Durante la embriogénesis NFAT, regula la expresión de numerosos genes entre los que se encuentran citocinas y receptores de superficie como los receptores acoplados a proteína G, receptores acoplados a canales iónicos, y receptores de cinasas, entre otros (Molkenin, 2004).

En los cardiomiocitos, el incremento de Ca^{+2} , derivado del estrés patológico desencadena dos vías de señalización; una dependiente de cinasas ($\text{Ca}^{+2}/\text{CaMK-II}$) y otra de fosfatasas ($\text{Ca}^{+2}/\text{CaM/Cn}$), ésta última favorece la desfosforilización de NFAT, para su traslocación al núcleo y una vez ahí, activa genes pro-hipertróficos entre ellos BNP y ANP; así como algunos genes anti-apoptóticos (MacDonnell et al., 2009). Actualmente, se sabe que el óxido nítrico (NO) tiene un efecto anti-hipertrófico, pues los segundos mensajeros generados como guanosin monofosfato cíclico (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*) y la proteína cinasa de tipo I (PKG I, *cGMP-dependent protein kinase*), regulan negativamente la concentración de Ca^{+2} , en los miocitos tratados con PE, suprimiendo la vía de señalización $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM/Cn}$ -NFAT (**Figura 3**), lo cual se refleja en la disminución del tamaño de los miocitos, pese a la presencia del estímulo (Fiedler et al., 2002; Molkenin, 2004). Molkenin y colaboradores (1998), observaron que la activación sinérgica de GATA-4 y NFAT-3, favorece la síntesis de BNP hasta 100 veces más, que al emplear los FT por separado. Con la finalidad de determinar el dominio activo de NFAT, estos mismos investigadores notaron que

ratones con la mutante del dominio 317 para NFAT (NFAT-3Δ317) pero que conservan la homología Rel y los dominios de activación, son capaces de desarrollar HC de tipo concéntrica, contrario a los ratones que expresaron la forma silvestre de NFAT (Molkentin et al., 1998). Bourajjaj y colaboradores (2008), demostraron por qPCR-Tiempo Real, que el FT NFATc2 es la isoforma mas abundante de la familia de NFAT en el corazón de ratones adultos; además ratones neonatales carentes de NFATc2 presentaron un deterioro funcional del miocardio semejante al provocado por el estrés mecánico, en contraste, ratones con sobreexpresión de Cn pero carentes NFATc2 no desarrollaron HC. Por lo tanto, NFAT-c2 tienen un papel importante río abajo de la vía de Ca^{+2}/Cn , durante la remodelación cardiaca (Bourajjaj et al., 2008; Haberland et al., 2009).

1.2.3. MEF-2C

El Factor Potenciador Específico de Miocitos 2C (MEF-2C, *Myocyte enhancer factor 2C*) es parte de los FT MADS-box (MCM1, *Agamous*, *Deficiens*, *Serum response factor-box*) que son esenciales para la diferenciación de todos los linajes musculares (Morin et al., 2000), la familia MEF-2C está conformada por MEF-2A, MEF-2B, MEF-2C y MEF-2D, comparten homología con la región amino-terminal de la caja MADS rica en adenina-timina, cuentan con un dominio de activación de la transcripción (TAD) en su extremo carboxilo-terminal (Lin et al., 1997). Durante la HC, MEF-2C participa en la regulación de genes como la α -MHC, la cadena ligera de miosina1-3 (MLC1-3), y α -actina esquelética (α -SKA por *alpha skeletal muscle actin*); además de la troponina cardiaca I y C, distrofina y desmina (Rosenthal and Harvey, 2010).

En el ratón, MEF-2B y MEF-2C se co-expresan al comienzo del mesodermo pre cardíaco 7.75dpc, 12 horas más tarde se expresan MEF-2A y MEF-2D. Ratones carentes de MEF-2C mueren antes del nacimiento, mientras que ratones MEF-2C^{+/-} desarrollan un ventrículo hipoplásico asociado a una cámara auricular con contracciones débiles (Lin et al., 1997).

La actividad transcripcional de las proteínas MEF-2C se encuentra regulada por una gran variedad de mecanismos. En condiciones de reposo, el FT MEF-2C se encuentran unido al DNA como parte de un complejo represor asociado a histonas desacetilasas (HDAC) y CAM. Lu y colaboradores (2000) hallaron un incremento en la expresión de MEF-2C al estimular cultivo de miocitos de rata neonatal con PE (Lu et al., 2000). Por su parte Yang y colaboradores (1999) demostraron que las MAPKs fosforilan el dominio TAD de MEF-2C favoreciendo la transcripción de genes como BNP (**Figura 3**) (Yang et al., 1999).

La proteína cinasa dependiente de calmodulina (CaMK por *calmodulin-dependent protein kinase*), y la calcineurina también estimulan la actividad MEF-2C, pero los mecanismos subyacentes son aún desconocidos.

Las HDAC-4 y HDAC-5, pertenecientes a las HDAC tipo II, al interactuar con el dominio TAD de MEF-2C, reprimen su actividad transcripcional afectando a genes como, c-jun (Wang et al., 1999). Normalmente, Cabin-1 es un represor transcripcional de interacción con MEF-2C forman complejos multiproteicos al asociarse a HDAC1; Cabin1 recluta tanto HDACs como histona metiltransferasas (HMT, *histones methyltransferases*) para reprimir la actividad transcripcional de MEF-2C (Jang et al., 2007). Como consecuencia, la transcripción de los genes α -MHC, ANP y BNP queda reprimida. Mientras que la fosforilación del dominio MEF-2C por la CaMK-I y la CaMK-IV impide la interacción con HDAC (**Figura 3**), liberando a MEF-2C de su represión (Lu et al., 2000). Por lo tanto, para la activación previa de calcineurina se requiere el reclutamiento de NFAT y MEF-2C, esto estimula la transcripción posterior de los genes BNP y β -MHC implicados en la HC (Pikkarainen et al., 2004).

El promotor ANF, para los factores de transcripción GATA-4 y Nkx2.5, está asociado a la MEF-2C, pero este último, no contiene sitios de unión, por lo que se sugiere que GATA-4 y Nkx2.5 ejercen una acción indirecta sobre MEF-2C; sin embargo, la expresión de GATA-4 y Nkx2.5 no se modificó en embriones carentes MEF-2C. Morin y colaboradores (2000), aportaron pruebas de que MEF-2C es reclutado por GATA-4 al activar sinérgicamente ANF y otros promotores incluyendo α -MHC y α -actina cardiaca. El complejo MEF-2C/GATA-4 se asocia por la interacción física entre los respectivos dominios de unión al DNA y los dominios de transactivación que requieren ambos factores (Morin et al., 2000).

Finalmente, Cortés y colaboradores (2012), han sugerido que los FT GATA-4, NFAT y MEF-2C podrían considerarse como blancos terapéuticos, pues observaron alta expresión de estos FT en biopsias de humanos con insuficiencia cardiaca y con cardiomiopatía dilatada (Cortes et al., 2012).

1.3. MiR- 23a implicado en la HC

Los microRNA's (miRNAs o miRs) son cadenas sencillas de ácido ribonucleico (RNA, Ribonucleic acid) cortos, muy conservados y no codificados, que participan en la regulación de procesos biológicos incluyendo el desarrollo normal y patológico de los organismos (Latronico and Condorelli, 2011). Su reciente descubrimiento los ha establecido como una nueva y gran clase de ribo-reguladores de genes. Se conocen más de 50,000 miRs en

plantas, animales y virus, mientras que en el genoma humano solo se han determinado de 800 a 1000 miRs (Du and Zamore, 2005).

1.3.1. Biogénesis

Los miR's se encuentran dentro de intrones o exones de RNA no codificantes. La RNA polimerasa II (RNA Pol II), genera un RNA bicatenario en forma de horquilla, denominado **miR primario o pri-miR**, que va desde cientos a miles de nucleótidos de longitud. Posteriormente pasa a través de un complejo proteico llamado microprocesador, que consta de dos componentes, una ribonucleasa III o RNasa III llamada Drosha, y una endonucleasa con un dominio de unión al RNA de doble cadena (dsRBD, *double-strand RNA-binding domain*) denominada DGCR8. Drosha, corta en el tallo de pri-miR para liberar a un bucle de nucleótidos de aproximadamente 70 pb, formando el **miR precursor o pre-miR**. Este pre-miR es transportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina-5. Una vez en el citoplasma, el pre-miR es fragmentado por una segunda RNasa III conocida como Dicer, y la proteína de unión TRBP (*Trans-activator RNA-binding protein*), que corta el tallo y el bucle (stem-loop), liberando el **miR maduro o hebra guía** de 20-25 nucleótidos de longitud final (Du and Zamore, 2005). La hebra guía integra al complejo de inducción de silenciamiento (RISC, *RNA-induced silencing complex*), se unirá a su secuencia homóloga o blanco del RNA mensajero, a través de sitios de unión en la región de 3' no traducida (UTR, *Untranslated región*), resultando la supresión o la degradación del RNAm (Latronico and Condorelli, 2011) (**Figura 4**).

Más de 150-200 miR's se han determinado en el corazón, como reguladores de la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis celular, algunos de ellos se destacan por su implicación en las enfermedades cardiacas (Fernandes et al., 2011).

En el 2006, van Rooij y colaboradores (2006) revelaron la importancia de los miR's en la HC, al comparar la HC inducida por constricción aórtica (TAC) contra la sobreexpresión de Cn en ratones adultos, mediante el análisis de expresión por microarreglos. Hallaron similitud en aproximadamente 186 miR's expresados. De los cuales 21 miR's fueron sobreexpresados y 7 miR's sub-expresados en ambos modelos al validar por Northernblot. Estos resultados permitieron a los autores clasificar a estos miR's en 2 grupos: los pro-hipertróficos y los anti-hipertróficos (van Rooij et al., 2006). Los miR's anti-hipertróficos, por su baja expresión fueron: miR-1, miR-133a, miR-9, miR-29 y miR-98; mientras que los miR's pro-hipertróficos fueron: miR-18b, miR-195, miR-199b, miR-199a, miR-208, miR-21, miR-23a y miR-499 (Gladka et al., 2012).

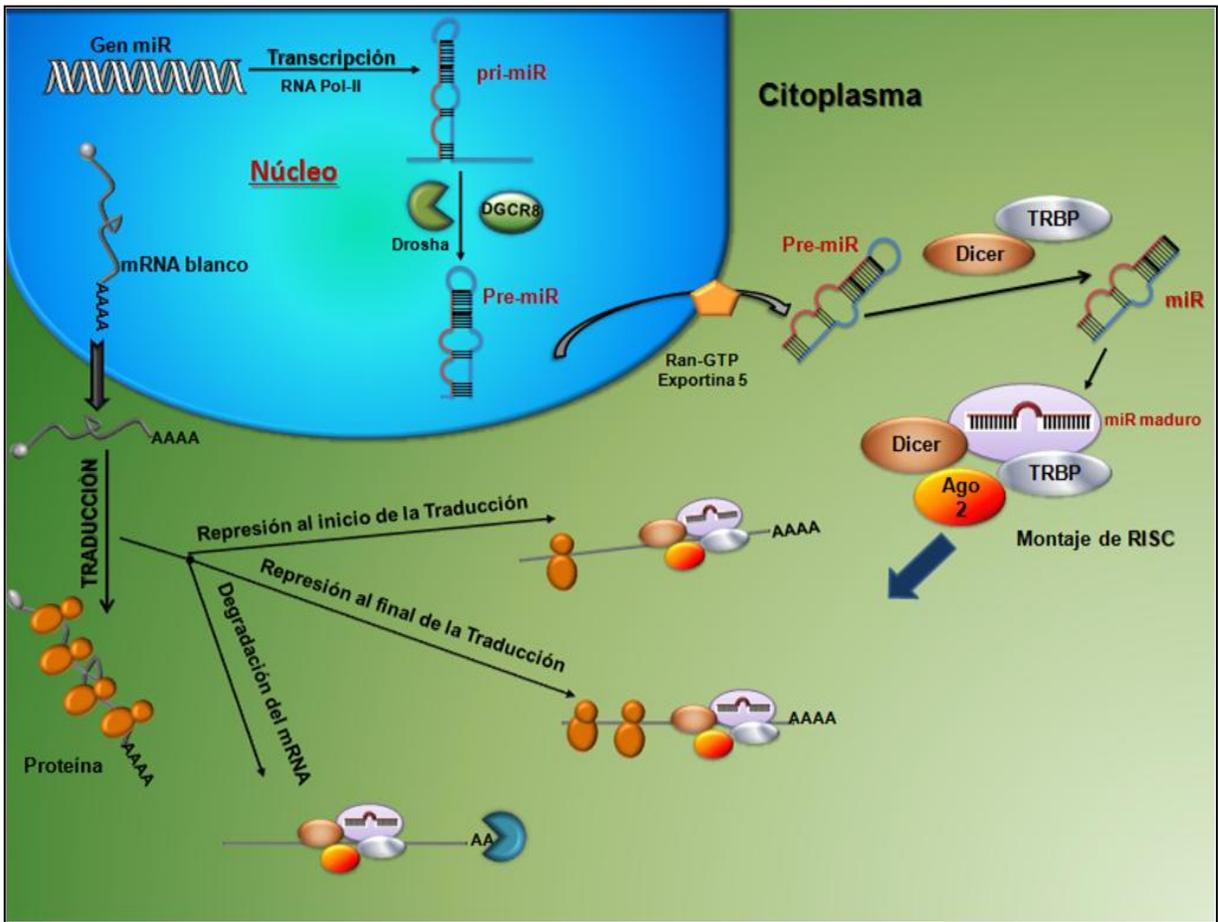


Figura 4. Biogénesis de los miRs (Lugo and Trujillo, 2009; Latronico and Condorelli, 2011)

1.3.2. MiR-23a

Análisis *in silico*, reveló que el gen que codifica para miR-23a se encuentra en el cromosoma 8 (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0017019) asociado a miR-27a, miR-24-2 y miR-3074-2 (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000571). Sin embargo, la expresión del miR-27a y miR-24-2 durante la HC, es tardía; debido a que estos miRs son regulados por otros factores transcripción de respuesta tardía (van Rooij et al., 2006); mientras que miR-23a está más cerca al sitio de unión del NFAT-c3, expresándose conjuntamente. Estudios pioneros por Lin y colaboradores (2009), revelaron que tanto en cultivos de miocitos de ratas Wistar neonatales tratadas con Aldosterona (ALDO) como con Isoproterenol (ISO), la sobre expresión del miR-23a magnifica la expresión de Cn y de NFAT-c3, ambos conocidos como marcadores de HC. Sin embargo, la inhibición de miR-23a con antago-miR en cultivos de miocitos de neonatos estimulados ALDO e ISO, no reprime la expresión de Cn y NFAT-c3,

además no desarrollan HC (Lin et al., 2009). Por su parte van Rooij y colaboradores (2006), revelaron que la inducción con PE y miR-23 a cultivos de miocitos de rata neonatal, se producen cambios dramáticos en la morfología cardíaca, debido al alargamiento de los sarcómeros, fenotipo similar a la HC de tipo excéntrica. Mientras que Cirera y colaboradores (2010), sugieren que la HC del ventrículo izquierdo (VI) generada por ligadura de la aorta en ratas adultas Wistar, está caracterizada por la sobreexpresión del miR-23a (Cirera et al., 2010). En cambio Wang y colaboradores (2011) sugieren que la sobreexpresión de miR-23a no altera la función y morfología cardíaca, al generar ratones transgénicos, por lo tanto es necesario un estímulo, como PE o endotelina 1(ET1) o TAC para el desarrollo de la HC (Wang et al., 2012).

1.4. Modelo de HC inducida con Isoproterenol

El isoproterenol, es una catecolamina sintética y agonista de los receptores adrenérgicos, la cual se une a los receptores de dicho nombre (AR), con una fuerza hasta 10 veces superior a la propia adrenalina (Rockman et al., 2002, Li et al., 2012). El isoproterenol se destaca en el estudio de la HC, por ser un método simple, reproducible, de fácil administración y baja mortalidad (Yan L, 2008; Akasu et al., 1993; Brooks and Conrad, 2009). En comparación con otras técnicas de corta duración como el estrés por nado o en aquellas que requieren de procedimientos quirúrgicos con alto riesgo de morbilidad y mortalidad, como la ligadura de la arteria coronaria (Akasu et al., 1993) o TAC (Kumar et al., 2009) o implantación de minibombas osmóticas para difundir activadores adrenérgicos (Boluyt et al., 1995). Diversos trabajos han demostrado la flexibilidad del isoproterenol. Una sola inyección subcutánea de isoproterenol (85mg/kg) en ratas adultas, provoca necrosis y fibrosis miocárdica (Lalitha et al., 2012), mientras que el tratamiento crónico (100mg/kg) superior a 2 semanas, genera, en ratas adultas, disfunción diastólica, además disminuyen los ácidos grasos y la glucosa, similares a los cambios observados en el corazón de rata después de un infarto de miocardio de gravedad moderada (Heather et al., 2009, Roy and Mainzen Prince, 2012). Por su parte, Saadane y colaboradores (1999), observaron que la cardiotoxicidad obtenida al administrar ISO con minibombas osmóticas, es capaz de generar HC 7 días después. Sin embargo 14 días posterior al tratamiento una vez retiradas las minibombas, la HC se revirtió (Saadane et al., 1999). Al respecto Friddle y colaboradores (2000), establecieron un perfil de 55 genes sobreexpresados a los 7 días posterior a la inducción y 32 genes sobreexpresados durante la regresión (14 días) empleando minibombas osmótica de isoproterenol en ratones adultos (Friddle et al., 2000). Por otro lado, dosis menores de

isoproterenol (35 mg/kg/día) suministradas por 3 días de manera subcutánea genera una cardiomiopatía dilatada, mientras que concentraciones superiores a 20 y hasta 60 mg/kg/día durante 7 días administradas intraperitoneal, favorece la respuesta Hipertrófica de tipo patológica con afectación del ventrículo izquierdo (VI) en el ratón adulto (Cha et al., 2009, Taglieri et al., 2011). Al respecto Galindo y colaboradores, (2009) por microarreglos de expresión de RNAm, demostraron que la hipertrofia generada por isoproterenol es muy similar a la hipertrofia cardiaca en humanos, ya que genes encontrados en el modelo de ISO tienen mayor correlación que la HC generada por ejercicio activo en ratones adultos de 8 semanas (Galindo et al., 2009).

Recientemente Del Olmo (2011), desarrolló un modelo de HC postnatal al administrar isoproterenol en ratones hembras gestantes, por medio de análisis morfométrico y reveló alteraciones en el VI y TIV, asociadas con los cambios de expresión de α -MHC/ β -MHC similares a la descrita en la HC de tipo patológica. Pese a dichos conocimientos aún se desconoce los mecanismo involucrados en el desarrollo de la HC postnatal.

II. Justificación

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, superando de manera notable a otras enfermedades que poseen una elevada prevalencia, como el cáncer (Kannel, 2000, Maisch et al., 2004). La HC es una respuesta secundaria irreversible del miocardio, generalmente diagnosticada en personas de edad adulta con cardiopatías, y considerada como un factor de mal pronóstico, por conducir a una insuficiencia cardíaca y muerte súbita (Galindo et al., 2009). Estudios recientes, en modelos murinos, han determinado que los miRs están asociados a los mecanismos de regulación; participando en el control del crecimiento de los miocitos, la contractilidad, la fibrosis y la angiogénesis; especialmente, en la respuesta del miocardio al estrés (van Rooij et al., 2008). El miR-23a es un miR pro-hipertrofico, y su expresión está regulada por el factor de transcripción NFATc3, marcador de HC en adulto, capaz de transmitir la señal hipertrofica, lo cual indica un importante función en el desarrollo de la patología (Lin et al., 2009).

Anteriormente, se pensaba que éste padecimiento era raro en niños, pero recientemente con el avance de tecnología y el uso de ecocardiogramas, se ha logrado detectar esta patología inclusive desde la etapa fetal. Actualmente se estima que el 29% de la población mexicana la constituyen niños y niñas de 0-14 años, de los cuales 22 por cada 10, 000 niños presentan trastornos metabólicos como diabetes y obesidad (Gonzalez-Rave et al., 2011); así mismo, de 4 a 12 por cada 1,000 recién nacidos presenta cardiopatías congénitas, ejemplo es la estenosis aortica y valvulopatías principalmente (CENETEC, 2009); y de 5 por cada 10,000 recién nacidos desarrolla alteraciones de tipo hormonal como hipotiroidismo e hipertiroidismo (ENSANUT, 2012). Todas estas patologías tienen directa o indirectamente como órgano blanco el corazón. Sin embargo, hasta el momento no se conocen sí los mecanismo que regulan la HC patológica son los mismo a la HC infantil.

III. Planteamiento del Problema

En el adulto la Hipertrofia Cardíaca es regulada por diversos receptores y proteínas de membrana, que activan vías de señalización regulados por cinasas y fosfatasa, cada uno de ellas culmina, con la activación o reprogramación de genes de etapa embrio/fetal (Silva et al., 2000). En la última década se ha determinado el papel de los microRNAs, como reguladores de la HC. Algunos modelos experimentales de HC sugieren que miR-23a juega un papel fundamental en la activación de NFAT, a su vez, NFAT favorece la unión de MEF-2C y GATA-4 al DNA, esta relación permite la expresión de α -MHC sobre β -MHC (miosina característica de etapa embrionaria). Por tal motivo, nos preguntamos SÍ, ¿La expresión de miR-23a, está asociada a los factores de transcripción NFAT, MEF2C Y GATA-4, que posiblemente están implicados en la HC etapa postnatal?

IV. Hipótesis

Sí la Hipertrofia Cardíaca en el adulto se caracteriza por la expresión del miR-23a, asociado a los FT GATA-4, NFAT y MEF-2C, entonces serán los responsables de la HC postnatal, inducida con Isoproterenol.

V. Objetivo General

Determinar el patrón de expresión de miR-23a y su relación con la activación de los factores GATA-4, NFAT y MEF-2C durante la etapa fetal/neonatal en un modelo de Hipertrofia cardíaca inducida con ISO durante la gestación.

5.1. Objetivos Particulares

- Analizar el índice de espacio intersticial en el VI de corazón de ratones tratados con ISO durante su gestación.
- Determinar el perfil de los Factores de Transcripción GATA-4, NFAT y MEF-2C y por Inmunohistoquímica y qPCR-TR.
- Establecer la relación de la expresión de miR-23a con el mensajero de los factores GATA-4 NFAT, MEF-2C y durante la evolución de la Hipertrofia Cardíaca.

VI. Materiales y Métodos

6.1. Material

6.1.1. Material biológico:

Los Ratones Balb-C (25 hembras de 6 semanas de edad, con un peso aproximado de ± 30 g y 10 machos de 7 a 8 semanas de edad con un peso ± 30 g). Se emplearon ratones machos y hembra de 7-8 semanas de edad de la cepa Balb-C. Los animales fueron criados en el Bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, manteniéndolos en ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad.

6.1.2. Anticuerpos Primarios:

- ✓ Anti-NFAT (NFAT-c1, monoclonal, dilución 1:10, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)
- ✓ Anti-GATA-4 (GATA-4, monoclonal, dilución 1:10, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)
- ✓ Anti-MEF-2C (MEF-2, monoclonal, dilución 1:10, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)

6.1.3. Anticuerpos Secundarios:

- ✓ Anti-conejo acoplado a FITC (Isotiocianato de Fluoresceína, IgG 2A, dilución 1:50, Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)
- ✓ Anti-ratón Alexa Fluor-488 (IgG 1, dilución 1:50, Invitrogen, U.S.A.)

6.1.4. Reactivos

- ✓ Isoproterenol (Sigma–Aldrich, U.S.A)
- ✓ Etanol absoluto RA (MacronChemicals, U.S.A.)
- ✓ Etanol 96% (Mena, México)
- ✓ Paraformaldehído (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- ✓ Aceite de cedro (Hycel, México)
- ✓ Cloroformo RA. (JT. Baker, U.S.A.)
- ✓ Paraplas (Tissuetek, U.S.A)
- ✓ Xilol (Merck, U.S.A)
- ✓ Hematoxilina de Harris (Merck, U.S.A)
- ✓ Eosina (Merck, U.S.A)
- ✓ DraQ-7 (Biostatus, U.K.)
- ✓ Glicerol (Sigma, U.S.A.)
- ✓ Isotiocianato de Guanidina/Fenol, Trizol (Invitrogen, U.S.A.)

- ✓ Cloroformo GM (Sigma,U.S.A.)
- ✓ Isopropanol GM (Sigma,U.S.A.)
- ✓ Etanol 75% GM (Sigma,U.S.A.)
- ✓ Agarosa 1 (ThermoScientific, U.S.A.)
- ✓ GelRedintercalante para tinción de ácidos nucleicos (Biotium, ¿)
- ✓ Agua libre de RNAsas (Institut Mérieux, Francia)
- ✓ Di-Nucleótidos tri-fosfatados, dNTP (Invitrogen,U.S.A.)
- ✓ Solución amortiguadora para Transcriptasa Reversa (BioBasic, Canadá)
- ✓ Random Hexámeros50µM (Applied BioSystem, U.S.A.)
- ✓ Transcriptasa reversa M-MoLV, (BioBasic, Canadá)

6.1.5. Oligonucleótidos

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el qPCR- Tiempo Real.

	Sentido	Anti sentido
18S	5'-TAG GGA GAG CGG CTT TTA CA -3'	5'-GAC TCA TTC ATT CCC CGA GA-3'
GATA-4	5'-GCA GCAGCAGTGAAG AGA TG -3'	5'-GCG ATG TCT GAG TGA CAG GA -3'
NFAT	5'- TCA TCC TGT CCA ACA CCA AA -3'	5'-TCA CCC TGG TGT TCT TCC TC -3'
MEF-2C	5'- CGG TGT CGT CAG TTG TAT GG -3'	5'- TGC AGT AGA TAT GCG GCT TG -3'
miR-23a	5'-GGG GUU CCU GGG GAU GGG AUU U-3'	
miR-202	5'- UUC CUA UGC AUA UAC UUC UUU G-3'	

6.1.6. Equipos

- ✓ Horno para parafina (Arsa, México)
- ✓ Olla de presión (Pressto, España)
- ✓ Agitador Orbital (Max/Becker, Luxemburgo)
- ✓ Micrótopo (Microma, España)
- ✓ Baño María (Boekel, U.S.A.)
- ✓ Microscopio estereoscópico (Stemi 2000C Zeiss, Alemania)
- ✓ Microscopio convencional (Olympus, México)
- ✓ Microscopio Confocal invertido (Zeiss, Alemania)
- ✓ Vortex (VortexGenie2, U.S.A.)
- ✓ Placa térmica (Daigger, U.S.A.)
- ✓ Espectrofotómetro (Genequant ProAmersham Biosciences, Reino Unido)
- ✓ Cabinas para PCR (Cleaver Scientific, Reino Unido)
- ✓ Centrifuga Refrigerada (Scilogex, U.S.A)

- ✓ Transiluminador (Appligene oncor, Reino Unido)
- ✓ Balanza Analítica (OHAUS, U.S.A.)

6.2. Método

6.2.1. Obtención de hembras gestantes

Se colocó un macho por cada 3-4 hembras, en cajas de polipropileno y reja metálica, con lecho de viruta esterilizada y acceso ilimitado al alimento balanceado para roedor, así como agua estéril que se administró en bebederos. Se revisó diariamente la presencia de tapón vaginal a las hembras; una vez obtenido el tapón (día cero). Los ratones hembra, fueron marcados y colocados en cajas individuales.

6.2.2. Inducción de HC durante la gestación

Posterior al 5to día de la implantación, los ratones hembras gestantes, fueron tratados con Isoproterenol (ISO) 50µg/kg/día (Iwasaki et al., 1990) y con PBS (Solución de fosfatos pH 7.3, (**Apéndice 1**) para el grupo control (CTR), durante 7 días. Los ratones hembras gestantes fueron sacrificados por dislocación cervical. De los grupos ISO y CTR, se obtuvieron fetos y neonatos de las edades [15, 17, 19 después del coito (dpc), recién nacidos (RN), 7 y 15 días (D), y 6 semanas (S)]. En todos los casos los corazones fueron lavados con PBS/SFB 2% (**Apéndice 2**) estéril y frío.

6.2.3. Inducción de HC durante la etapa adulta

Ratones machos de 7 semanas de edad, fueron tratados con Isoproterenol (ISO) 5mg/kg/día (Tshori et al., 2006), y con PBS pH 7.3, para el grupo control (CTR-AD), durante 7 días. Al 8vo día los ratones machos fueron sacrificados por dislocación cervical. En ambos casos, los corazones, obtenidos fueron lavados con PBS/SFB 2% estéril/ frío, De cada corazón se disectó la región ventricular izquierda (VI), la cual fue empleada para realizar los siguientes estudios.

6.2.4. Análisis Anatómico e Histopatológico

Los corazones de ambos grupos (ISO y PBS) en las diferentes edades; posterior a los lavados con PBS 1x estéril, fueron fijados en paraformaldehído al 3.5% (**Apéndice 4**), deshidratados en serie gradual de etanol e incluidos en parafina. Estando en etanol al 70 % se toman una serie de foto a la anatomía cardíaca mediante un microscopio estereoscópico, acoplado a una pantalla (Zeiss, Alemania). Se realizaron cortes transversales seriados del corazón en la zona ventricular a 5µm. El material fue hidratado en serie de etanol gradual.

Posteriormente, los cortes fueron teñidos con Hematoxilina-eosina (**Apéndice 6 y 7**). Se capturaron micrografías con la ayuda de una cámara digital adaptada a un microscopio óptico (Olympus, Japón) con un objetivo de 100x y ocular de 2.5. El espacio intersticial de cada micrografía fue determinado empleando el programa UTHSCSA *imageTool versión 3.0*. (Lukowski et al., 2010, Brooks and Conrad, 2009).

6.2.5. Inmunofluorescencia indirecta

Se emplearon laminillas previamente tratadas con poli-L-Lisina (**Apéndice 5**) para depositar los cortes de corazón de las diferentes edades, previamente descritas. Las muestras fueron hidratadas en serie de etanol gradual, la recuperación del antígeno se realizó, empleando solución amortiguador de citratos (Biogenex, USA) a 15 libras de presión. La inespecificidad fue reducida con el Bloqueador Universal (BioGenex, USA). Los anticuerpos primarios empleados (anti-NFAT, anti-GATA-4, anti-MEF-2C) fueron incubados toda la noche a 4°C, en una cámara húmeda. El anticuerpo secundario empleado anti-conejo o anti-ratón, según el caso, fue acoplado a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), los núcleos fueron marcados con DRAQ-7 (BioStatus,UK). Se tomaron micrografías a 40x de la pared del VI empleando un Microscopio Confocal invertido (Zeiss, Alemania) y el programa de captura Zen 2009.

6.2.6. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El ventrículo izquierdo (VI) obtenido de 3 a 4 corazones de cada una de las diferentes edades en los grupos ISO y PBS fueron empleados para obtener RNA total ,mediante el método fenólico/Trizol(Invitrogen, USA), La disgregación mecánica del tejido fue realizada empleando agujas de diferente calibre (20G, 22G y 27G).Posteriormente se adicionó cloroformo, después de la centrifugación 14,000rpm/15 min/4°C; la fase acuosa colecta, fue tratada con Isopropanol, toda la noche a -20°C. Se realizaron centrifugaciones a 14,000rpm/15 min/4°C y lavados con Etanol 75% (**Apéndice 9**). El botón resultante que contenía el RNA fue re-suspendido en agua libre de RNAs, e incubado a 55°C/10min, para eliminar DNAs. El RNA fue conservado a -70°C hasta su uso. La pureza, concentración e integridad fue valorada por espectrofotometría a 280nm/260nm de Abs y en un gel de agarosa al 2% (**Apéndice 8 y 10**). El RNA obtenido fue empleado para la síntesis de cDNA genómico usando la enzima transcriptasa reversa (BioBasic, Canadá)de los fabricantes (**Apéndice 11a y b**)o la enzima Transcriptasa reversa miR (AppliedBioSystem, U.S.A.) para los cDNA microRNA's siguiendo el protocolo de los fabricantes. En ambos casos se empleó el termociclador SureCycle 8800 (Agilent Technologies, U.S.A.) (**Apéndice12a y b**).

6.2.7. qPCR-Tiempo Real

Los primers para los genes NFAT, GATA-4 y MEF-2C (**Tabla 1**), fueron diseñados empleando el programa en línea Primers3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). A partir del cDNA sintetizado de cada una de las edades de los grupos ISO y CTR, se realizó el qPCR-RT, empleando SYBR-Green (AppliedBioSystem, U.K) como marcador de amplificación y 18S ribosomal como gen constitutivo (**Apéndice 11c**). Para la amplificación del miR-23a se utilizó el Sistema TaqMan Universal (AppliedBioSystem, U.S.A.) y como control constitutivo el miR-202 (**Apéndice 12c**).

Cada ensayo fue realizado por triplicado, se empleó qPCR-Tiempo Real, Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, U.S.A.).

6.2.8. Análisis de datos

El porcentaje de espacio intersticial, fue calculado a partir de 10 micrografías capturadas a 40X, para cada una de las diferentes edades en los grupos ISO y CTR. Los datos obtenidos fueron representados en gráfica con el promedio más su desviación estándar (SD). Se empleó la prueba de *t de Student* para determinar la diferencia entre los grupos ISO vs CTR con una $p < 0.05$ de significancia.

En el caso de las inmunofluorescencias, se determinó el porcentaje del total de núcleos positivos a cada factor, el promedio obtenido con su SD fueron mostrados en gráficas. Se empleó la prueba de *t de Student* para determinar las diferencia entre los grupos ISO vs CTR con una $p < 0.05$ de significancia.

Los Cts obtenidos del qPCR-Tiempo Real fueron analizados por el método estadístico de Livak $2\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001). Los triplicados obtenidos fueron empleados para calcular el promedio y SD; la normalización fue obtenida partir de la diferencia entre el promedio del gen problema y el promedio del gen constitutivo. Los valores obtenidos, fueron calibrados con el ΔCt del Adulto HC. Los resultados fueron presentados en gráficas.

Finalmente la correlación entre el índice de espacio intersticial, los FT y el miR-23a, fue obtenido por el análisis estadístico de correlación de Spearman y regresión lineal múltiple empleando el programa estadístico de análisis de datos *STATA SE versión 12.0*.

VII. Resultados

7.1. Análisis anatómico e histopatológico de corazón hipertróficos en etapa fetal y postnatal, tratadas con ISO durante su gestación

Con la finalidad de comprobar la presencia de la HC en los fetos y neonatos se analizaron los cambios anatómicos e histológicos. De esta manera se observó que el corazón de grupo ISO siempre fue mayor al CTR (**Figura 5**). En los cortes histológicos de corazones en etapa fetal y neonatal del grupo ISO, fue notable en el VI, la pérdida de la alineación en paralelo de las fibras (desorganización miofibrilar), debido a la falta de uniones celulares entre ellos. Además en la mayoría de los miocitos fue evidente la presencia de núcleos agrandados y excesivas vacuolas citoplasmáticas, similar a la HC de etapa adulta inducida con ISO (**Figura 6**). Cabe destacar que en el VI de ISO-6S se determinaron múltiples lesiones multifocales localizadas principalmente hacia la luz ventricular, caracterizadas por cúmulos de miofibroblastos con elevada infiltración y degeneración miofibrilar. En los individuos adultos CTR de la misma edad, se apreciaron miofibrillas en líneas, con estrechas uniones, sin acumulación de colágeno (**Figura 6**).

El análisis cuantitativo del espacio intersticial reveló, que durante la etapa fetal el grupo tratado con ISO y CTR conservó una distribución muy similar; sin embargo posterior al nacimiento fue significativamente notable la reducción del espacio intersticial en el grupo CTR. (**Gráfica 1A**, $\%_{CTR}=20.88-6.38 \pm 3.06-2.430$; $\%_{ISO}=28.896-27.76 \pm 4.99-2.27$, $\rho_{ISOvsCTR}<0.025-0.0005$). Es evidente que la administración de ISO en la primera etapa de gestación, provoca daño irreversible en el corazón, que refleja posterior al nacimiento y hasta las 6S). Sin embargo, al emplear el análisis de regresión lineal encontramos una débil asociación entre el incremento de la edad con el índice de espacio intersticial. (**Gráfica 1B**, $r_{ISO}=0.2491$; $r_{CTR}=-0.3863$).

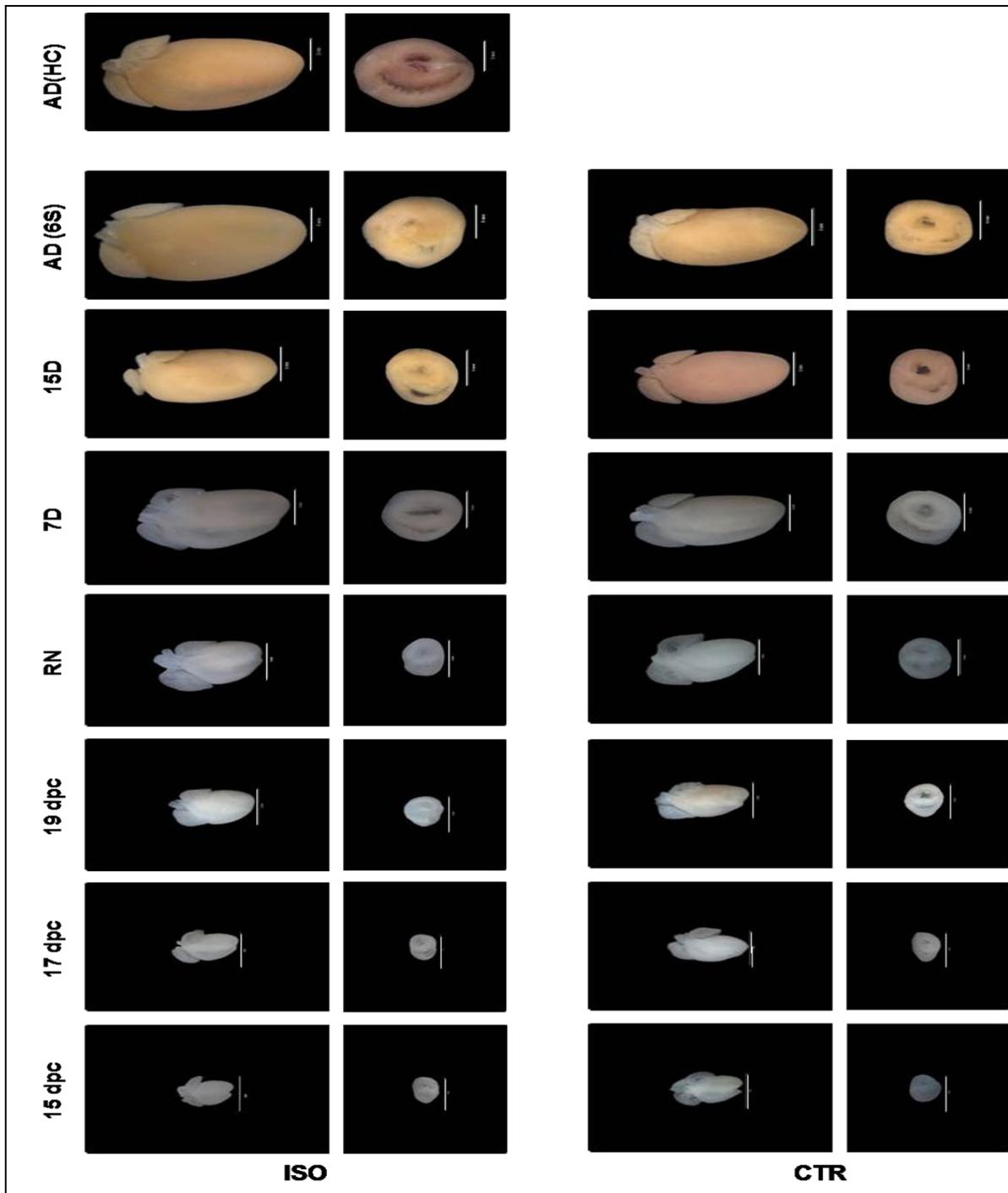


Figura 5. Análisis Anatómico de corazones de ratones tratados con isoproterenol (ISO) y Controles (CTR) durante su gestación. Se observan las diferencias en el tamaño del los corazones ISO en comparación con CTR. Además se nota el incremento en grosor de la pared del ventrículo izquierdo, Las características anatómicas del ISO 6S son similares a la de un adulto HC.

Fotos de laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.

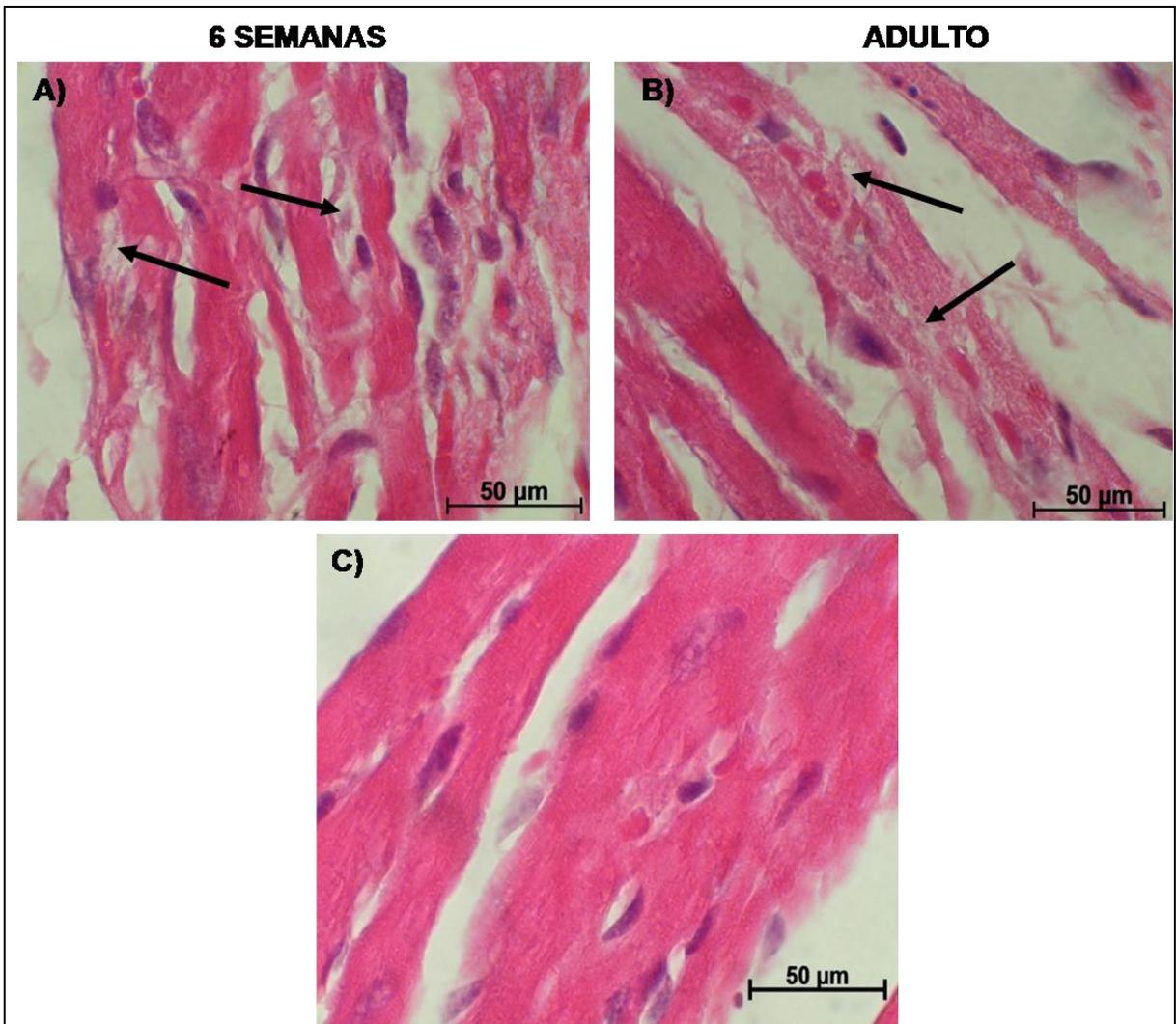
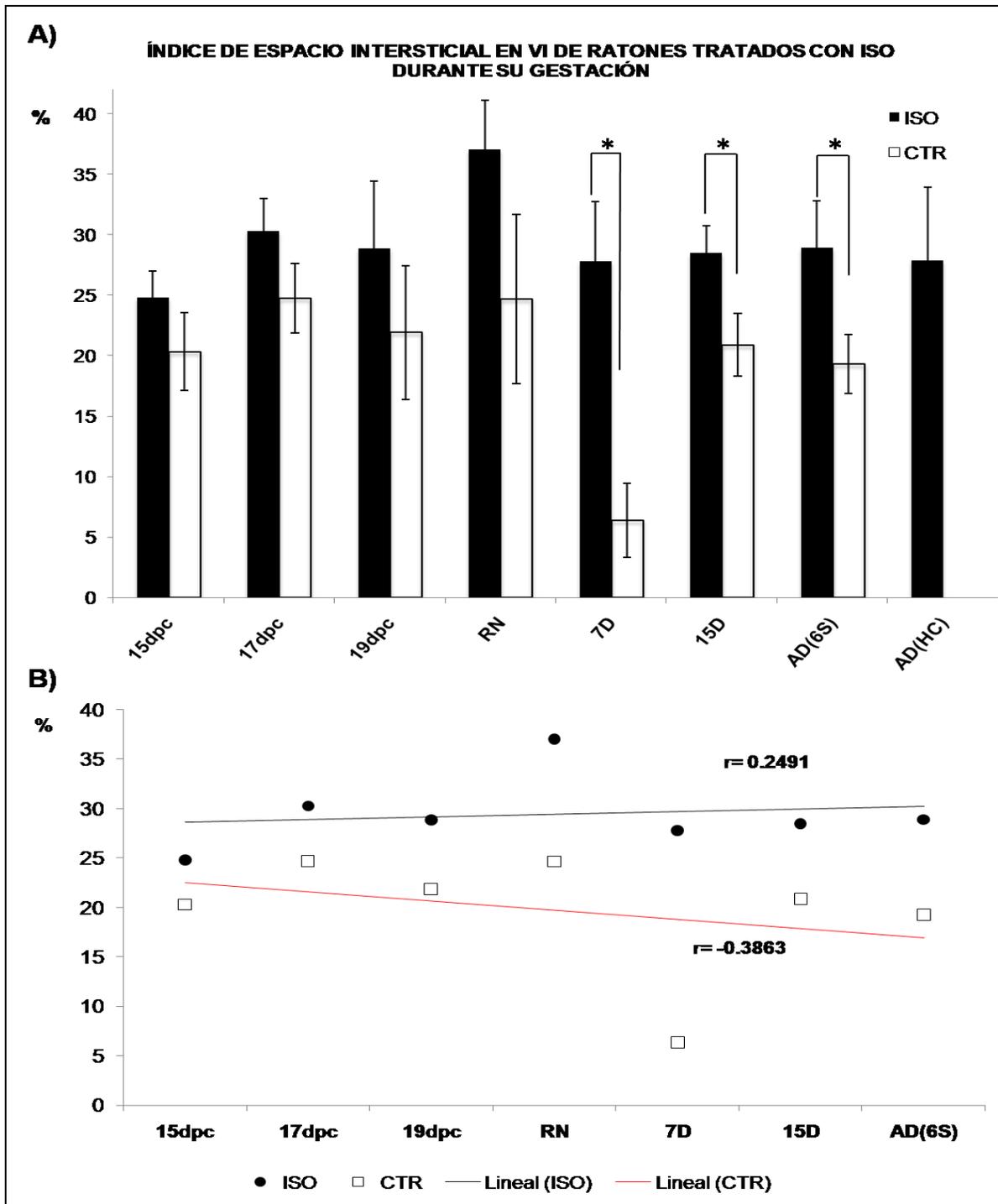


Figura 6. Análisis Histopatológico del VI en el corazón de ratones tratados con isoproterenol (ISO) durante su gestación. Micrografías del VI de corazón de ratón teñidos con HE. **A y B)** Se observa la pérdida de uniones celulares, el incremento de matriz extracelular y el daño de fibras en las micrografías de ISO 6S, similares a la del HC. **C)** Control 6S



Gráfica 1. Índice de espacio intersticial. A) Porcentaje de espacio intersticial en el VI durante las etapas de 15, 17, 19 dpc, recién nacido (RN), 7 y 15 días, 6 semanas (6S) y adulto con HC. * indica la significancia de $p < 0.05$. B) Regresión lineal, que muestra la asociación entre el porcentaje de espacio intersticial y las edades de estudio.

7.2. Factores de transcripción determinantes en la HC

Con la finalidad de determinar si en la HC del ventrículo izquierdo están presentes los FT GATA-4, MEF-2C y NFAT, se evaluó su proteína y el mensajero.

7.2.1. GATA-4

Mediante inmunofluorescencia, notamos que la expresión de GATA-4 fue nuclear tanto en el grupo CTR como el ISO (**Figura 7**). El porcentaje de proteína determinada al inicio de la etapa fetal fue muy similar entre los 2 grupos de estudio ($\%_{\text{CTR}}=89.47\%$ vs $\%_{\text{ISO}}=97.81\%$ para 15dpc, y $\%_{\text{CTR}}=96.13\%$ vs $\%_{\text{ISO}}=94.59\%$ para 17dpc), sin observar diferencias significativas entre ellos; en cambio a partir de los 19dpc hasta el 6S, fue evidente la disminución paulatina de la expresión del GATA-4 en el grupo CTR, por lo que fue notable una diferencia significativa entre los grupos. Además encontramos que la expresión de la proteína de GATA-4 a las 6S en el modelo ISO fue aproximado de 4% más ($\%_{\text{ISO}(6\text{S})}=65.56\pm 2.08$ vs $\%_{\text{ISO}(AD)}=61.80\%\pm 2.47$) que la determinada en la HC según Tshori et al. (2006), sin determinar diferencias significativa entre ellos ($\rho_{\text{AD}(6\text{S})\text{vsAD}}>0.5457$, **Gráfica 2A**). Respecto al análisis de regresión lineal, notamos que la expresión de GATA-4 tanto en el grupo CTR como ISO se reduce cuando la edad incrementa ($r_{\text{CTR}}=-0.8243$, $r_{\text{ISO}}=-0.7906$, **Gráfica 2B**) cabe destacar que el grupo ISO, al expresión de GATA-4 siempre fue mayor.

Por lo que respecta al análisis de expresión del mensajero de GATA-4, mediante el método de $2\Delta\text{Ct}$, hallamos un incremento en la expresión de GATA-4 en las edades 15, 17dpc RN y 6S del grupo ISO de 0.05 hasta 1.2 veces más que el modelo de HC de etapa adulta según Tshori et al., 2006. En cambio en el grupo CTR la mayor expresión de GATA-4 fue determinada desde la etapa 15dpc hasta 7días con un rango de 0.03 a 1.62 veces más que el control HC de etapa adulta (**Gráfica 3A**). Cabe destacar que en ambos grupos de estudio observamos al incrementar la edad de estudio, la expresión de GATA-4 disminuye moderadamente (**Gráficas 3B**, $r_{\text{ISO}}=-0.3301$ y $r_{\text{CTR}}=-0.7259$).

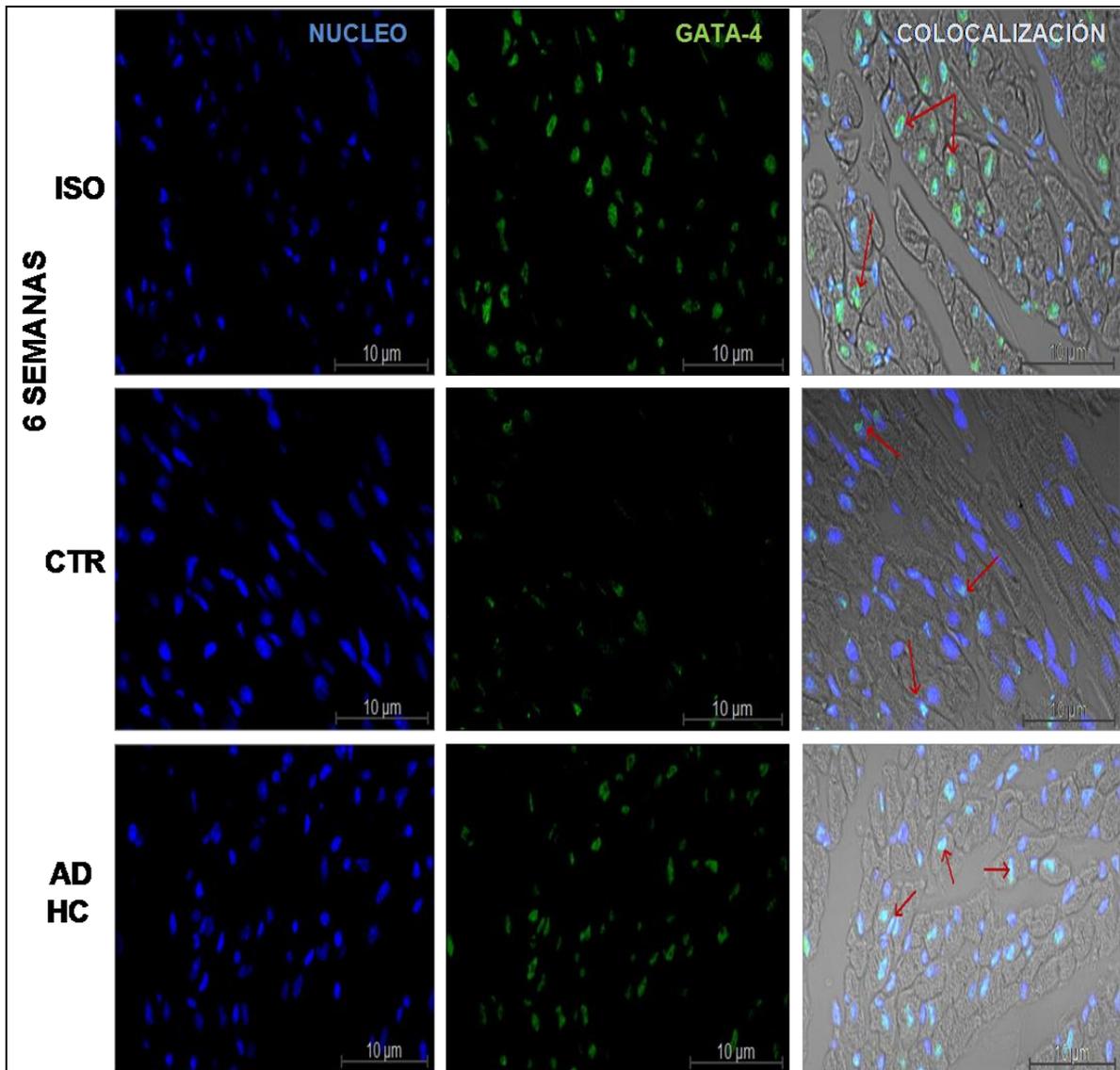
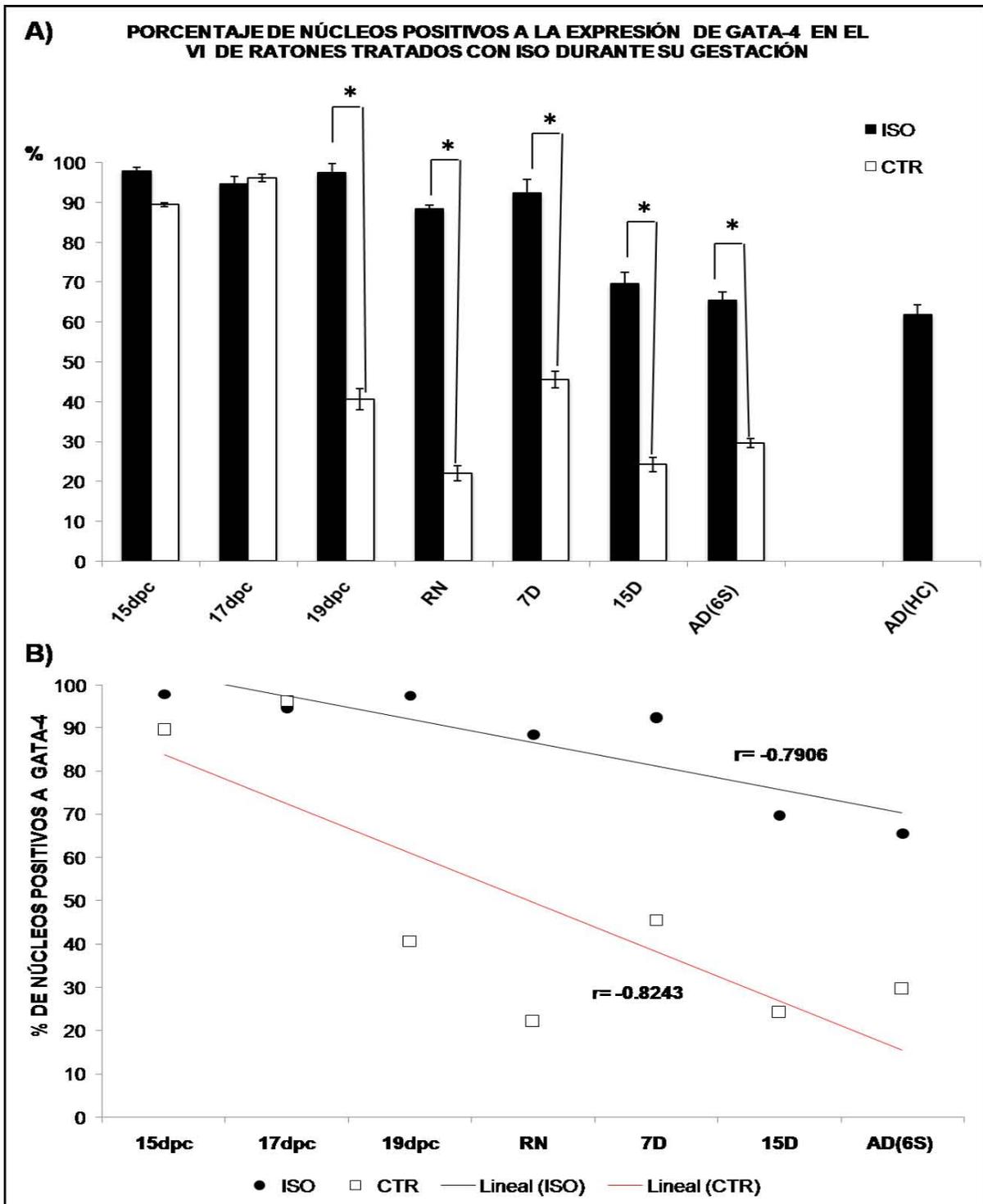
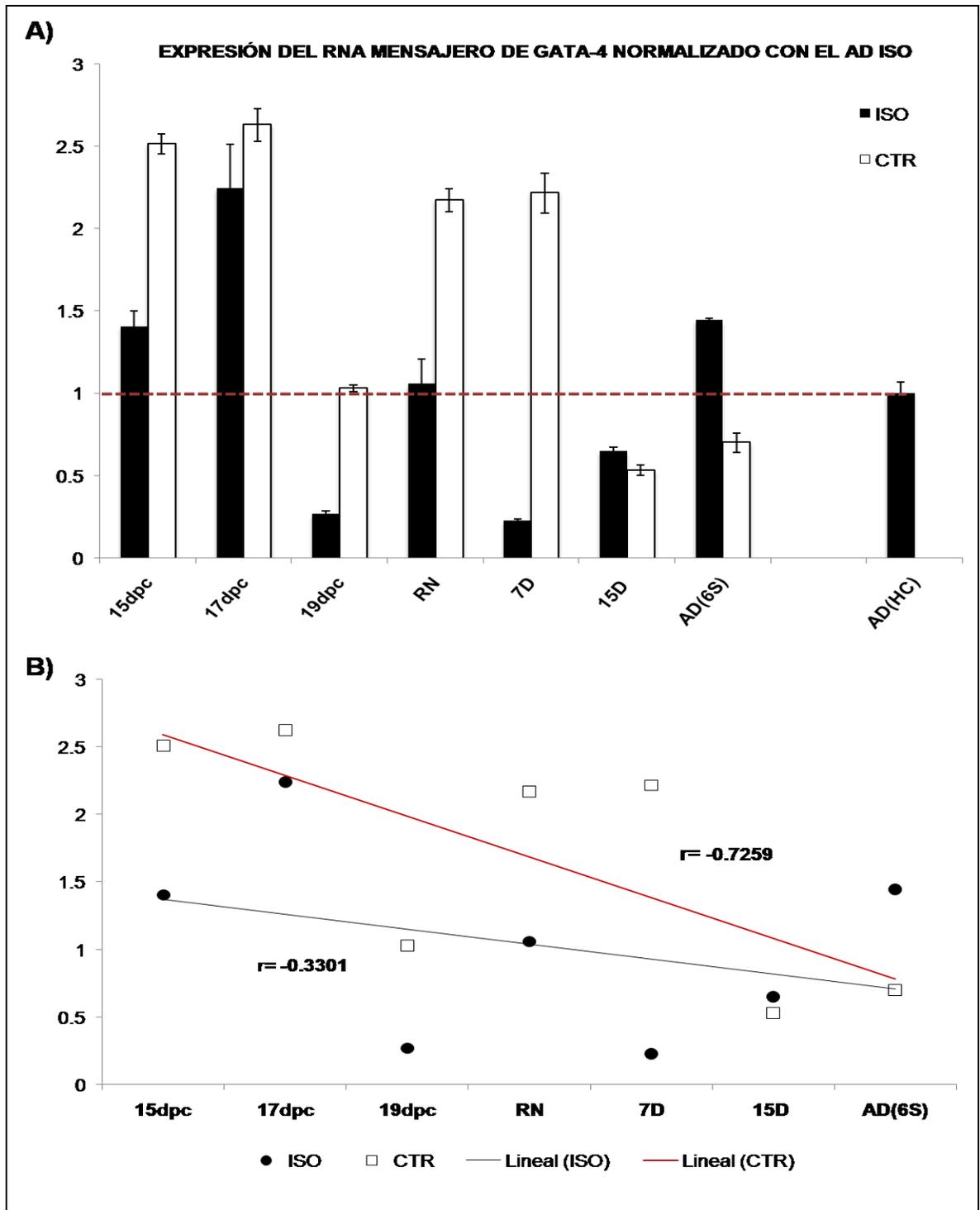


Figura 7. Inmunofluorescencia de GATA-4 en el VI del corazón de ratones tratados con ISO durante su gestación. A) Micrografías tomadas a 40X, donde se observa la expresión nuclear de GATA-4 en el VI a las 6 semanas y HC de etapa adulta azul=núcleos, verde=GATA-4 y flechas rojas colocalización.

Fotos de laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.



Gráfica 2. Análisis de la expresión proteica de GATA-4. A) Porcentaje de núcleos positivos a GATA-4 en el VI. * indica la significancia de $p < 0.05$ B) Regresión lineal, que muestra la asociación entre GATA-4 y las edades de estudio.



Gráfica 3. Análisis de la expresión relativa de mensajero de GATA-4. A) El RNA mensajero de GATA-4 en el VI fue normalizado con 18s y el HC de etapa adulta. (----) indica las edades que sobreexpresan GATA-4. B) Regresión lineal, que muestra la asociación entre RNAm de GATA-4 y las edades de estudio.

7.2.2. NFAT

Respecto al factor de transcripción NFAT (**Figura 8**) por microscopia confocal valoramos de manera cualitativa la expresión de la proteína nuclear. Encontramos que en todas las edades propuestas en este estudio existen diferencias significativas entre los grupos ISO vs CTR para la expresión de la proteína de NFAT ($p_{\text{ISO vs CTR}} < 0.0014$). Es interesante destacar que el porcentaje de núcleos positivos a NFAT en el grupo CTR siempre fue menor al determinado en el grupo ISO (rango de $\%_{\text{ISO}} = 98.77$ a 60.40 vs $\%_{\text{CTR}} = 60.76$ a 17.49). Respecto al AD 6S tratados con isoproterenol durante la gestación, obtuvimos porcentajes muy similares a al modelo HC de etapa adulta descrito por Tshori y colaboradores (**Gráfica 4A**, $\%_{\text{ISO(6S)}} = 66.23\% \pm 1.14$; $\%_{\text{ISO AD}} = 65.48\% \pm 1.64$). La regresión lineal, reveló que a mayor edad menos expresión del factor NFAT en ambos grupos (**Gráfica 4B**, $r_{\text{ISO}} = -0.9696$ y $r_{\text{CTR}} = -0.8789$).

Por lo que respecta al mensajero de NFAT, se observó un incremento de expresión en los 15dpc, 17dpc y AD 6S fue de 0.111 a 0.28 veces más que el HC de etapa adulta (**Gráfica 5A**). Por medio de regresión lineal, no encontramos asociación entre la expresión del mensajero de NFAT con la edad en ambos grupos (**Gráfica 5B**, $r_{\text{ISO}} = -0.2626$ y $r_{\text{CTR}} = -0.40$).

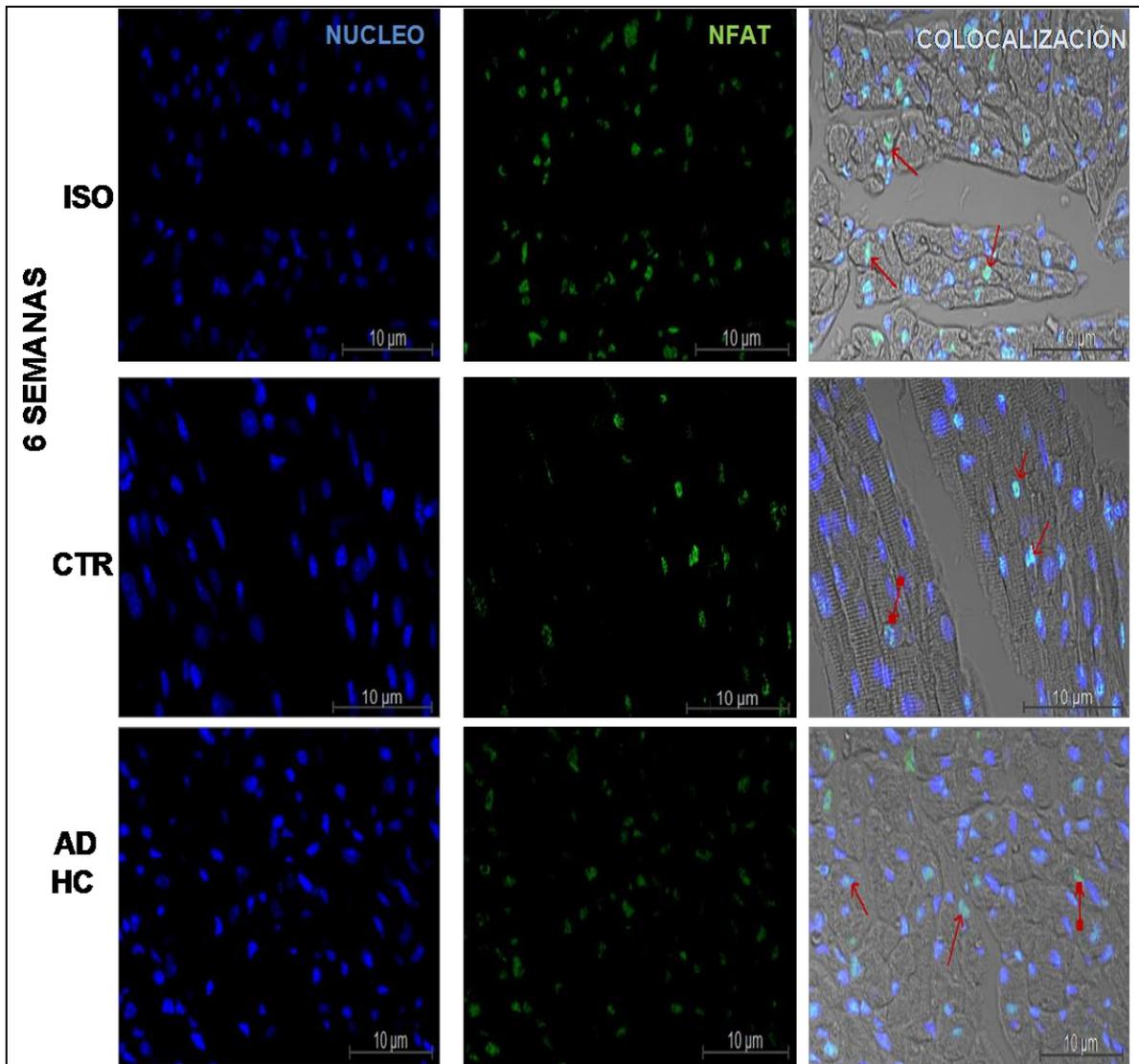
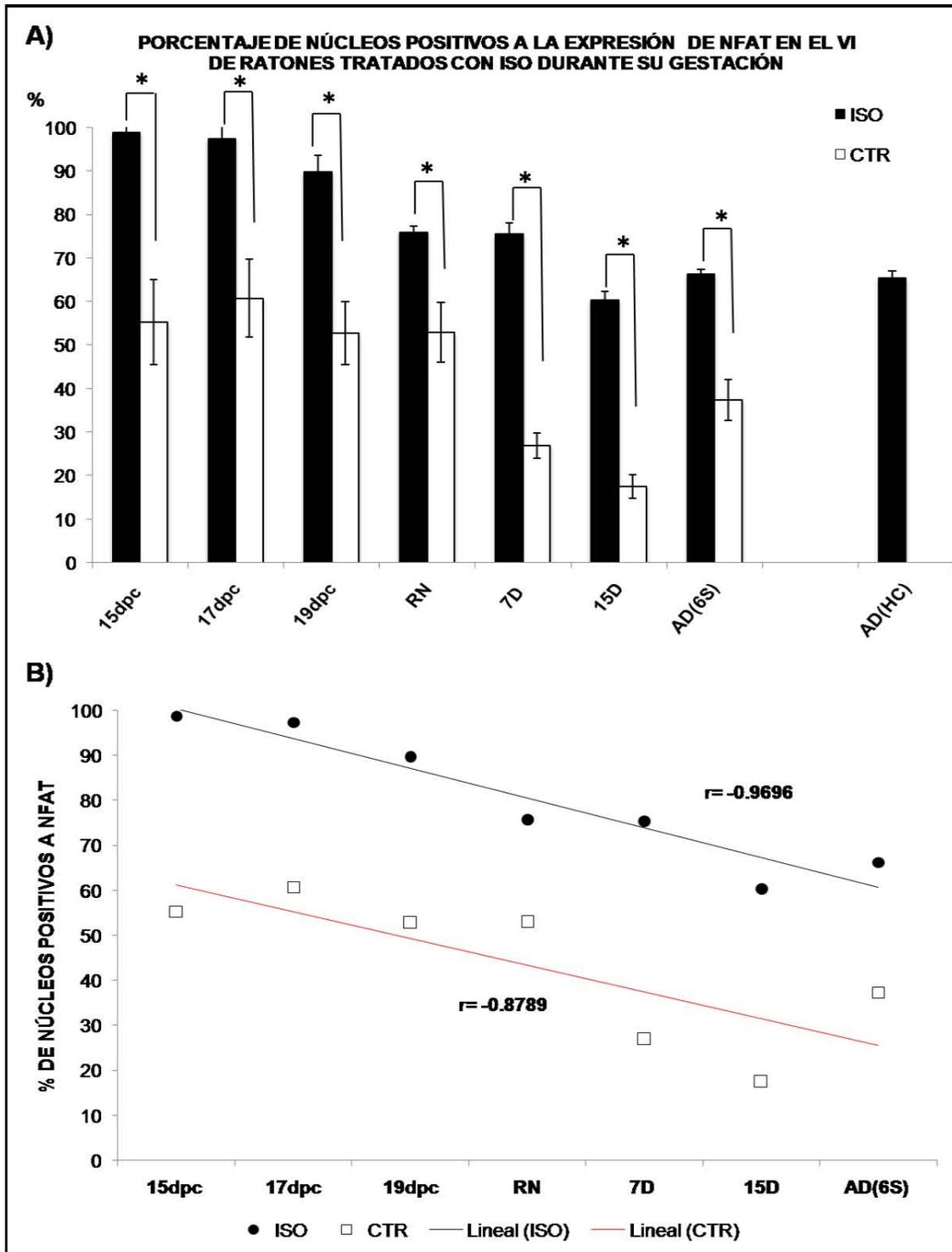
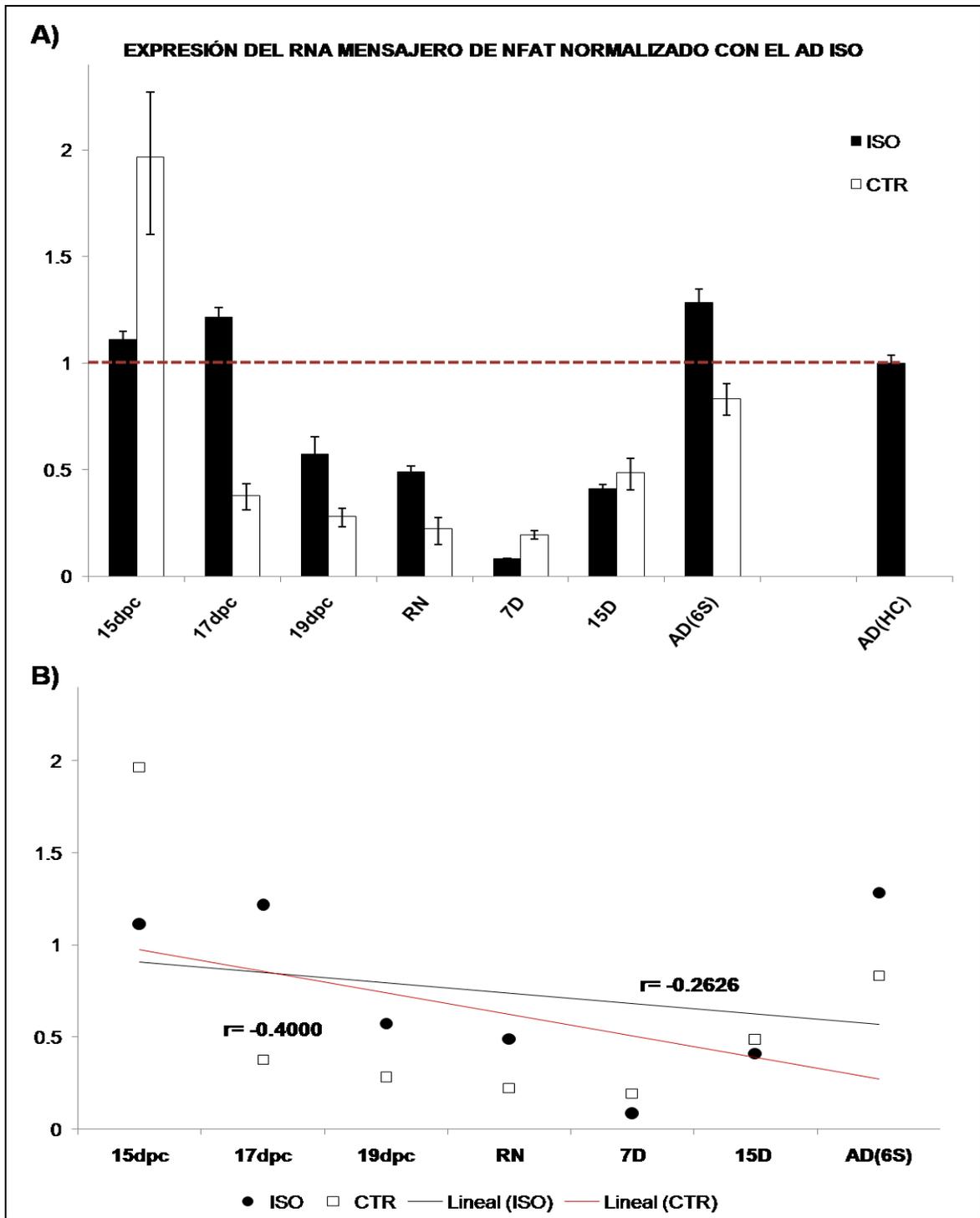


Figura 8. Inmunofluorescencia de NFAT en el VI del corazón de ratones tratados con ISO durante su gestación. A) Micrografías tomadas a 40X, donde se observa la expresión nuclear de NFAT-4 en el VI a las 6 semanas y HC de etapa adulta azul=núcleos, verde=NFAT y flechas rojas colocalización.

Fotos de laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.



Gráfica 4. Análisis de la expresión proteica de NFAT. A) Porcentaje de núcleos positivos a NFAT en el VI. * indica la significancia de $p < 0.05$ **B)** Regresión lineal, que muestra la asociación entre NFAT y las edades de estudio.



Gráfica 5. Análisis de la expresión relativa de mensajero de NFAT. A) El RNA mensajero de NFAT en el VI fue normalizado con 18s y el HC de etapa adulta. (----) indica las edades que sobreexpresan NFAT **B)** Regresión lineal, que muestra la asociación entre RNAm de NFAT y las edades de estudio.

7.2.3. MEF-2C

En el caso MEF-2C, el número de núcleos positivos determinados a lo largo del estudio en el VI fue mayor en el grupo ISO (**Figura 9**), en comparación con el grupo CTR (%_{ISO}=98.69% a 55.06% vs %_{CTR}= 37.97% a 7.65%). Cabe señalar que el porcentaje obtenido en el ISO 6S fue muy similar a la determinada en el HC AD (**Gráfica 6A**, %_{ISO(6S)}}=60±4.03 vs %_{ISO (AD)}}=59.72±4.48), sin determinar diferencia significativas entre ellos. La regresión lineal reveló que la reducción en la proteína de MEF-2C en el grupo ISO está asociada a la edad, mientras que en el grupo CTR la expresión de MEF-2C es moderadamente favorecida con el aumento de edad. (**Gráficas 6B**, $r_{ISO}=-0.9694$ y $r_{CTR}=0.6893$),

Referente al análisis del mensajero de MEF-2C, las edades con mayor expresión fueron a los 15, 17dpc y 6S en el grupo ISO con un rango de 0.05 a 0.20 veces más que el HC de etapa adulta (**Gráfica 7A**). Por lo que respecta a l CTR, en ninguna de las edades analizadas determinamos incremento de la expresión. En ambos casos la regresión lineal obtenida fue negativa (**Gráfica 7B**, $r_{ISO}=-0.3591$ y $r_{CTR}=-0.6442$).

7.3. Expresión Relativa de miR-23a

En ninguna de las edades del grupo CTR analizadas, hallamos expresión del miR-23a mayor a la determina en HC de etapa adulta (**Gráfica 8A**), sin embargo con el análisis de regresión lineal encontramos que el miR-23a incrementa de forma moderada cuando la edad también aumenta (**Gráfica 8B**). En el caso del CTR, a los 7 días la expresión del miR-23a incremento 0.71 veces más que el adulto hipertrófica (**Gráfica 8A**). Mientras que la regresión lineal evidencio una dependencia positiva con la edad (**Gráfica 8B**, $r_{ISO}=-0.6715$ y $r_{CTR}=-0.3860$).

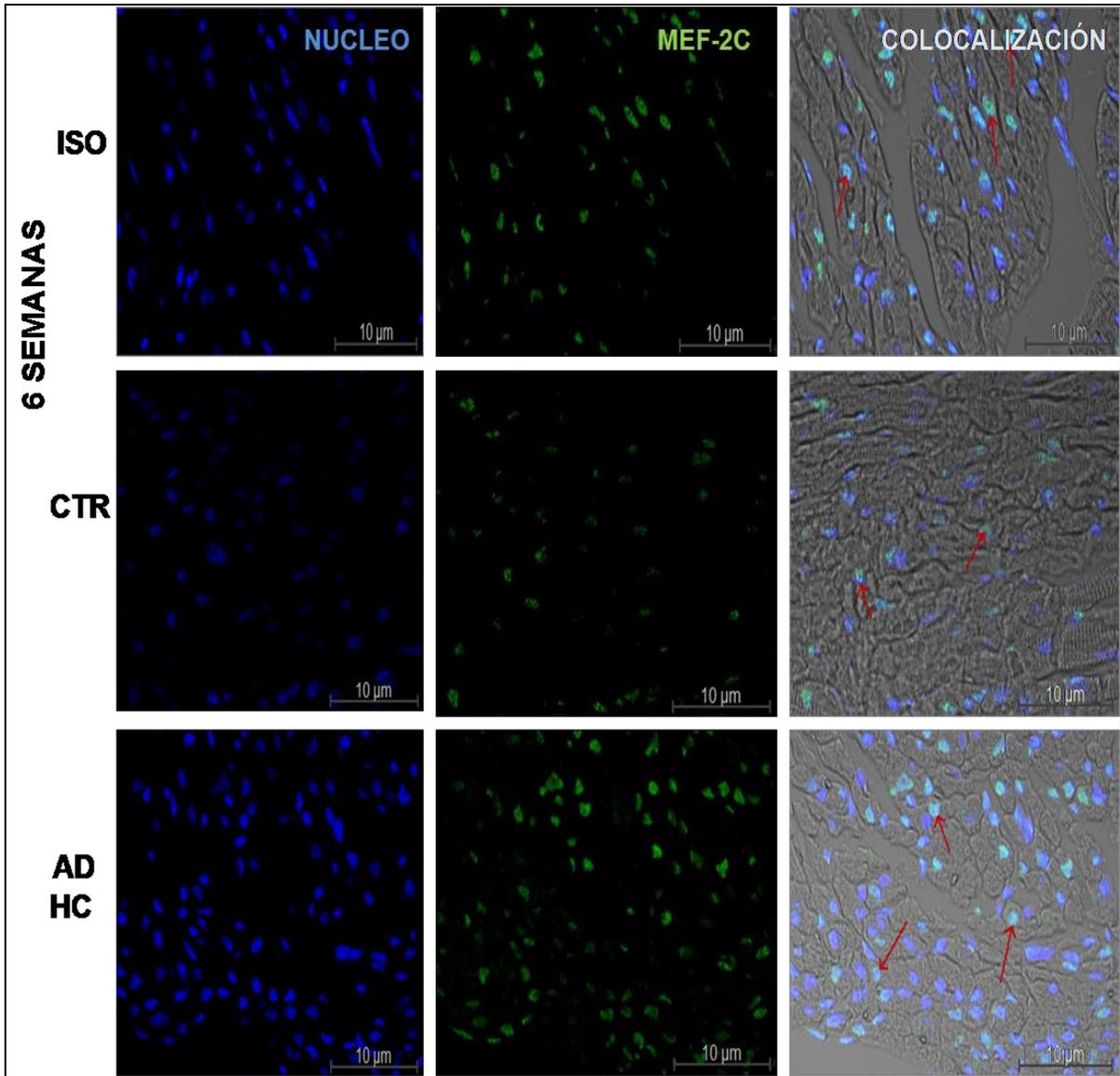
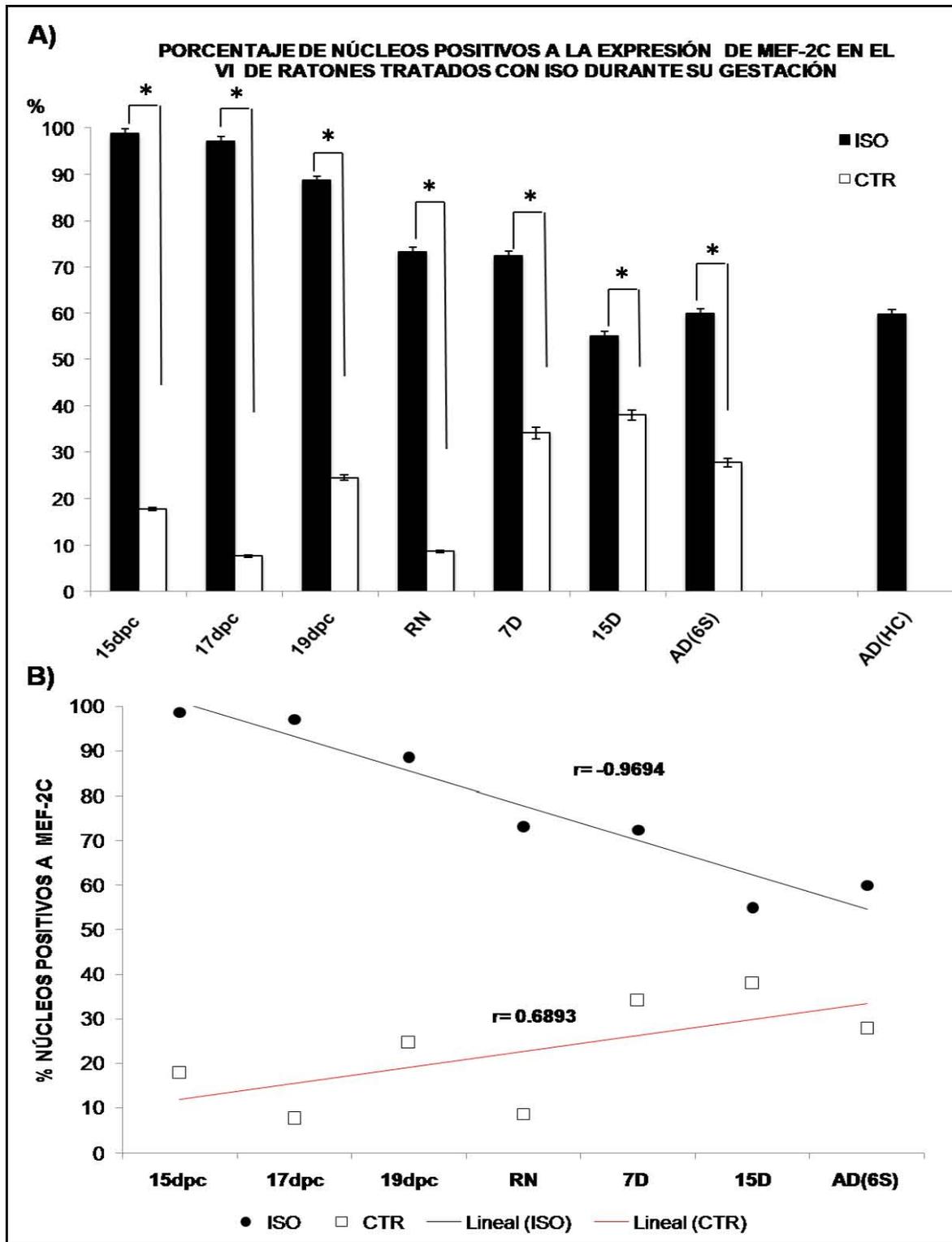
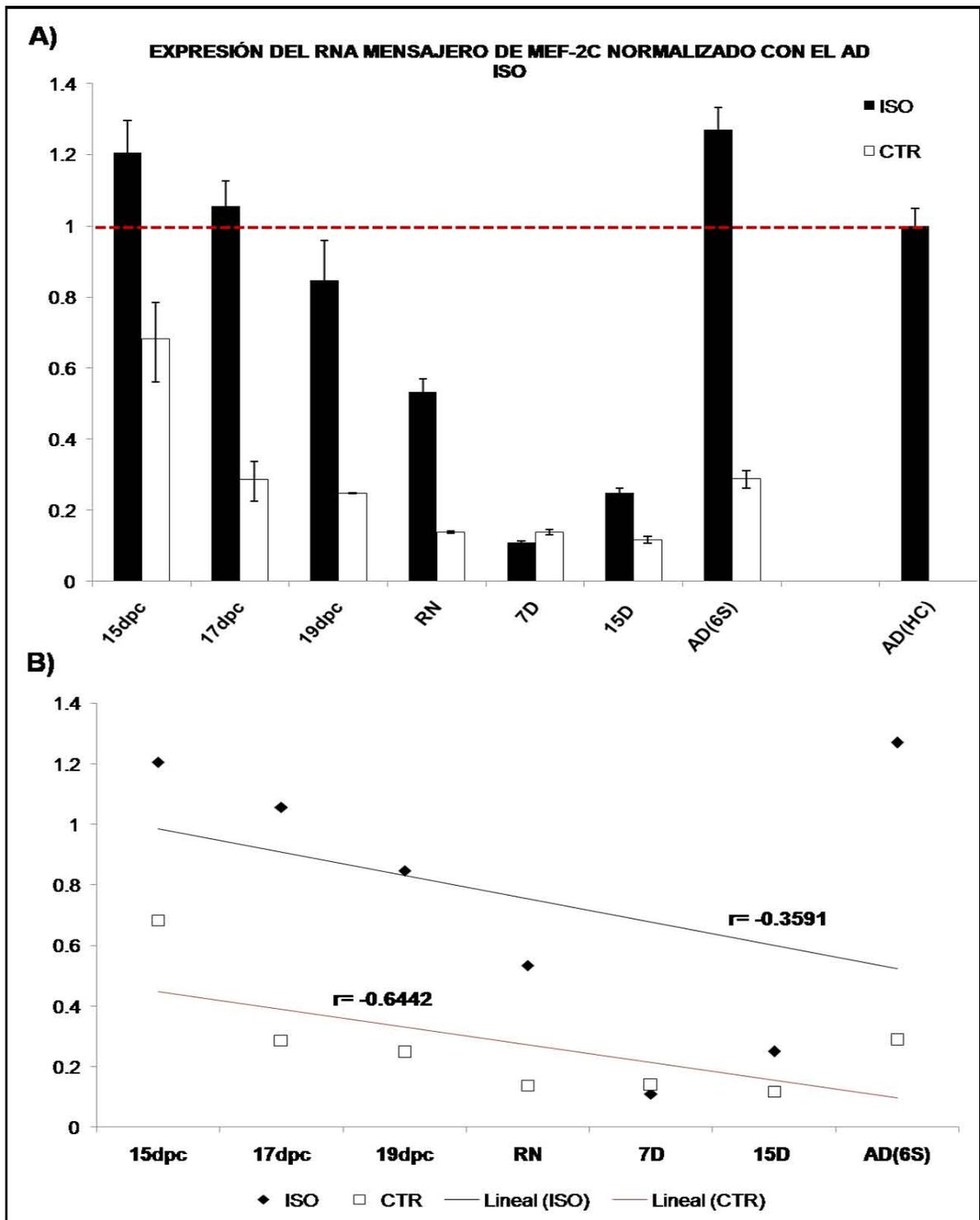


Figura 9. Inmunofluorescencia de MEF-2C en el VI del corazón de ratones tratados con ISO durante su gestación. A) Micrografías tomadas a 40X, donde se observa la expresión nuclear de MEF-2C en el VI a las 6 semanas y HC de etapa adulta azul=núcleos, verde=MEF-2C y flechas rojas colocalización.

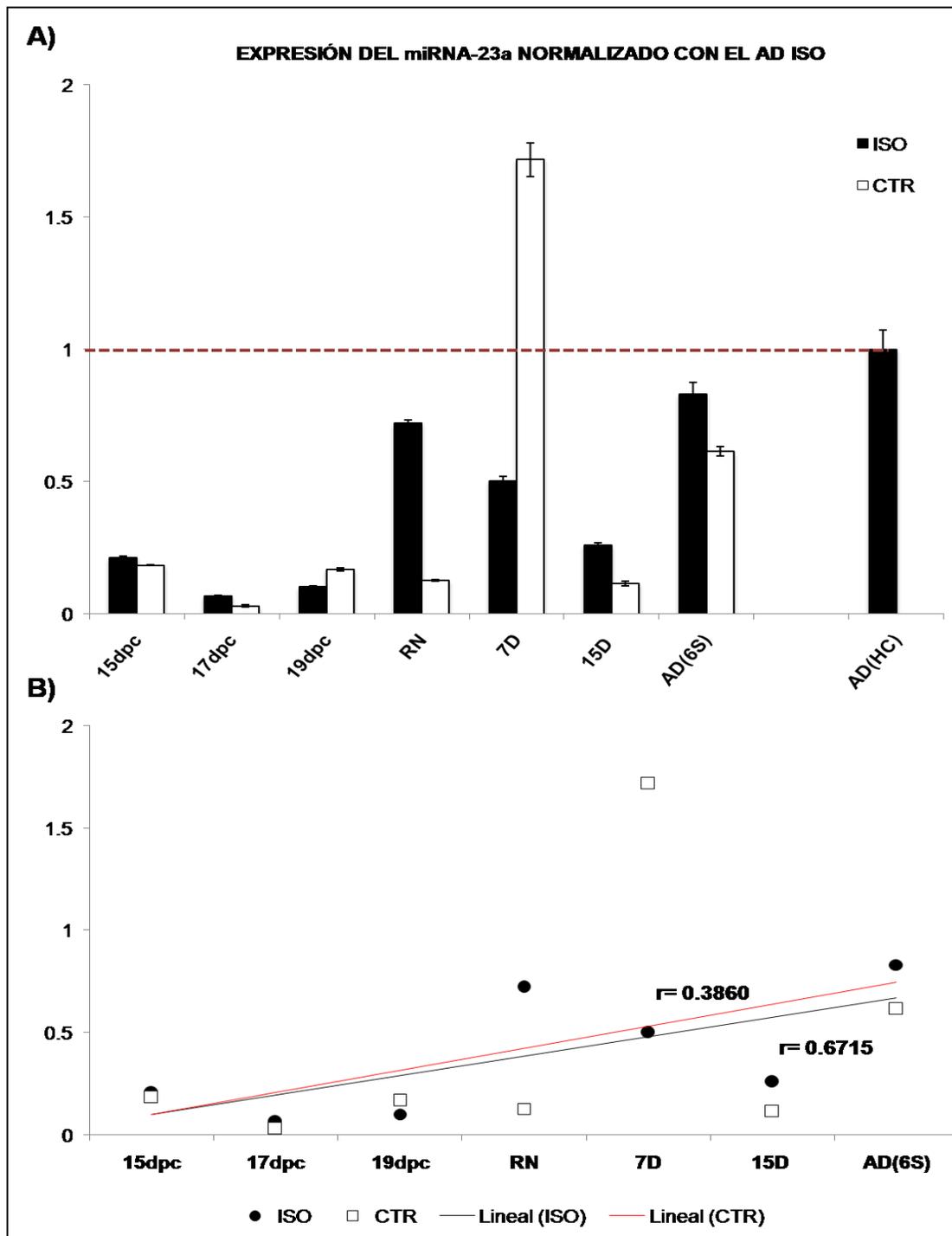
Fotos de laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.



Gráfica 6. Análisis de la expresión proteica de MEF-2C A) Porcentaje de núcleos positivos a MEF-2C en el VI. * indica la significancia de $p < 0.05$ B) Regresión lineal, que muestra la asociación entre MEF-2C y las edades de estudio.



Gráfica 7. Análisis de la expresión relativa de mensajero de MEF-2C. A) El RNA mensajero de MEF-2C en el VI fue normalizado con 18s y el HC de etapa adulta. (----) indica las edades que sobreexpresan MEF-2C. B) Regresión lineal, que muestra la asociación entre RNAm de MEF-2C y las edades de estudio.



Gráfica 8. Análisis de la expresión relativa de miR-23a. A) El RNA mensajero de miR-23a en el VI fue normalizado con miR-202 y el HC de etapa adulta. (----) indica las edades que sobreexpresan miR-23a. B) Regresión lineal, que muestra la asociación entre miR-23a y las edades de estudio.

7.4. Correlación de la expresión del miR-23a con los factores de transcripción GATA-4, NFAT, MEF-2C EN LA HC postnatal.

Con la finalidad de conocer si la expresión del miR-23a ejerce un efecto directo o inverso a la expresión de los FT en la HC postnatal, se empleo el método estadístico de Spearman. En ninguna de las edades analizadas se logro establecer dicha correlación. No obstante fue posible observar que el porcentaje de proteína GATA-4 nuclear determinada esta asocia con la proteína NFAT y MEF-2C ($Coef_{PG4vsPNT}=0.8634$, $\rho<0.0123$; $Coef_{PG4vsM2}=0.8799$, $\rho<0.009$); mientras la proteína NFAT esta correlaciona con la proteína de MEF-2C ($Coef_{PNTvsPM2}=0.992$, $\rho<0.0001$). De manera similar los RNAm también se asocian, GATA-4 con NFAT ($Coef=0.8496$, $\rho<0.0155$); y NFAT con MEF-2C ($Coef_{ISO}=0.9476$, $\rho<0.0012$; $Coef_{CTR}=0.9343$, $\rho<0.002$).

Tabla 2. Análisis de variables mediante Correlación de Spearman

		ESP. INTER.	RNAm GATA-4	RNAm NFAT	RNAm MEF-2c	PROT GATA-4	PROT NFAT	PROT MEF-2C	miR- 23a	
		ISO	ISO	ISO	ISO	ISO	ISO	ISO	ISO	
ESP. INTERS.	ISO	Coef	1							
	ISO	ρ	0							
RNAm GATA-4	ISO	Coef	0.0873	1						
	ISO	ρ	0.8523	0						
RNAm NFAT	ISO	Coef	-0.1916	0.8496	1					
	ISO	ρ	0.6807	0.0155	0					
RNAm MEF-2C	ISO	Coef	-0.2197	0.6864	0.9476	1				
	ISO	ρ	0.6359	0.0886	0.0012	0				
PROT GATA-4	ISO	Coef	-0.0684	-0.0223	-0.1075	0.0546	1			
	ISO	ρ	0.8841	0.9622	0.8186	0.9074	0			
PROT NFAT	ISO	Coef	-0.2264	0.3958	0.3963	0.5085	0.8634	1		
	ISO	ρ	0.6255	0.3794	0.3787	0.2439	0.0123	0		
PROT MEF-2C	ISO	Coef	-0.2098	0.3759	0.3637	0.4768	0.8799	0.9992	1	
	ISO	ρ	0.6516	0.406	0.4226	0.2793	0.009	0.0001	0	
miR-23a	ISO	Coef	0.4321	-0.0656	-0.053	-0.0664	-0.5579	-0.6263	-0.6354	1
	ISO	ρ	0.333	0.8888	0.9102	0.8875	0.1931	0.1323	0.1251	0

* $\rho<0.05$

VIII. Discusión

La formación y remodelación del corazón en los mamíferos, es el resultado del balance entre los procesos básicos de desarrollo (proliferación, migración, crecimiento celular y apoptosis), por lo que durante la etapa embrionaria los miocitos requieren de mayor actividad mitótica. Sin embargo, esta capacidad disminuye hasta en un 50% cuando se inicia la etapa fetal, en este periodo, es evidente un equilibrio entre la proliferación y el crecimiento, produciéndose la conocida hipertrofia. Normalmente después del nacimiento, en respuesta al incremento de carga hemodinámica, la proliferación de los miocitos cae, para dar paso al incremento en masa muscular debido al alargamiento adaptativo en el tamaño del miocito. Este resultado genera un cambio en la geometría del ventrículo izquierdo (Norris et al., 2008). No obstante, cuando la presión hemodinámica se modifica, por alteraciones de tipo estructurales, mecánicas, genéticas u hormonales, entonces el balance entre la proliferación y el crecimiento se pierde, alterando la estructura y función del corazón.

La HC de etapa adulta, está caracterizada por el aumento del tamaño del miocito, asociado a grandes focos de fibrosis intersticial, generados por la pérdida de uniones celulares, apoptosis e incremento de matriz extracelular rica en colágeno. Con la finalidad de determinar sí, la fibrosis es un proceso relevante en la evolución del HC postnatal inducida por la administración de isoproterenol durante la gestación, realizamos análisis histopatológico. Pese a que determinamos en el ventrículo izquierdo de las crías tratadas con isoproterenol durante la gestación, un mayor incremento en el espacio intersticial, respecto al grupo CTR, únicamente logramos identificar focos de fibrosis asociados hacia la luz ventricular en ratones de 6semanas (**Figura 6**). Sin embargo, en este estudio no analizamos apoptosis. Cabe destacar que después del nacimiento fue evidente un proceso de compactación en la pared del VI en ambos grupos de estudio, suponemos que se debió a los cambios hemodinámicos, tal como lo propone Norris y colaboradores (2008), pues la regresión lineal sugiere, que en el grupo control, la compactación de la pared ventricular está asociada con la madurez del ratón; en contraste, crías tratadas con isoproterenol de 6semanas fue evidente la pérdida de uniones celulares y mayor incremento del espacio intersticial, características similares a las determinadas en los modelos de HC inducida en la etapa adulta (Yan L, 2008, Akasu et al., 1993, Brooks and Conrad, 2009). Estos datos revelan que el isoproterenol, además de afectar la estructura del miocito, también puede ser capaz de regular las funciones de los fibroblastos, encargado de la síntesis de colágeno. Ya que Marijjanoski y colaboradores (1994) establecen que el intercambio de colágeno tipo III por colágeno tipo I, es primordial para el desarrollo normal del corazón, por lo que durante la

etapa fetal y parte de la neonatal; la mayoría del colágeno es de tipo III, para favorece la elasticidad, el cual poco a poco es sustituido por el colágeno tipo I, que proporciona rigidez, al microambiente del miocito (Marijjanowski et al., 1994). Posiblemente GATA-4 es el factor indirectamente responsable de controlar el tipo de colágeno, pues algunos estudios de remodelación, sugieren que la sobre expresión de GATA-4, en miofibroblasto tratados con TGF- β promueven la expresión de ANP y BNP, factores que inducen la síntesis de colágeno (Sun et al., 1994, Funck et al., 1997, Eghbali et al., 1991).

En los modelos de HC de etapa adulta, es claro el mecanismo de acción del isoproterenol, al ser reconocido por los receptores adrenérgicos, que activan la vías de señalización dependientes de Ca²⁺/CaM y de MAPK's, encargados de promover la activación de FT denominados *factores de etapa embrio/fetal* entre ellos GATA-4, MEF2C Y NFAT, responsables de la activación de genes específicos del sarcómero, como las miosinas cardiacas de tipo α y β . Con la finalidad de determinar si la HC postnatal originada por la administración de isoproterenol durante la gestación está asociada a la expresión de los factores de GATA-4, MEF-2C Y NFAT. Realizamos estudios de inmunohistoquímica y qPCR-tiempo real, de esa manera demostramos por primera vez, que el isoproterenol al ser administrado vía intraperitoneal durante la gestación no afecta la estructura anatómica del corazón (**Figura 5**), pero sí evita que la expresión de factores GATA-4, MEF-2C Y NFAT disminuyan durante la etapa fetal y postnatal, ya que en ratones carentes del estímulo, la expresión de los factores GATA-4, MEF-2C Y NFAT se reduce conforme el individuo alcanza su madurez, tal como lo observaron Pikkarainen en modelos murinos de etapa fetal y neonatal (Pikkarainen et al., 2004).

Es importante destacar, que el porcentaje de núcleos positivos a los factores GATA-4, MEF-2C Y NFAT, así como la expresión del mensajero determinado a las 6 semanas, es similar o incluso mayor al obtenido en la HC inducida en etapa adulta o en modelos clásicos de estudio. Pese a que los valores obtenidos en los HC de 6 semanas fueron superiores al CTR de la misma edad, nunca se alcanzaron valores tan altos de los factores como los observados en la etapa fetal.

Estudios recientes, señalan que en la HC de etapa adulta inducida con isoproterenol o aldosterona, existen altos niveles de expresión de miR-23a (Lin et al., 2009), basados en estos datos, nos planteamos como objetivo, determinar la expresión de miR-23a en la HC postnatal. Sin embargo, a lo largo del estudio (15dpc a 6S) no logramos observar expresión de este microRNA superior a la determinada en el hipertrófico de etapa adulta. Aunque estudios de Lin y colaboradores (2009), proponen que la sobre expresión de miR-23a está

asociado con la activación directa de la isoforma NFATc3; en el modelo de HC postnatal inducido con isoproterenol durante la gestación no hallamos correlación directa entre la expresión del microRNA, con los factores GATA-4, MEF-2C Y NFAT, ya que la expresión del miR-23a en el grupo CTR fue similar en el tiempo, al observarla en el modelo de HC. Posiblemente miR-23a, esté asociado con el alargamiento del miocito tal como lo propone Van Rooij y colaboradores (2006) en cultivos de miocitos de rata neonatal tratados con PE y miR-23a o por Cirera y colaboradores (2010) o en HC del ventrículo izquierdo (VI) de ratas adultas Wistar generada por ligadura de la Ao (van Rooij et al., 2006, Cirera et al., 2010). Sin embargo aún faltan estudios funcionales que permitan esclarecer el papel de miR-23a en la HC postnatal. Debido a que Wang y colaboradores (2012) sugieren que la sobreexpresión de miR-23a no altera la función y morfología cardíaca, en ratones transgénicos, por lo tanto es necesario un estímulo, como PE o endotelina 1(ET1) o TAC para el desarrollo de la HC (Wang et al., 2012).

IX. Conclusiones

- El isoproterenol administrado durante la gestación, induce crecimiento del ventrículo izquierdo, asociado al aumento de espacio intersticial; Sin embargo a partir de la 6ta semana es posible determinar focos de fibrosis similares a HC de etapa adulta.
- Los FT GATA-4, NFAT y MEF-2C, están asociados con el desarrollo de la HC postnatal
- La expresión de miR-23a no está relacionada con los FT GATA-4, NFAT o MEF-2C, durante la HC postnatal.

Ventajas del trabajo

Proporcionar una información importante para futuros estudios que exploren el potencial terapéutico de los miRNAs, a través de la administración sistémica de anti-miRs, como un medio biológico para el tratamiento de la hipertrofia patológica o la insuficiencia cardíaca.

X. Apéndice

Soluciones, parámetros y técnicas:

1. Solución Buffer de Fosfatos (PBS) 1x	
Cloruro de Sodio (NaCl)	8g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2g
Fosfato de sodio Dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1.44g
Fosfato de potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.24g
Agua destilada	500mL
2. <u>PBS1x/SFB 2%</u> (50 mL)	
Solución Buffer de Fosfatos (PBS) 1xesteril	49 mL
Suero Fetal Bovino	1mL
3. <u>PBS 1x/ Tween 20</u>	
Solución Buffer de Fosfatos (PBS) 1x	1L
Tween 20	500µL
4. <u>Paraformaldehído 4%</u>	
Paraformaldehído	4g
PSB 1x estéril	100mL
5. <u>Poli-L-Lisina dilución (1:10)</u>	
Poli-L-Lisina	1mL
Agua destilada	9mL
6. <u>Hematoxilina de Harris</u>	
Hematoxilina de Harris	2.5g
Sulfato de Aluminio y potasio [AlK(SO ₄) ₂]	50g
Óxido Rojo de Mercurio (HgO)	2.5g
Etanol 96%	100mL
Agua destilada	500mL

7. Eosina

Eosina Y	2g
Etanol 96%	200mL
Ácido Acético Glacial	4 gotas

8. Solución Buffer de corrida, TAE 50x

Tris- Base	242g
Ácido Acético Glacial	57.1mL
EDTA 0.5M (pH 8)	100mL
Agua inyectable o destilada	Aforar

9. Etanol 75%.....50mL

Etanol Grado Molecular	37.5 mL
Agua inyectable o libre de RNAsas	12.5 mL

10. Gel de agarosa 2%

Agarosa	2g
TAE 1x	100mL
Gel Green Intercalante	5µL

11. Protocolo de Síntesis de cDNA

a) REACTIVO	[inicial]	[Final]	Volumen
Buffer para RT	5x	1x	4µL
Random Hexámeros	600 µM		1µL
dNTP's	10 mM	1mM	2µL
Inhibidor de RNAsas	40U/µL	20U	0.5µL
Retrotranscriptasas	200U	100U	0.5µL
M-MoLV			
RNA	-	-	Xµg/µL
H ₂ O libre RNAsas	-	-	c.b.p. 20µL

b) Programa de Termociclador

Tabla 3. Condiciones para síntesis de cDNA de GATA-4, NFAT y MEF-2C.

25°C	15 min	Incubación
37°C	60 min	Alineación
70°C	10 min	Elongación
4°C	infinito	Conservación

c) Protocolo para qPCR-Tiempo Real

Master Mix	[inicial]	[Final]	Volumen final
SYBR	2x	1x	10µL
FW*	10µM	0.3µM	0.6µL
RV*	10µM	0.3µM	0.6µL
H ₂ O libre	-	-	c.b.p. 15µL
RNAsas	-	-	
cDNA	-	-	5µL

*La concentración final depende de la estandarización de cada par de oligonucleótidos.

Tabla 4. Condiciones de qPCR-Tiempo Real para GATA-4, NFAT y MEF-2C

10 min	15 seg	1 min	1 min	1min	30 seg
95°C	95°	60°	95°	60°	95°
1 ciclo	40 ciclos		1 ciclo		
Activación de enzima	Desnaturalizar	Hibridación	Curva melting		

12. Protocolo de Síntesis de cDNA de miRs

a) Master Mix I	[concentración]	Volumen
dNTP's	100mM	0.15µL
MultiScribeRT	50U/ µL	1µL
Buffer RT	10x	1.5µL
Inhibidor de RNAsas	20U/ µL	0.19µL
H ₂ O libre RNAsas	-	4.16µL

Master Mix II	<u>Volumen</u>
MMix II	7 μ L
Retrotranscriptasa Primer	3 μ L
LMMix II + 5 μ LRNA	

b) Programa de Termociclador

Tabla 5. Condiciones para síntesis de cDNA de miRs.

16°C	30 min	Incubación
42°C	30 min	Hibridación
85°C	5 min	Desnaturalización de RT
4°C	infinito	Conservación

c) Protocolo de qPCR-RT de miRs

Master Mix	Volumen
TaqMan Universal MMix II	10 μ L
TM	7.67 μ L
H ₂ O libre RNAsas	1 μ L
cDNA	4 μ L

Tabla 6. Condiciones de q-PCR Tiempo Real para miRs

2 min	10 min	15 seg	1 min	10 min
50°C	95°C	95°	60°	25°
1 ciclo	1 ciclo	40 ciclos		1 ciclo
	Activación de la enzima	Desnaturalización	Alineación	

XI. Referencias

- AKASU, T., ITO, M., NAKANO, T., SCHNEIDER, C. R., SIMMONS, M. A., TANAKA, T., TOKIMASA, T. & YOSHIDA, M. (1993). Myosin light chain kinase occurs in bullfrog sympathetic neurons and may modulate voltage-dependent potassium currents. *Neuron*, 11, 1133-45.
- AKAZAWA, H. & KOMURO, I. (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 92, 1079-88.
- BEISVAG, V., KEMI, O. J., ARBO, I., LOENNECHEN, J. P., WISLOFF, U., LANGAAS, M., SANDVIK, A. K. & ELLINGSEN, O. (2009). Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 16, 690-7.
- BOLUYT, M. O., LONG, X., ESCHENHAGEN, T., MENDE, U., SCHMITZ, W., CROW, M. T. & LAKATTA, E. G. (1995). Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *Am J Physiol*, 269, H638-47.
- BOURAJAJ, M., ARMAND, A. S., DA COSTA MARTINS, P. A., WEIJTS, B., VAN DER NAGEL, R., HEENEMAN, S., WEHRENS, X. H. & DE WINDT, L. J. (2008). NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *J Biol Chem*, 283, 22295-303.
- BROOKS, W. W. & CONRAD, C. H. (2009). Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med*, 59, 339-43.
- CARRENO, J. E., APABLAZA, F., OCARANZA, M. P. & JALIL, J. E. (2006). [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Rev Esp Cardiol*, 59, 473-86.
- CENETEC. 2009. Sitio web de Secretaría de Salud: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/>
- CIRERA, S., BIRCK, M., BUSK, P. K. & FREDHOLM, M. (2010). Expression profiles of miRNA-122 and its target CAT1 in minipigs (*Sus scrofa*) fed a high-cholesterol diet. *Comp Med*, 60, 136-41.
- CORTES, R., RIVERA, M., ROSELLO-LLETI, E., MARTINEZ-DOLZ, L., ALMENAR, L., AZORIN, I., LAGO, F., GONZALEZ-JUANATEY, J. R. & PORTOLES, M. (2012). Differences in MEF2 and NFAT transcriptional pathways according to human heart failure aetiology. *PLoS One*, 7, e30915.
- CHA, H. N., HONG, G. R., KIM, Y. W., KIM, J. Y., DAN, J. M. & PARK, S. Y. (2009). Deficiency of iNOS Does Not Prevent Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Korean J Physiol Pharmacol*, 13, 153-9.
- CHARRON, F., TSIMIKLIS, G., ARCAND, M., ROBITAILLE, L., LIANG, Q., MOLKENTIN, J. D., MELOCHE, S. & NEMER, M. (2001). Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev*, 15, 2702-19.
- DEL-OLMO, A. 2011. Expresión espacio-temporal de marcadores de hipertrofia cardiaca en ratones tratados con isoproterenol (de 15dpc a 7 días de nacidos). *Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*, Tesis de Maestría.
- DU, T. & ZAMORE, P. D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132, 4645-52.
- EGHBALI, M., TOMEK, R., WOODS, C. & BHAMBI, B. (1991). Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 795-9.
- ENNIS I. y ESCUDERO, E. (s/f). *Hipertrofia cardíaca*. Recuperado de mayo 2014. Sección hipertensión arterial, hipertrofia cardiaca. Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata-CONICET, http://www.fac.org.ar/1/publicaciones/libros/tratfac/hta_01/hipertrofia.pdf

- ENSANUT. (2012). Sitio web: <http://ensanut.insp.mx/>
- FERNANDES, T., SOCI, U. P. & OLIVEIRA, E. M. (2011). Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Braz J Med Biol Res*, 44, 836-47.
- FIEDLER, B., LOHMANN, S. M., SMOLENSKI, A., LINNEMULLER, S., PIESKE, B., SCHRODER, F., MOLKENTIN, J. D., DREXLER, H. & WOLLERT, K. C. (2002). Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11363-8.
- FRIDDLE, C. J., KOGA, T., RUBIN, E. M. & BRISTOW, J. (2000). Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6745-50.
- FUNCK, R. C., WILKE, A., RUPP, H. & BRILLA, C. G. (1997). Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol*, 432, 35-44.
- GALINDO, C. L., SKINNER, M. A., ERRAMI, M., OLSON, L. D., WATSON, D. A., LI, J., MCCORMICK, J. F., MCIVER, L. J., KUMAR, N. M., PHAM, T. Q. & GARNER, H. R. (2009). Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. *BMC Physiol*, 9, 23.
- GLADKA, M. M., DA COSTA MARTINS, P. A. & DE WINDT, L. J. (2012). Small changes can make a big difference - microRNA regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 74-82.
- GONZALEZ-RAVE, J. M., DELGADO, M., VAQUERO, M., JUAREZ, D. & NEWTON, R. U. (2011). Changes in vertical jump height, anthropometric characteristics, and biochemical parameters after contrast training in master athletes and physically active older people. *J Strength Cond Res*, 25, 1866-78.
- HABERLAND, M., MONTGOMERY, R. L. & OLSON, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, 10, 32-42.
- HASEGAWA, K., LEE, S. J., JOBE, S. M., MARKHAM, B. E. & KITSIS, R. N. (1997). cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation*, 96, 3943-53.
- HEATHER, L. C., CATCHPOLE, A. F., STUCKEY, D. J., COLE, M. A., CARR, C. A. & CLARKE, K. (2009). Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities: similar to those found in the infarcted rat heart. *J Physiol Pharmacol*, 60, 31-9.
- IWASAKI, T., TAKINO, Y. & SUZUKI, T. (1990). Effects of isoproterenol on the developing heart in rats. *Jpn Circ J*, 54, 109-16.
- JANG, H., CHOI, D. E., KIM, H., CHO, E. J. & YOUN, H. D. (2007). Cabin1 represses MEF2 transcriptional activity by association with a methyltransferase, SUV39H1. *J Biol Chem*, 282, 11172-9.
- KAICHI, S., TAKAYA, T., MORIMOTO, T., SUNAGAWA, Y., KAWAMURA, T., ONO, K., SHIMATSU, A., BABA, S., HEIKE, T., NAKAHATA, T. & HASEGAWA, K. (2011). Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. *J Cell Physiol*, 226, 248-54.
- KANNEL, W. B. (2000). Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol*, 53, 229-35.
- KATANASAKA, Y., SUNAGAWA, Y., HASEGAWA, K. & MORIMOTO, T. (2013). Application of curcumin to heart failure therapy by targeting transcriptional pathway in cardiomyocytes. *Biol Pharm Bull*, 36, 13-7.

- KOBAYASHI, S., LACKEY, T., HUANG, Y., BISPING, E., PU, W. T., BOXER, L. M. & LIANG, Q. (2006). Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *FASEB J*, 20, 800-2.
- KUMAR, P., GOYAL, M. & AGARWAL, J. L. (2009). Effect of L- arginine on electrocardiographic changes induced by hypercholesterolemia and isoproterenol in rabbits. *Indian Pacing Electrophysiol J*, 9, 45-52.
- LALITHA, G., POORNIMA, P., ARCHANAH, A. & PADMA, V. V. (2012). Protective Effect of Neferine Against Isoproterenol-Induced Cardiac Toxicity. *Cardiovasc Toxicol*.
- LATRONICO, M. V. & CONDORELLI, G. (2011). microRNAs in hypertrophy and heart failure. *Exp Biol Med (Maywood)*, 236, 125-31.
- LI, H., XIE, Y. H., YANG, Q., WANG, S. W., ZHANG, B. L., WANG, J. B., CAO, W., BI, L. L., SUN, J. Y., MIAO, S., HU, J., ZHOU, X. X. & QIU, P. C. (2012). Cardioprotective effect of paeonol and danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *PLoS One*, 7, e48872.
- LIANG, Q., DE WINDT, L. J., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., MARKHAM, B. E. & MOLKENTIN, J. D. (2001a). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 276, 30245-53.
- LIANG, Q., WIESE, R. J., BUENO, O. F., DAI, Y. S., MARKHAM, B. E. & MOLKENTIN, J. D. (2001b). The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 21, 7460-9.
- LIN, Q., SCHWARZ, J., BUCANA, C. & OLSON, E. N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*, 276, 1404-7.
- LIN, Z., MURTAZA, I., WANG, K., JIAO, J., GAO, J. & LI, P. F. (2009). miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12103-8.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LU, J., MCKINSEY, T. A., NICOL, R. L. & OLSON, E. N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4070-5.
- LUGO-TRAMPE, A., TRUJILLO-MURILLO K. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *ELSEVIER. Medicina Universitaria. Facultad de Medicina UANL. México*. 11(44):187-192.
- LUKOWSKI, R., RYBALKIN, S. D., LOGA, F., LEISS, V., BEAVO, J. A. & HOFMANN, F. (2010). Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5646-51.
- MACDONNELL, S. M., WEISSER-THOMAS, J., KUBO, H., HANSCOME, M., LIU, Q., JALEEL, N., BERRETTA, R., CHEN, X., BROWN, J. H., SABRI, A. K., MOLKENTIN, J. D. & HOUSER, S. R. (2009). CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*, 105, 316-25.
- MAISCH, B., SEFEROVIC, P. M., RISTIC, A. D., ERBEL, R., RIENMULLER, R., ADLER, Y., TOMKOWSKI, W. Z., THIENE, G. & YACOUB, M. H. (2004). Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases executive summary; The Task force on the diagnosis and management of pericardial diseases of the European society of cardiology. *Eur Heart J*, 25, 587-610.
- MARIAN, A. J. & ROBERTS, R. (2001). The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 655-70.
- MARIJANOWSKI, M. M., VAN DER LOOS, C. M., MOHRSCHLADT, M. F. & BECKER, A. E. (1994). The neonatal heart has a relatively high content of total collagen and type I

- collagen, a condition that may explain the less compliant state. *J Am Coll Cardiol*, 23, 1204-8.
- miRBase. (s/f). *Mature sequence mmu-miR-23a-5p*. Recuperado del abril 2013, de: mirbase.org/cgi-in/mature.pl?mature_acc=MIMAT0017019
- miRBase. (s/f). *Stem-loop sequence mmu-mir-23a*. Recuperado del abril 2013, de: http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000571
- MOLKENTIN, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res*, 63, 467-75.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J. R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93, 215-28.
- MORIN, S., CHARRON, F., ROBITAILLE, L. & NEMER, M. (2000). GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J*, 19, 2046-55.
- NAKAO, K., MINOBE, W., RODEN, R., BRISTOW, M. R. & LEINWAND, L. A. (1997). Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest*, 100, 2362-70.
- NCBI. (2014). *GATA4 GATA binding protein 4 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado de abril 2013. U.S. National Library of Medicine. USA. De: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2626>
- NCBI. (2014). *NFATC1 nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado de abril 2013. U.S. National Library of Medicine. USA. De: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4772>
- NIIMURA, H., PATTON, K. K., MCKENNA, W. J., SOULTS, J., MARON, B. J., SEIDMAN, J. G. & SEIDMAN, C. E. (2002). Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation*, 105, 446-51.
- NORRIS, R. A., BORG, T. K., BUTCHER, J. T., BAUDINO, T. A., BANERJEE, I. & MARKWALD, R. R. (2008). Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Ann N Y Acad Sci*, 1123, 30-40.
- OKA, T., MAILLET, M., WATT, A. J., SCHWARTZ, R. J., ARONOW, B. J., DUNCAN, S. A. & MOLKENTIN, J. D. (2006). Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res*, 98, 837-45.
- PIKKARAINEN, S., TOKOLA, H., KERKELA, R. & RUSKOAHO, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*, 63, 196-207.
- PIKKARAINEN, S., TOKOLA, H., MAJALAHTI-PALVIAINEN, T., KERKELA, R., HAUTALA, N., BHALLA, S. S., CHARRON, F., NEMER, M., VUOLTEENAHO, O. & RUSKOAHO, H. (2003). GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J Biol Chem*, 278, 23807-16.
- ROCKMAN, H. A., KOCH, W. J. & LEFKOWITZ, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415, 206-12.
- ROSENTHAL, N. & HARVEY, R. P. 2010. *Heart Development and Regeneration*, Elsevier Science.
- ROY, S. J. & MAINZEN PRINCE, P. S. (2012). Protective effects of synaptic acid on cardiac hypertrophy, dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Eur J Pharmacol*, 699, 213-218.
- PRIMER3. (s/f). Recuperado de Julio 2012, de: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
- SAADANE, N., ALPERT, L. & CHALIFOUR, L. E. (1999). Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol*, 127, 1165-76.
- SALUD SIGLO XXI. (s/f). Recuperado de mayo 2014 de blog: http://elmercaderdelasalud.blogspot.mx/2011_04_01_archive.html.

- SILVA, J. A., JR., ARAUJO, R. C., BALATU, O., OLIVEIRA, S. M., TSCHOPE, C., FINK, E., HOFFMANN, S., PLEHM, R., CHAI, K. X., CHAO, L., CHAO, J., GANTEN, D., PESQUERO, J. B. & BADER, M. (2000). Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene. *FASEB J*, 14, 1858-60.
- SUN, Y., CLEUTJENS, J. P., DIAZ-ARIAS, A. A. & WEBER, K. T. (1994). Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat. *Cardiovasc Res*, 28, 1423-32.
- SUNAGAWA, Y., MORIMOTO, T., TAKAYA, T., KAICHI, S., WADA, H., KAWAMURA, T., FUJITA, M., SHIMATSU, A., KITA, T. & HASEGAWA, K. (2010). Cyclin-dependent kinase-9 is a component of the p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 285, 9556-68.
- TAGLIERI, D. M., MONASKY, M. M., KNEZEVIC, I., SHEEHAN, K. A., LEI, M., WANG, X., CHERNOFF, J., WOLSKA, B. M., KE, Y. & SOLARO, R. J. (2011). Ablation of p21-activated kinase-1 in mice promotes isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in association with activation of Erk1/2 and inhibition of protein phosphatase 2A. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 988-96.
- TSHORI, S., GILON, D., BEERI, R., NECHUSHTAN, H., KALUZHNY, D., PIKARSKY, E. & RAZIN, E. (2006). Transcription factor MITF regulates cardiac growth and hypertrophy. *J Clin Invest*, 116, 2673-81.
- VAN ROOIJ, E., SUTHERLAND, L. B., LIU, N., WILLIAMS, A. H., MCANALLY, J., GERARD, R. D., RICHARDSON, J. A. & OLSON, E. N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18255-60.
- VAN ROOIJ, E., MARSHALL, W. S. & OLSON, E. N. (2008). Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res*, 103, 919-28.
- WANG, A. H., BERTOS, N. R., VEZMAR, M., PELLETIER, N., CROSATO, M., HENG, H. H., TH'NG, J., HAN, J. & YANG, X. J. (1999). HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol*, 19, 7816-27.
- WANG, J., PARADIS, P., ARIES, A., KOMATI, H., LEFEBVRE, C., WANG, H. & NEMER, M. (2005). Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4. *Mol Cell Biol*, 25, 9829-44.
- WANG, K., LIN, Z. Q., LONG, B., LI, J. H., ZHOU, J. & LI, P. F. (2012). Cardiac hypertrophy is positively regulated by MicroRNA miR-23a. *J Biol Chem*, 287, 589-99.
- YAN L, L.-N. W., YU-HUI X, HONG-ZL, FENG GX, YA-JUN Z, YE T, BAO-FY, CHANG QX. (2008). Arginine Inhibits Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy through Nitric Oxide and Polyamine Pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103, 124-130
- YANG, S. H., GALANIS, A. & SHARROCKS, A. D. 1999. Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors. *Mol Cell Biol*, 19, 4028-38.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y
Teratogénesis Experimental, del Hospital Infantil de México
Federico Gómez