



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**REVISIÓN BIBLIO-HEMEROGRÁFICA Y
ELECTRÓNICA DE LAS PRINCIPALES TÉCNICAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA Y EL
RNAm DE LOS RECEPTORES AT₁ Y AT₂ Y LAS
ENZIMAS ECA Y ECA2 DEL SRAA EN EL INFARTO
MIOCÁRDICO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MAYELIN THAIS ORTIZ MORALES

ASESORAS:

**Dra. Luisa Martínez Aguilar
M. En C. Jazmín Flores Monroy**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNANDEZ 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

Revisión biblio-hemerográfica y electrónica de las principales técnicas para la determinación de la proteína y el RNAm de los receptores AT₁ y AT₂ y las enzimas ECA y ECA2 del SRAA en el infarto miocárdico

Que presenta la pasante: Mayelin Thais Ortiz Morales
Con número de cuenta: 305158253 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 28 de mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	QFB. Amparo Ramos Aguilar	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

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

HMI/iac

DEDICATORIAS

A mis padres Marco y Paty quienes me dieron la vida, quienes sin esperar nada, lo dieron todo. A quienes rieron conmigo en mis triunfos y lloraron también en mis fracasos. A quienes me guiaron por un camino de rectitud y me enseñaron también que es lo mejor. Por ser el pilar de mi vida, por darme el valor y la fuerza para seguir adelante, por enseñarme a luchar, por sus palabras de aliento y apoyo, por sus consejos, por escucharme y estar para mí cuando los necesito... Gracias.

A mis hermanas Karen y Mirla por ser mi apoyo incondicional, por darme ánimos, por sus consejos, por ayudarme a levantarme cuando las cosas no van del todo bien y tener tiempo para darme una palabra para continuar, por estar siempre ahí extendiéndome la mano, porque siempre podré confiar en ustedes, por su cariño, bondad, lealtad y solidaridad.

A mi hermano Edgar por demostrarme que siempre hay motivos para continuar, que la vida te pone pruebas en el camino pero siempre puedes salir adelante, sin importar que tan grande sea el obstáculo si eres perseverante, por inspirarme con tu fortaleza y tus ganas de vivir, por no rendirte jamás! Para mí eres motivo de admiración, inspiración y orgullo, tu me demuestras a diario que si se quiere se puede!

Los Amo!!!

Maye

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM por abrirme sus puertas, por formarme y permitirme adquirir conocimientos y habilidades dentro de sus aulas y laboratorios.

A la Dra. Luisa quien fue mi profesora y asesora, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por confiar en mí, por los consejos brindados a lo largo de este tiempo y por el apoyo que me dio para realizar esta tesis.

A la QFB Amparo Ramos Aguilar, a la M. en C. Jazmín Flores Monroy, a la M. en C. Maritere Domínguez Rojas, a la QFB Rosalba Bonilla Sánchez y a la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por la disposición y el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A todas las personas que aportaron un poco o mucho en mi formación, a quienes hicieron que me apasionara por esta hermosa carrera, a quienes me dieron las herramientas para salir adelante y permitieron que con su ayuda cerrara este ciclo.

Agradezco a la DGAPA-UNAM, Proyecto PAPIIT IN212213-3 el apoyo brindado para este trabajo de tesis. Asimismo a la FES-Cuautitlán-UNAM PIAPIC30.

NUESTRO MIEDO MÁS PROFUNDO

“Nuestro miedo más profundo no es el de ser inadecuados. Nuestro miedo más profundo es el de ser poderosos más allá de toda medida.

Es nuestra luz, no nuestra oscuridad, lo que nos asusta.

Nos preguntamos: ¿Quién soy yo para ser brillante, precioso, talentoso y fabuloso? De hecho... ¿Quién eres tú para no serlo? Eres hijo del universo.

No hay nada iluminador en encogerte para que otras personas cerca de ti no se sientan inseguras.

Nacemos para poner de manifiesto la gloria del universo que está dentro de nosotros, como lo hacen los niños. Has nacido para manifestar la gloria divina que existe en nuestro interior.

No está solamente en algunos de nosotros: Está dentro de todos y cada uno.

Y mientras dejamos lucir nuestra propia luz, inconscientemente damos permiso a otras personas para hacer lo mismo. Y al liberarnos de nuestro miedo, nuestra presencia automáticamente libera a los demás.”

Marianne Williamson

ÍNDICE ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	3
3.0 ANATOMÍA DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	4
3.1 Corazón	5
3.1.1 Localización.....	5
3.1.2 Estructuras y cavidades.....	5
3.2 Circulación de la sangre	8
3.2.1 Circulación general y pulmonar	8
3.2.2 Circulación coronaria	9
4.0 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	10
4.1 Fisiología de la contracción miocárdica.....	10
4.2 Sistema de conducción del corazón	11
4.3 Electrocardiograma	13
5.0 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	15
5.1 Angiotensinógeno	16
5.2 Renina	17
5.3 Angiotensina I	19

5.4 Angiotensina II	21
5.4.1 Receptor AT ₁	22
5.4.2 Receptor AT ₂	25
5.5. Enzima Convertidora de Angiotensina	31
5.6. ECA2	35
5.7 Otras Angiotensinas.....	38
5.7.1 Angiotensina III.....	38
5.7.2 Angiotensina IV	39
5.7.3 Angiotensina (1-7)	40
5.7.4 Angiotensina (1-12)	42
5.8 Aldosterona	42
5.9 Formación de Angiotensina II.....	44
5.9.1 Vía dependiente de la ECA	44
5.9.2 Vía independiente de la ECA.....	44
6.0 INFARTO MIOCÁRDICO	47
6.1 Fisiopatología.....	48
6.2 Tipos de infarto al miocardio.....	49
6.2.1 Infarto dependiente del tamaño.....	49
6.2.1.1 Infarto transmural o Infarto con onda Q.....	50
6.2.1.2 Infarto subendocárdico o Infarto sin onda Q	50
6.2.2 Infartos de acuerdo a su localización	51
6.3 Factores de riesgo.	52
6.4 Incidencia e importancia del estudio del infarto al miocardio.	53
6.5 SRAA en el infarto al miocardio.	56

7.0 FARMACOLOGÍA DEL INFARTO MIOCÁRDICO	60
7.1 Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA)	60
7.2 Antagonistas de los receptores de Angiotensina II (ARA II)	63
8.0 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECA y ECA2 Y DE LOS RECEPTORES AT₁ y AT₂.....	65
8.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	65
8.1.1 Fundamento.....	65
8.1.2 Equipo y reactivos	66
8.1.3 Técnica.....	66
8.1.3.1 Preparación de la muestra de tejido	66
8.1.3.2 Preparación de la curva estándar.....	67
8.2 Western Blot.....	68
8.2.1 Fundamento.....	68
8.2.2 Equipo y reactivos	69
8.2.3 Técnica.....	70
8.2.3.1 Ensamblaje de la cámara de electroforesis.....	74
8.2.3.2 Preparación de geles de poliacrilamida	74
8.2.3.3 Preparación de la muestra.....	76
8.2.3.4 Electroforesis.....	76
8.2.3.5 Transferencia.....	76
8.3 Aislamiento de RNA por el método del trizol.....	79
8.3.1 Fundamento.....	79
8.3.2 Equipo y reactivos	79
8.3.3 Técnica.....	79

8.4 PCR.....	82
8.4.1 PCR punto final.....	82
8.4.1.1 Fundamento.....	82
8.4.1.2 Etapas de la PCR.....	82
8.4.1.3 Componentes de la reacción.....	84
8.4.1.4 Equipo y reactivos.....	85
8.4.1.5 Técnica.....	86
8.4.2 RT-PCR.....	87
8.4.2.1 Fundamento.....	87
8.4.2.2 Equipo y reactivos.....	87
8.4.2.3 Técnica.....	88
8.4.3 PCR en tiempo real.....	89
8.4.3.1 Fundamento.....	89
8.4.3.2 Componentes de la reacción.....	90
8.4.3.3 Métodos para detectar los amplificados.....	91
8.4.3.4 Equipo y reactivos.....	93
8.4.3.5 Técnica.....	94
8.5 Inmunohistoquímica.....	95
8.5.1 Fundamento.....	95
8.5.2 Técnica.....	96
9.0 CONCLUSIONES.....	98
10.0 REFERENCIAS.....	101

ABREVIATURAS

(P)RR	Receptor renina/prorenina
AD	Aurícula Derecha
AI	Aurícula Izquierda
Ang II	Angiotensina II
ARA II	Antagonistas de los receptores de Ang II
AT₁	Receptor de Angiotensina II
AT₂	Receptor de Angiotensina II
AV	Nodo Auriculoventricular
CE	Célula Endotelial
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECG	Electrocardiograma
GMP_c	Monofosfato de guanosina cíclica
HTA	Hipertensión arterial
iECA	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IP₃	Inositol 1, 4, 5 – trifosfato
IRAP	Receptor de aminopeptidasa regulada por insulina
MLV	Músculo Liso Vascular
NO	Óxido Nítrico
PA	Presión Arterial
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PKC	Proteínkinasa
Pro R	Prorenina
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
RM	Receptores de mineralocorticoides
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SA	Nodo sinoauricular
SOD	Superóxido Dismutasa

SRAA Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

VD Ventrículo Derecho

VI Ventrículo Izquierdo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema cardiovascular.....	4
Figura 2. Localización del corazón.....	5
Figura 3. Capas del corazón.....	6
Figura 4. Cavidades cardiacas.....	7
Figura 5. Representación esquemática de las válvulas cardiacas	8
Figura 6. Esquema de la circulación general o sistémica y menor o pulmonar.....	9
Figura 7. Potencial de acción de una célula contráctil cardiaca	11
Figura 8. Sistema de conducción del corazón.....	12
Figura 9. Componentes del electrocardiograma.....	14
Figura 10. El sistema renina angiotensina en el corazón.....	16
Figura 11. Proceso de síntesis y secreción de renina-renina inactiva (prorenina).....	17
Figura 12. Trastornos que incrementan la secreción de Renina.....	19
Figura 13. Conversión de Angiotensinógeno a Ang I.....	20
Figura 14. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. Efectos de la Ang II.....	22
Figura 15. Mecanismos celulares desencadenados con la activación de los diferentes tipos de receptores de la angiotensina en la célula endotelial y la célula de músculo liso vascular.....	24
Figura 16. ECA somática.....	32
Figura 17. ECA testicular o germinal.....	32
Figura 18. ECA plasmática o soluble.....	33
Figura 19. Estructuras del dominio de la enzima convertidora de la angiotensina somática y de la ECA2.....	36
Figura 20. Vista actual de las enzimas del sistema renina angiotensina y de sus péptidos.....	41
Figura 21. Efectos perjudiciales de la Aldosterona.....	44
Figura 22. Sistema renina angiotensina aldosterona.....	46
Figura 23. Triada diagnóstica en el Infarto Agudo al Miocardio.....	47
Figura 24. Tipos de infarto al miocardio de acuerdo a su tamaño.....	51

Figura 25. Tipos de infarto al miocardio de acuerdo a su localización..	52
Figura 26. Factores de riesgo cardiovascular.	53
Figura 27. Inhibidores del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.	64
Figura 28. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	67
Figura 29. Comparación de las técnicas Southern, Northern y Western blot.	68
Figura 30. Metodología Western blot.	78
Figura 31. Aislamiento de RNA por el método del trizol.	81
Figura 32. Representación esquemática de los distintos pasos de una reacción de PCR..	83
Figura 33. Metodología PCR punto final.	87
Figura 34. Metodología RT-PCR.	89
Figura 35. Curva de amplificación..	90
Figura 36. Método no específico.....	92
Figura 37. Método específico mediante la utilización de sondas Taqman.....	93
Figura 38. Representación del marcaje de anticuerpos de los métodos directo e indirecto.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estado de la expresión del receptor AT ₂ y su función en diferentes patologías cardiovasculares.	26
Tabla 2. Cuadro comparativo de las características de los receptores AT ₁ , AT ₂ , AT ₃ y AT ₄	29
Tabla 3. Efectos de estimulación de los receptores de Ang II.....	30
Tabla 4. Diferentes aspectos en el infarto agudo del miocardio.....	48
Tabla 5. Principales causas de defunción de mujeres en México en 2007.....	54
Tabla 6. Principales causas de defunción de hombres en México en 2007	54
Tabla 7. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por enfermedades del sistema circulatorio para cada grupo de edad en 2007	56
Tabla 8. Resultados de los ensayos clínicos en los que se ha administrado un IECA en las primeras 24 horas del infarto de miocardio	62
Tabla 9. Curva estándar de BSA	67

1.0 INTRODUCCIÓN

Durante 2007, en México, poco más de 87 mil personas fallecieron a causa de alguna enfermedad del corazón. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares, como el infarto al miocardio y el accidente cerebrovascular, cobran 17.5 millones de vidas al año en el mundo. Los ataques al corazón y los accidentes cerebro vasculares (AVC) se deben principalmente a obstrucciones, muchas veces de placas de colesterol o grasa, que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro, motivo por el que al no llegar la sangre suficiente las células mueren; también pueden ser causados por hemorragias y el proceso en las células es similar. Estas enfermedades se pueden prevenir al cambiar estilos de vida, malos hábitos y conductas de riesgo, por lo que resulta imperioso favorecer su prevención^{10, 76}.

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) consiste en una cascada de interacciones entre enzimas y sustratos que ocurren en la circulación general y culminan con la producción de Angiotensina II (Ang II), el péptido activo responsable de los efectos conocidos de éste sistema⁸¹.

El aumento de los valores tisulares de Ang II participa en la génesis de numerosos procesos cardiovasculares que aumentan la morbimortalidad del paciente, tales como la hipertensión arterial (HTA), la hipertrofia cardiaca, el remodelado cardiovascular, la nefropatía diabética, la cardiopatía isquémica o la insuficiencia cardiaca y renal. Las acciones fisiopatológicas de la Ang II son consecuencia de su interacción con los receptores AT₁ y AT₂, localizados en la superficie de la membrana de las células diana⁹⁹.

El SRAA juega un papel clave en la remodelación estructural y funcional después de un infarto al miocardio. De acuerdo con Anavekar & Solomon en 2005 la Ang II desempeña un papel fundamental en el desarrollo de remodelado del ventrículo izquierdo (VI) después del infarto al miocardio (IM). Se ha demostrado que el RNAm y los niveles de proteína para angiotensinógeno, ECA, ECA2 y los receptores de la angiotensina se

incrementan en corazones de rata después de un IM⁶⁹. Estos componentes pueden ser determinados mediante técnicas moleculares con la finalidad de conocer si éstos se modifican con la enfermedad o bien con el tratamiento farmacológico. Los cuales pueden ser biomarcadores importantes de las enfermedades cardiovasculares. Por lo que en esta tesis se recopilará información de varios componentes del SRAA en el infarto miocárdico mediante una revisión biblio-hemerográfica y electrónica para conocer las técnicas de biología molecular aplicadas para su cuantificación.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Recopilar información de varios componentes del SRAA en el infarto miocárdico mediante una revisión biblio-hemerográfica y electrónica para conocer las técnicas más utilizadas de biología molecular aplicadas para su cuantificación.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ∅ Establecer los principios básicos anátomo-fisiológicos del sistema cardiovascular.

- ∅ Determinar la participación del sistema renina angiotensina aldosterona en el sistema cardiovascular.

- ∅ Realizar la integración de los conceptos de infarto miocárdico, tratamiento farmacológico y la participación del sistema renina angiotensina aldosterona en esta enfermedad.

- ∅ Analizar las técnicas aplicadas para la cuantificación de las enzimas ECA y ECA2 así como de los receptores AT₁ y AT₂.

3.0 ANATOMÍA DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR

El sistema cardiovascular está formado por el corazón que actúa como una bomba que impulsa la sangre para que circule por todo el organismo, y los vasos sanguíneos que son los encargados de transportar la sangre y distribuirla por todos los tejidos (**Figura 1**). De esta manera el sistema cardiovascular queda constituido por dos subsistemas: el sistema cardíaco y el sistema vascular. La principal función del sistema cardiovascular es bombear la sangre a todas las partes del cuerpo para transportar nutrientes, agua y gases que llegan al cuerpo desde el exterior, hormonas secretadas por las glándulas endocrinas hasta sus células diana, anticuerpos, glóbulos rojos entre otros, además de eliminar productos de desecho^{31, 94, 104}.

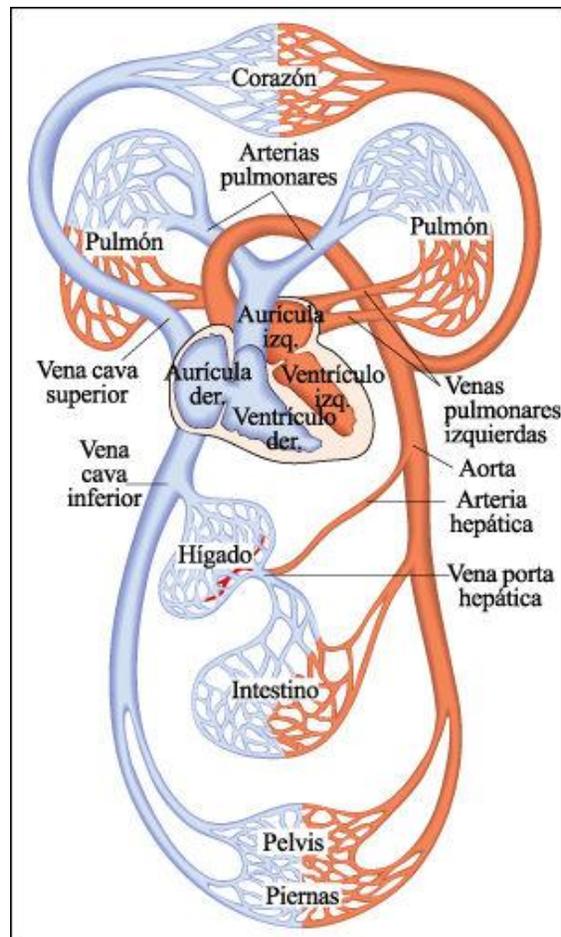


Figura 1. Sistema cardiovascular⁴⁴.

3.1 Corazón

3.1.1 Localización

El corazón es una estructura cónica relativamente pequeña de un tamaño aproximado de unos 12 cm de longitud, 9 cm de anchura y 6 cm de grosor máximo. Su masa promedio es de 250 y 300 g en mujeres y varones adultos respectivamente. Se localiza en el mediastino anterior, entre ambos pulmones, apoyado encima del diafragma y por detrás del esternón. La mayor parte del volumen del corazón está en el hemitórax izquierdo (**Figura 2**). Es un órgano muscular hueco con forma de cono invertido. La punta cardíaca constituye el vértice, se dirige hacia abajo, adelante y hacia la izquierda, y la base está localizada hacia arriba, atrás y hacia la derecha^{31, 94, 104}.

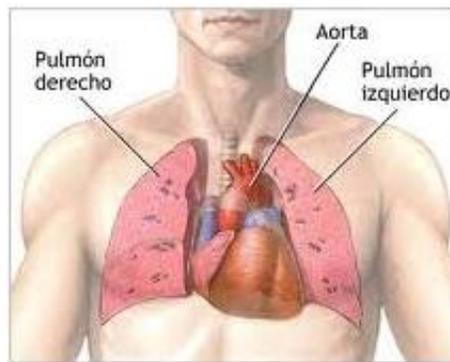


Figura 2. Localización del corazón¹.

3.1.2 Estructuras y cavidades.

La membrana que rodea el corazón y lo protege es el pericardio, el cual impide que el corazón se desplace de su posición en el mediastino, al mismo tiempo que permite libertad de movimiento suficiente para su contracción rápida y fuerte, consta de dos partes principales el pericardio fibroso y el pericardio seroso. El pericardio fibroso es el superficial y se compone de tejido conectivo denso e irregular resistente, previene el estiramiento excesivo del corazón, lo protege y lo fija en el mediastino. El pericardio seroso es la porción profunda y es una membrana más delgada y delicada que forma una doble capa alrededor del corazón. La capa parietal externa del pericardio seroso se fusiona con el pericardio fibroso. Su capa visceral interna, también llamada epicardio se

inserta en la superficie del corazón. Entre estas dos capas, está una delgada película de líquido seroso. Éste líquido pericárdico es una secreción resbalosa de las células pericárdicas que reduce la fricción entre las membranas resultante de los movimientos cardiacos. La pared del corazón está formada por tres capas, epicardio, miocardio y endocardio. El epicardio es la capa externa, transparente y delgada de la pared cardiaca, se compone de mesotelio y tejido conectivo delgado, que confiere textura lisa y resbaladiza a la superficie externa del corazón. El miocardio o capa intermedia, también llamado músculo cardiaco abarca gran parte de la masa cardiaca y de él depende la función de bombeo del órgano. El endocardio es la capa interna y consta de endotelio delgado que recubre una capa delgada de tejido conectivo, constituye un revestimiento liso de las cavidades y válvulas cardiacas, está en contacto directo con la sangre y ayuda a impedir que se coagule en las cavidades cardiacas (**Figura 3**)^{31, 104}.

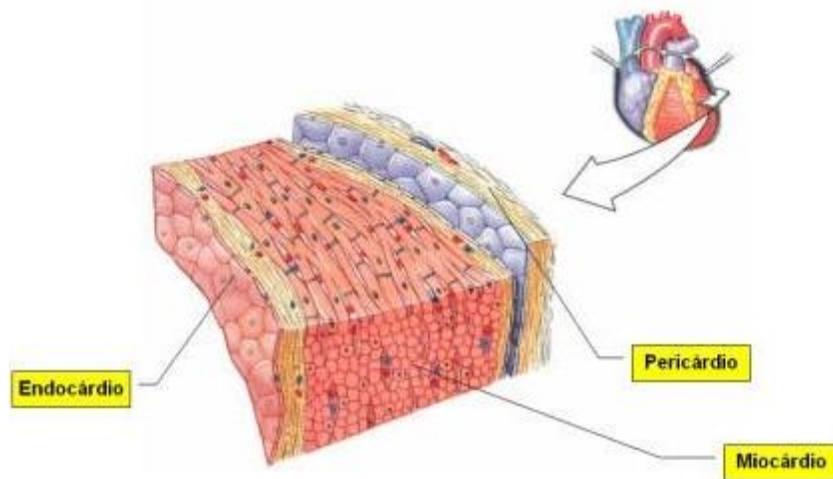


Figura 3. Capas del corazón¹⁶.

El interior del corazón está ocupado por cuatro cavidades cardíacas: dos aurículas (derecha e izquierda) y dos ventrículos (derecho e izquierdo) (**Figura 4**).

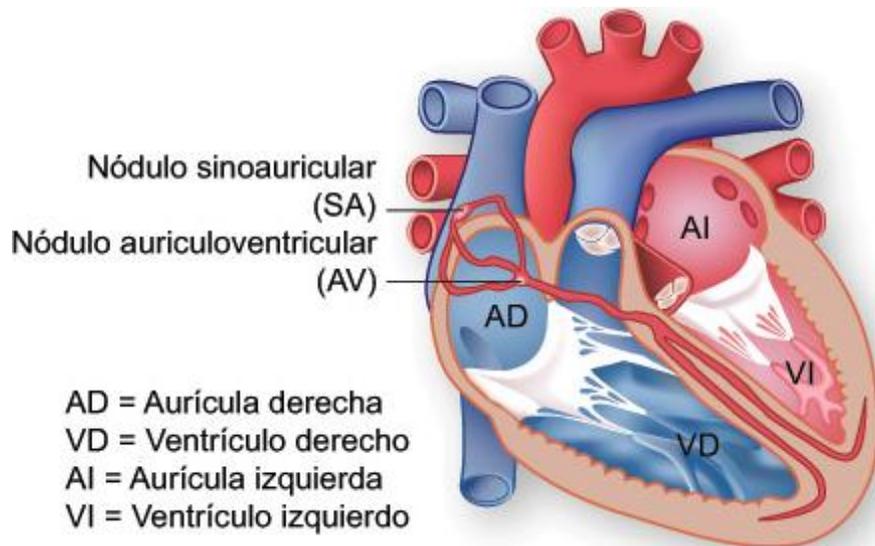


Figura 4. Cavidades cardíacas¹⁰³.

Las aurículas son cavidades de baja presión que poseen paredes delgadas. La aurícula derecha (AD) forma el borde derecho del corazón y recibe sangre de las venas cava superior e inferior y del seno coronario. Se encuentra comunicada con el ventrículo derecho (VD) por medio de la válvula auriculoventricular denominada tricúspide. Las válvulas del corazón permiten que el flujo sanguíneo sea unidireccional. Las aurículas están divididas por el tabique interauricular. La aurícula izquierda (AI) recibe la sangre de las cuatro venas pulmonares y se comunica con el ventrículo izquierdo (VI) a través de la válvula tricúspide o mitral. Los ventrículos son cavidades de alta presión, poseen paredes más gruesas que las aurículas y envían sangre a las grandes arterias. El ventrículo derecho (VD) está situado en la parte anterior derecha del corazón, en el cuál la sangre fluirá a través de la válvula semilunar pulmonar hacia la arteria pulmonar. El tabique interventricular es la división que separa los ventrículos derecho e izquierdo. El ventrículo izquierdo (VI) forma el vértice del corazón, la sangre pasa de éste por la válvula semilunar aórtica a la aorta ascendente, donde desde ésta, una parte fluye a las arterias coronarias que se ramifican de la aorta y llevan la sangre a la pared cardíaca, mientras que el resto de la sangre pasa al cayado de la aorta y la aorta descendente por medio de las cuales se lleva la sangre hacia todo el cuerpo (**Figura 5**)^{31, 94, 104}.

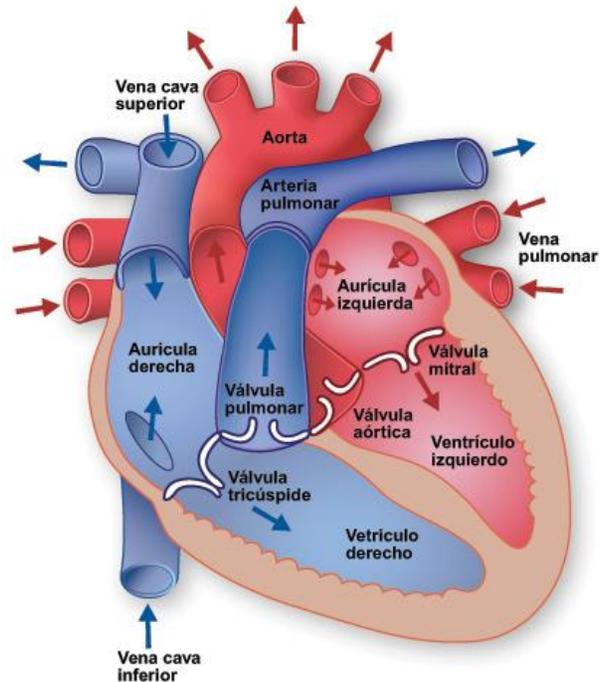


Figura 5. Representación esquemática de las válvulas cardíacas¹⁰².

3.2 Circulación de la sangre

3.2.1 Circulación general y pulmonar

Por cada latido, el corazón bombea sangre en dos circuitos cerrados, la circulación general y pulmonar. La circulación general comienza en el VI el cual recibe sangre oxigenada de los pulmones que será bombeada hacia la aorta, por el sistema arterial se conduce hasta los capilares llegando a todos los tejidos. En ellos se tiene lugar el intercambio de nutrientes y gases, la sangre deja oxígeno (O_2) y recibe dióxido de carbono (CO_2), transformándose en sangre pobre en O_2 , a esta sangre se le denomina desoxigenada por poseer menos O_2 que la sangre que circula desde los pulmones a los tejidos. Ésta se recoge en el sistema venoso que confluye en la vena cava inferior y en la vena cava superior, hasta llegar a la aurícula derecha. El VD es la bomba de la circulación pulmonar, el cual recibe la sangre desoxigenada proveniente de la circulación general y la envía hacia las arterias pulmonares. En los capilares pulmonares la sangre pierde el CO_2 que se exhala y recibe O_2 .

La sangre oxigenada fluye por las venas pulmonares hacia la aurícula izquierda (**Figura 6**)³¹,

94, 104

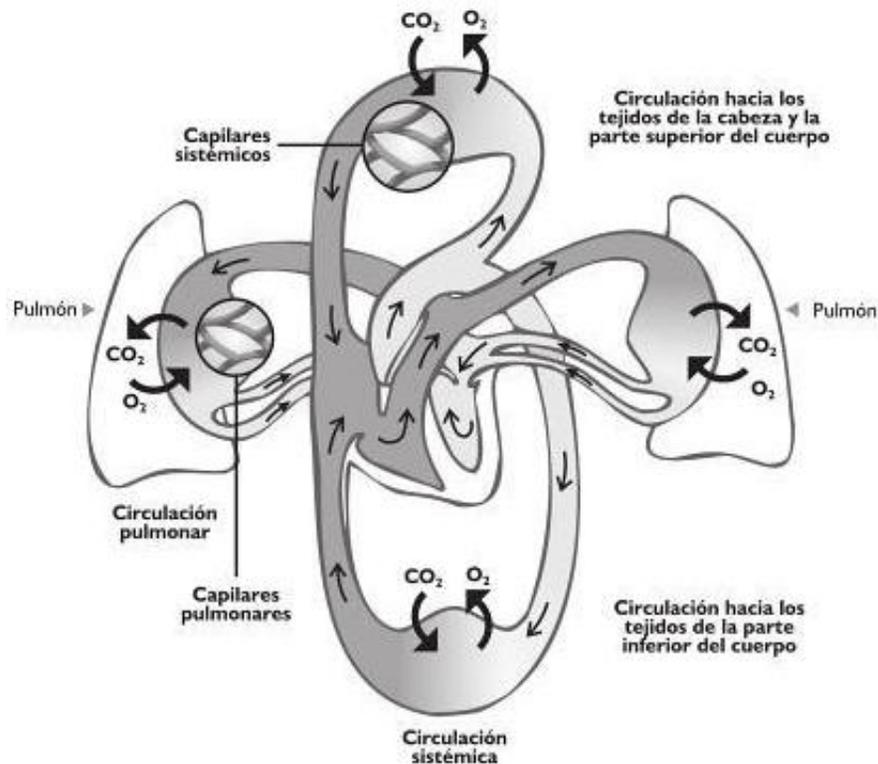


Figura 6. Esquema de la circulación general o sistémica y menor o pulmonar. En gris claro se representa la sangre oxigenada y en gris oscuro la sangre desoxigenada. Las flechas indican el sentido del movimiento del flujo de sangre por los vasos³¹.

3.2.2 Circulación coronaria

El flujo de la sangre por los numerosos vasos que penetran en el miocardio se denomina circulación coronaria o cardíaca. Al contraerse el corazón recibe poca sangre oxigenada por las arterias coronarias, que se ramifican de la aorta ascendente. Sin embargo, cuando éste se relaja, la presión arterial alta en la aorta impulsa la sangre por las arterias coronarias, luego a los capilares y por último a las venas coronarias^{30, 104}.

4.0 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR

4.1 Fisiología de la contracción miocárdica

Los diferentes componentes del ECG reflejan la despolarización o repolarización de las aurículas o los ventrículos⁹⁴. Los potenciales de acción que se inician en el nodo SA se propagan por el sistema de conducción cardiaco y excitan las fibras musculares auriculares y ventriculares “funcionales” o fibras contráctiles. Un potencial de acción ocurre en tales fibras de la manera siguiente **(Figura 7)**:

FASE 4: POTENCIAL DE MEMBRANA EN REPOSO. Las fibras contráctiles tienen un potencial de membrana en reposo cercano a -90 mV ^{58, 94, 104}.

FASE 0: DESPOLARIZACIÓN. Cuando se alcanza un determinado grado de despolarización denominado potencial umbral de excitación se abren los canales de iones sodio (Na^+) llamados canales de sodio rápidos controlados por voltaje. Debido a que el medio intracelular es más negativo que el líquido extracelular y en éste son mayores las concentraciones de Na^+ , ocurre el flujo de entrada de Na^+ conforme a su gradiente electroquímico que produce la despolarización rápida^{58, 94, 104}.

FASE 1: REPOLARIZACIÓN INICIAL. Cuando los canales de Na^+ se cierran, la célula comienza a repolarizarse a medida que el K^+ sale a través de los canales de K^+ abiertos^{58, 94}.

FASE 2: MESETA. En esta fase se abren los canales de calcio (Ca^{2+}) lentos controlados por voltaje, esto incrementa la permeabilidad a los iones calcio así como los valores de Ca^{2+} en el medio intracelular. Simultáneamente se reduce la permeabilidad de la membrana a los iones potasio como efecto del cierre de los canales de K^+ ^{58, 94, 104}.

FASE 4: REPOLARIZACIÓN RÁPIDA. Los canales de potasio controlados por voltaje se abren lo cual aumenta la permeabilidad de la membrana a los K^+ , así mismo se cierran los

canales de calcio. La salida de más K^+ de las fibras y la entrada de menos Ca^{2+} en ellas hace que se restaure el potencial de membrana en reposo negativo (-90 mV)^{58, 94, 104}.

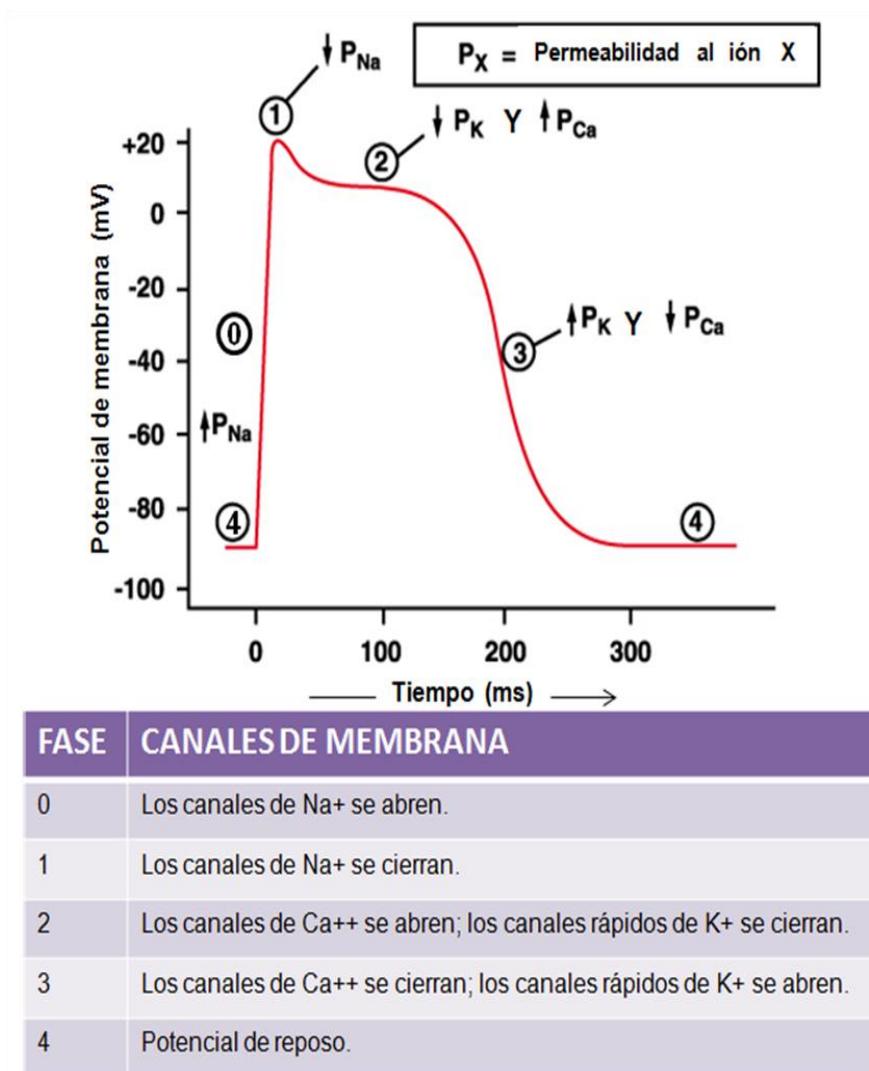


Figura 7. Potencial de acción de una célula contráctil cardíaca. (Modificado de Velez, 2009)

4.2 Sistema de conducción del corazón

La actividad eléctrica se realiza de forma continua y cíclica, para ello el músculo cardíaco tiene unas características que le confieren una consideración fisiológica especial. En primer lugar tiene la capacidad de contraerse con mayor o menor intensidad dependiendo de una serie de factores, propiedad denominada inotropismo cardíaco (o

contractilidad). Como tejido formado por células excitables capaces de generar señales eléctricas (potenciales de acción), es un tejido excitable³¹.

Las células miocárdicas se activan siguiendo un orden preestablecido para que su contracción sea efectiva. Para conseguir esta secuencia fisiológica de activación se inicia la producción espontánea de impulsos eléctricos en el sistema de conducción especializado con lo que se consigue la contracción rítmica del corazón¹¹⁰.

La excitación cardíaca comienza en el Nodo Sinoauricular (SA) situado en la pared auricular derecha, cada potencial de acción del Nodo SA se propaga a las aurículas, las cuales se contraen a su paso. Al propagarse por las fibras auriculares, el potencial de acción llega finalmente al nodo auriculoventricular (AV) situado en el tabique entre las aurículas justo por delante de la abertura del seno coronario. El potencial pasa al haz de His, que es la única conexión eléctrica entre las aurículas y los ventrículos. El haz de His se divide en dos ramas, derecha e izquierda que se dirigen a los ventrículos correspondientes, las dos ramas se dividen dando lugar a numerosas fibras denominadas fibras de Purkinje. Por último las fibras de Purkinje conducen el potencial de acción, primero el vértice del miocardio ventricular y luego, hacia arriba, al resto de las fibras musculares de los ventrículos (**Figura 8**)^{20, 25, 104, 110}.

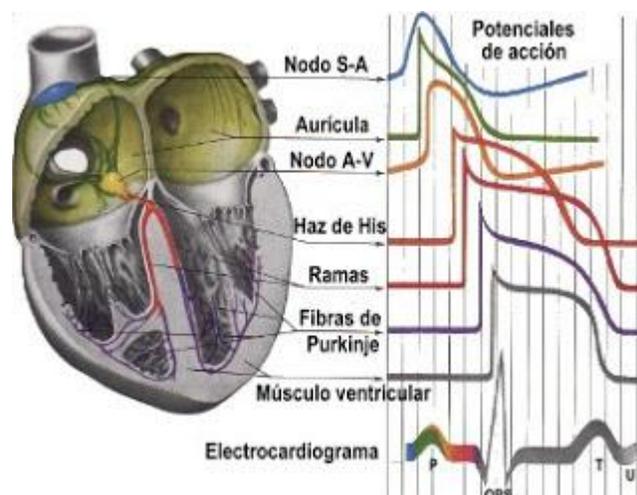


Figura 8. Sistema de conducción del corazón⁶⁵.

4.3 Electrocardiograma

La propagación de los potenciales de acción en el corazón genera corrientes eléctricas detectables en la superficie corporal. Se denomina electrocardiograma (ECG) a la representación gráfica de estos cambios eléctricos. El ECG está compuesto por los potenciales de acción que producen todas las fibras miocárdicas en cada latido. El instrumento usado para ello es el electrocardiógrafo, el cual permite al médico obtener información sobre diversos trastornos del ritmo y de la conducción, el grado, la localización y la evolución de una lesión del miocardio, la influencia de determinados fármacos en el corazón, entre otros^{10, 104}.

En un ECG pueden definirse tres elementos: ondas, segmentos e intervalos. Las ondas aparecen como deflexiones por encima o por debajo de la línea de base. Los segmentos son secciones de la línea de base entre dos ondas. Los intervalos son combinaciones de ondas y segmentos (**Figura 9**). La onda P es una pequeña deflexión ascendente del ECG que corresponde a la despolarización auricular la cual se propaga desde el nodo SA por ambas aurículas, tiene una duración aproximada de 0.08 s, las ondas P grandes podrían indicar agrandamiento auricular (auriculomegalia)^{31, 94, 104, 110}.

El complejo QRS representa el comienzo de la despolarización ventricular, tiene una duración menor de 0.10 s. La onda Q representa el comienzo de la despolarización ventricular que empieza un poco antes en el lado izquierdo, suele estar agrandada en infarto del miocardio. La onda R representa la porción media de la despolarización ventricular, es decir el paso de la despolarización por las fibras de Purkinje, una onda R mayor a lo normal indica generalmente agrandamiento ventricular (ventriculomegalia). La onda S representa la porción terminal de la despolarización ventricular, es decir, la despolarización que asciende por las paredes del ventrículo en dirección hacia las aurículas. La onda T representa la repolarización de los ventrículos y ocurre justo antes de que inicie la relajación de éstos, la onda T es más plana que lo normal cuando el miocardio recibe oxígeno insuficiente. El intervalo PR ó PQ se mide desde el inicio de la onda P hasta

que comienza el complejo QRS e indica el tiempo de conducción entre el comienzo de la contracción auricular y el de la excitación ventricular. Tiene una duración entre 0.12 y 0.20 s. En personas con enfermedad arterial coronaria y fiebre reumática se ve prolongado el intervalo PQ. El intervalo QT mide la despolarización y la repolarización ventricular, se extiende desde el inicio del complejo QRS hasta el final de la onda T. Tiene una duración de 0.23 a 0.50 s y depende de la frecuencia cardiaca, suele prolongarse en pacientes con daño miocárdico, isquemia coronaria o anomalías de la conducción. El segmento ST representa un periodo en que están despolarizadas completamente las fibras contráctiles ventriculares. Se inicia al final del complejo QRS y acaba al inicio de la onda T. Dura alrededor de 0.12 s, se prolonga en caso de infarto agudo al miocardio y se acorta si el miocardio recibe oxígeno insuficiente^{31, 104, 110}.

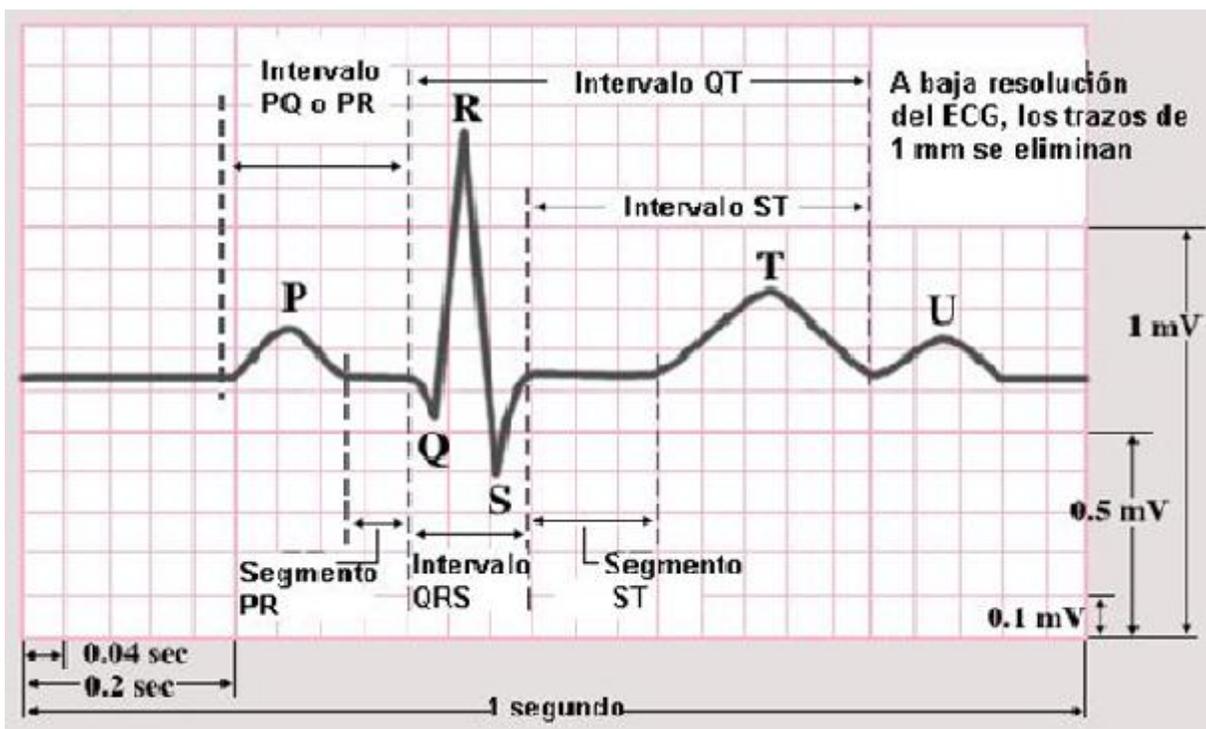


Figura 9. Componentes del electrocardiograma¹⁰⁷.

5.0 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) consiste en una cascada de interacciones entre enzimas y sustratos que ocurren en la circulación general y culminan con la producción de Angiotensina II (Ang II), el péptido activo responsable de los efectos conocidos de éste sistema. El concepto del SRAA ha experimentado diversos cambios, uno de ellos es el descubrimiento del SRA tisular o local, que se caracteriza por la presencia de los componentes del SRA a nivel de los tejidos. Ganten y cols. en el año de 1971 demostraron por primera vez que los componentes del SRAA podían ser producidos localmente a nivel de varios órganos y tejidos. En algunos tejidos como el cardiaco (en aurículas y en ventrículos), el renal, el nervioso, el adiposo, se encuentran presentes los componentes para generar Ang II. La función del SRA local no está bien establecida, sin embargo se asocia con un incremento en la expresión de sus componentes, en estados patológicos como el cáncer, en procesos isquémicos y en procesos inflamatorios^{23, 51, 78, 81, 105}.

Las acciones principales del SRAA son regular la presión arterial (PA), el tono vascular, la volemia, y la homeostasis hidroelectrolítica y facilitar la transmisión simpática. Debido a que el SRAA regula las funciones cardiovasculares y renales, las alteraciones de éste sistema desempeñan un papel importante en la fisiopatología de varias enfermedades cardiovasculares y renales. El SRAA participa en la remodelación ventricular del infartado y del hipertenso así como en la remodelación vascular^{71, 74, 93, 96, 108}.

La existencia y funcionamiento de un determinado SRA cardiaco ha sido un tema de debate, ya que ha sido difícil diferenciar los efectos de Ang II intracardiaca de los generados por Ang II proveniente de la circulación. El papel fisiológico predominante del SRA cardiaco parece ser el mantenimiento de un medio celular y el equilibrio de estímulos que induce inhibición del crecimiento celular y la proliferación adecuada, así como la mediación de respuestas adaptativas al estrés miocárdico, por ejemplo, después del estiramiento del miocito (**Figura 10**)⁷⁸.

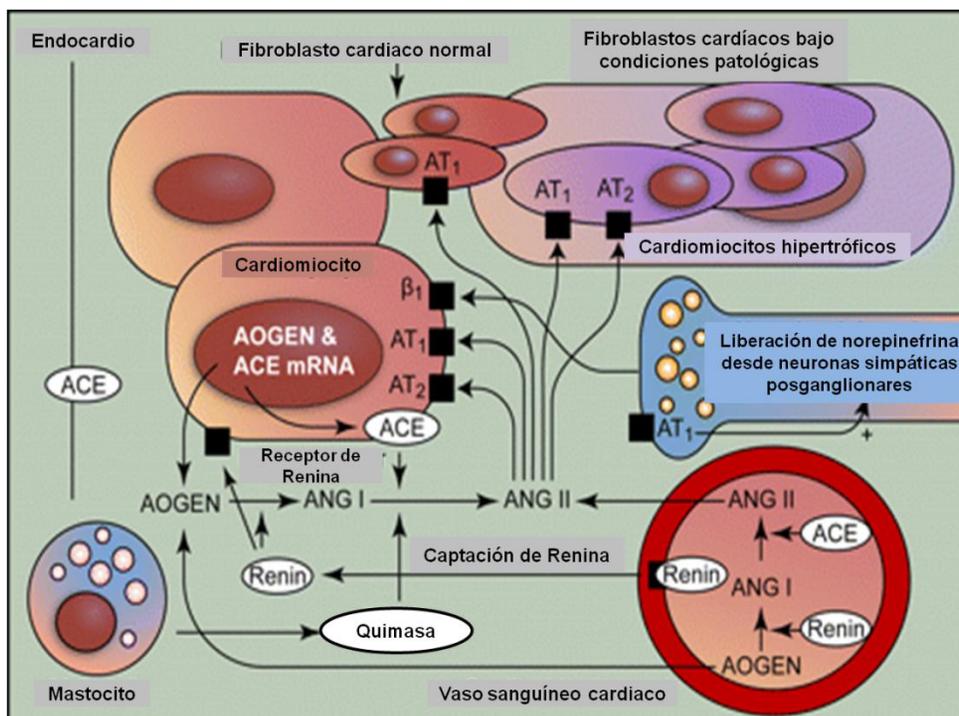


Figura 10. El sistema renina angiotensina (SRA) en el corazón. La renina (Renin) y angiotensinógeno (AOGEN) son en su mayoría tomados del plasma o formados localmente. La producción de quimasa en los mastocitos del corazón humano puede presentar una vía alternativa. La síntesis de Ang II se produce extracelularmente y actúa sobre los receptores específicos de las células en diferentes tipos de células tales como cardiomiocitos y fibroblastos⁷⁸.

Los componentes que forman el SRAA son: la renina, el angiotensinógeno, la angiotensina I, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la angiotensina II, los receptores de Ang II AT₁ y AT₂ y varios péptidos menores^{23, 81}.

5.1 Angiotensinógeno

El Angiotensinógeno o sustrato de la renina es una glucoproteína de 452 aa en humanos que pertenece a la familia de las α -2-globulinas, tiene un peso molecular de 57000 D, contiene en su extremo amino al decapeptido Angiotensina I (Ang I). Se sintetiza principalmente en el hígado, así como en otros tejidos incluyendo el corazón, riñones, tejido adiposo, el cerebro y grandes arterias, circulando como un péptido biológicamente inactivo. El angiotensinógeno, sintetizado en el hígado y secretado a la circulación, tiene una vida media en plasma de aproximadamente de 4-10 h. Su nivel circulante se

incrementa por acción de glucocorticoides, hormonas tiroideas, estrógenos, varias citocinas y Ang II^{24, 32, 38, 45, 51, 91, 93}.

La detección de RNAm de angiotensinógeno en el corazón se ha descrito para el ratón, la rata, el perro y el humano. Los niveles de RNAm de angiotensinógeno cardíacos son bajos en comparación con las que se encuentran en el hígado donde se da la mayor fuente de producción de angiotensinógeno⁷⁸.

5.2 Renina

La renina se sintetiza como una preprohormona de gran tamaño. La preprorenina humana tiene 406 aa, mientras que la prorenina (ProR) se obtiene al retirar los últimos 23 aa de la región amino terminal, la conversión de la ProR en renina implica la pérdida de 43 aa, se realiza exclusivamente en las células yuxtaglomerulares del riñón por acción de la catepsina B y posteriormente se libera la renina de 340 aa, a la sangre circulante (**Figura 11**). Su tiempo de vida media en la circulación es mayor a 80 min. La renina cataliza la liberación hidrolítica del decapeptido Ang I a partir de su sustrato el angiotensinógeno^{32, 81, 93, 100}.

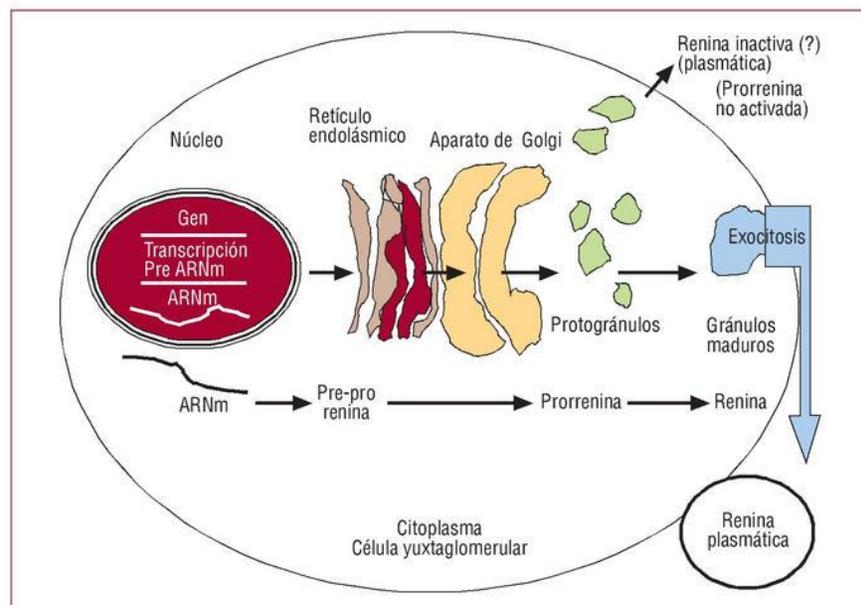


Figura 11. Proceso de síntesis y secreción de renina-renina inactiva (prorenina)²⁶.

La ProR es producida por las suprarrenales, los ovarios, los testículos, la placenta y la retina. El riñón es el único sitio conocido en donde la ProR es convertida en renina y la única fuente de renina plasmática^{91,93}.

La concentración circulante de ProR es 10 veces mayor que la de renina (1 pmol/l), que se incrementa aún más en pacientes diabéticos, particularmente en caso de retinopatía o microalbuminuria¹⁰⁰.

La ProR y la renina se sintetizan y almacenan en las células yuxtaglomerulares del riñón, desde donde son liberadas a la circulación sistémica en respuesta a:

- a) la estimulación de los barorreceptores de la arteriola glomerular aferente en respuesta a una reducción de la presión de perfusión renal secundaria a hipovolemia (p. ej., tras hemorragia, dosis altas de diuréticos), disminución del volumen minuto (insuficiencia cardiaca), estenosis de la arteria renal o administración de fármacos vasodilatadores.
- b) la estimulación de los receptores adrenérgicos β_1
- c) la estimulación de los quimiorreceptores de la mácula densa (forma parte del aparato yuxtaglomerular renal), por reducción de la carga de Na^+ y Cl^-
- d) factores humorales (Ang II, vasopresina, endotelina 1, óxido nítrico (NO), prostaciclina, dopamina)¹⁰⁰.

El receptor específico de renina/prorrenina (P)RR fue identificado por primera vez en células mesangiales humanas cultivadas, desde entonces se ha encontrado que se expresa en niveles relativamente altos en el corazón, el cerebro, la placenta y los adipocitos, y en niveles más bajos en los riñones e hígado de ratas y humanos^{2, 22, 66, 67}.

El (P)RR tiene 350 aa, posee un dominio transmembranal y exclusivamente se une a renina/ProR. La unión de renina/ProR a (P)RR ha demostrado tener dos importantes

efectos: aumento de la actividad catalítica de la renina/ProR y la activación de (P)RR media cascadas de transducción de señales⁶⁷.

- ∅ Reducción de sodio
- ∅ Diuréticos
- ∅ Hipotensión
- ∅ Hemorragia
- ∅ Postura erecta
- ∅ Deshidratación
- ∅ Insuficiencia cardiaca
- ∅ Cirrosis
- ∅ Constricción de las arterias renales o aorta
- ∅ Varios estímulos psicológicos

Figura 12. Trastornos que incrementan la secreción de Renina³².

5.3 Angiotensina I

En el año de 1898, Tigerstedt & Bergman reportaron que extractos tisulares obtenidos de la corteza renal de conejos, inyectados a otros conejos vivos producían un incremento de su presión arterial. Denominaron a dicha sustancia responsable como “renina”. Los descubrimientos de Tigerstedt & Bergman, no fueron debidamente considerados hasta que Goldblatt y cols. en 1934, descubrieron que había una persistente alza de la presión arterial como respuesta a la generación de una isquemia renal. En forma simultánea en 1939 dos grupos de investigación científica liderados por el Dr. Irvine H. Page en Indianápolis, USA y el Dr. Eduardo Braun-Menéndez en Argentina determinaron que no era la renina per se la hormona responsable de elevar la presión arterial. Ella era una enzima cuyo rol era transformar su sustrato (Angiotensinógeno) en un potente péptido vasoactivo, quien si era capaz de generar tales incrementos de la presión arterial. Cada uno de estos grupos dio un nombre al compuesto generado en el plasma, el primero lo llamó "angiotonina" y el segundo "hipertensina". A dicha hormona en 1957 se la denominó angiotensina (angiotonina + hipertensina)^{9, 83}.

En 1957 Skeggs y cols. reportaron que la Angiotensina se encontraba presente en la sangre en dos formas distintas que denominaron angiotensina I y II (Ang I y Ang II).

Además demostraron que la Ang I era el sustrato de otra enzima, la “enzima convertidora de angiotensina” (ECA), para generar así el péptido vasopresor de mayor efecto biológico que era la Ang II⁹.

Actualmente sabemos que existe la Ang I, la Ang II, la Ang III, la Ang IV y otros péptidos más pequeños que provienen del angiotensinógeno⁸³.

La Ang I es un decapeptido fisiológicamente inactivo, que se genera por la acción de la renina sobre el angiotensinógeno (**Figura 13**). Se ha estimado que más del 85% de la Ang I se forma dentro de los tejidos, más que en el plasma. La Ang I es transformada principalmente por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en Ang II (80%) pero esta reacción también se puede producir por medio de otras proteasas (20%), por ejemplo: la quimasa^{5, 91, 109}.

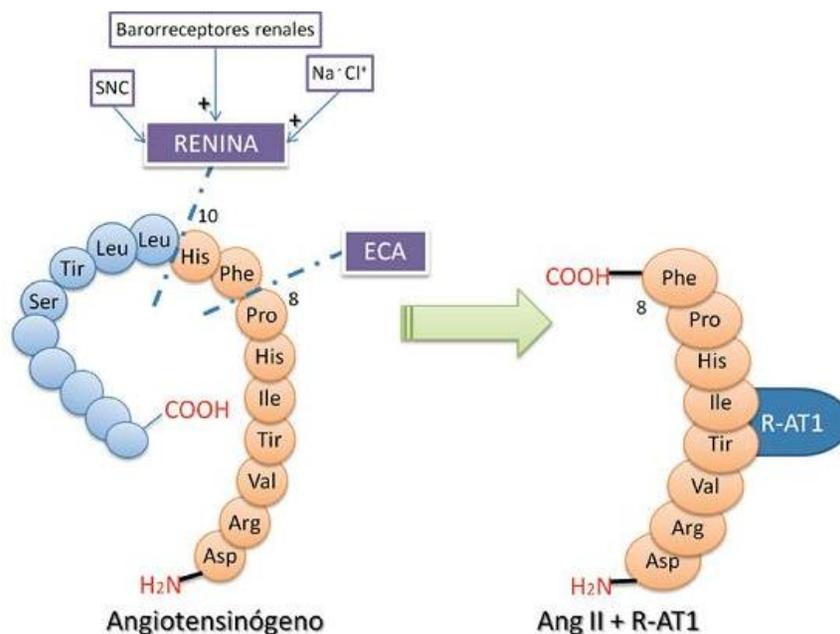


Figura 13. Conversión de Angiotensinógeno a Ang I. Catalizado por la enzima renina. La Ang I posteriormente es convertida a Ang II, principalmente por la ECA⁶.

5.4 Angiotensina II

La Ang I se degrada por la ECA en el octapéptido biológicamente activo Ang II por remoción del dipéptido His-Leu en el extremo carboxilo terminal. La angiotensina II es la principal molécula efectora del SRAA y puede actuar ya sea como una hormona sistémica (endocrina) o como un factor generado localmente (paracrina, autocrina). La Ang II tiene una vida media biológica en la circulación que va de 15 a 60 s^{51, 77, 81}.

Las propiedades de la Ang II son:

- ∅ La angiotensina II (Ang II) juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular mediante el control del tono vascular^{13, 53, 111}.
- ∅ Produce vasoconstricción^{13, 53, 77}.
- ∅ Produce liberación de catecolaminas⁵³.
- ∅ Promueve la secreción de prolactina y corticotropina⁵³.
- ∅ Actúa en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal estimulando la biosíntesis y secreción de aldosterona^{53, 77, 81}.
- ∅ Actúa en el túbulo proximal incrementando la resorción de sodio e inhibiendo la secreción de renina^{13, 81, 111}.
- ∅ Actúa en el sistema nervioso en donde estimula la ingestión de agua y aumenta la secreción de vasopresina^{13, 81}.
- ∅ Actúa en el músculo liso vascular^{13, 64, 81}.
- ∅ A nivel celular, la Ang II promueve la migración, proliferación, y la hipertrofia^{13, 53}.
- ∅ Se considera un agente muy potente que aumenta la presión sanguínea inclusive más que la noradrenalina⁸¹.
- ∅ Aumenta la síntesis de colágena e inhibe su degradación, efecto mediado por factores de crecimiento como el TGF- β ⁷⁷.
- ∅ Interfiere en el proceso fibrinolítico estimulando el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y activando a los macrófagos⁷⁷.
- ∅ Ang II ejerce mayor influencia sobre el corazón a través de sus efectos sobre la hemodinámica sistémica y el volumen sanguíneo¹¹¹.

El aumento de los valores tisulares de Ang II participa en la génesis de numerosos procesos cardiovasculares que aumentan la morbimortalidad del paciente, tales como la hipertensión arterial (HTA), la hipertrofia cardíaca, el remodelado cardiovascular, la nefropatía diabética, la cardiopatía isquémica o la insuficiencia cardíaca y renal. Las acciones fisiopatológicas de la Ang II son consecuencia de su interacción con los receptores AT₁ y AT₂, localizados en la superficie de la membrana de las células diana.^{47,99}

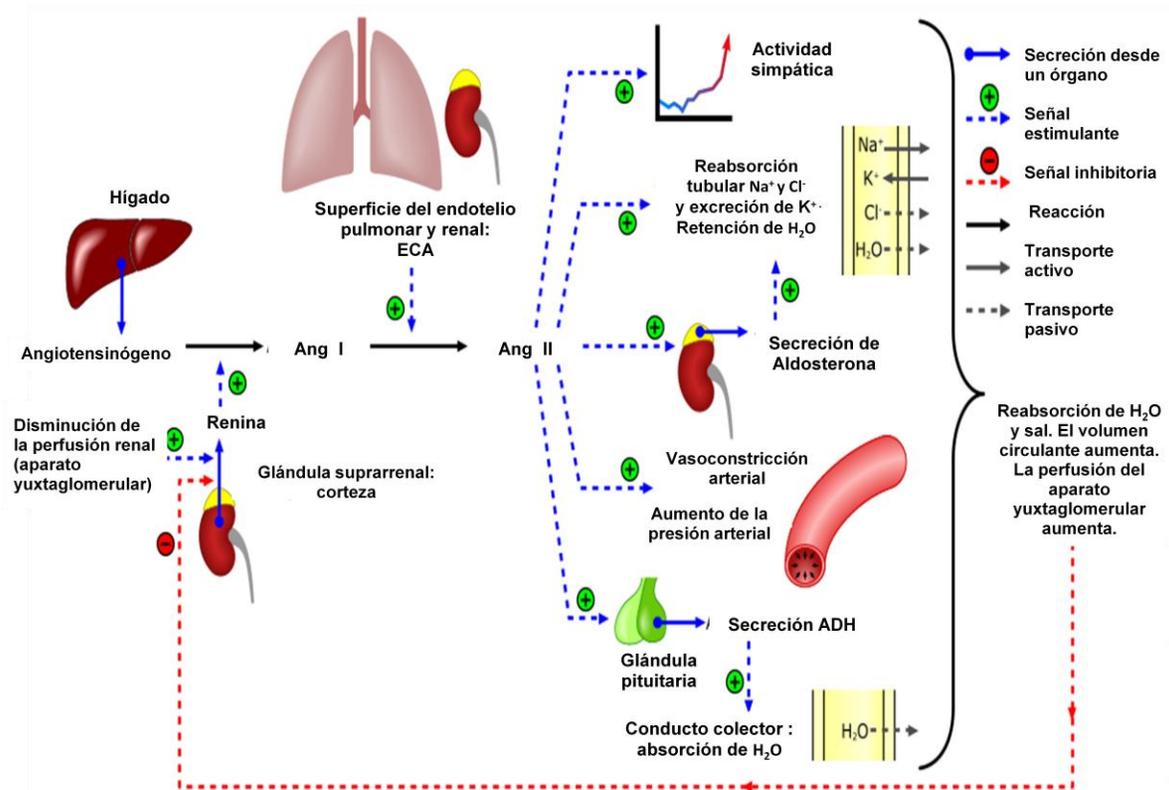


Figura 14. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. Efectos de la Ang II. (Modificado de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sistema_renina_angiotensina.png.)

5.4.1 Receptor AT₁

En 1974 Glossmann y cols. identificaron al receptor celular de Ang II como un receptor de membrana con alta afinidad. Posteriormente en el año 2000 se identificaron dos subtipos de receptores: los AT₁ y los AT₂⁵¹.

El receptor AT₁ pertenece a la familia de proteínas G de siete dominios transmembranales. Tiene una masa molecular de 41 kDa. En humanos, el receptor AT₁ es codificado por un

solo gen ubicado en el brazo q, banda 22 del cromosoma 3, mientras que en los murinos se conocen 2 genes localizados en los cromosomas 17 y 2 que dan origen a dos isoformas del receptor AT₁ conocidas como receptor AT_{1a} y receptor AT_{1b} respectivamente, con más del 95% de similitud en su secuencia de aminoácidos, los cuales se diferencian en la secuencia de aminoácidos de la zona C-terminal de su estructura molecular^{81, 91, 93, 108}.

La distribución del receptor AT₁ ha sido estudiada extensamente, reconociéndose en la actualidad en la mayoría de los tejidos en humanos, primates y roedores, siendo además el tipo predominante en los adultos⁸¹. El receptor AT₁ es expresado en los vasos sanguíneos, corazón, riñón, glándulas suprarrenales, hígado, sistema nervioso central y músculo liso vascular^{51, 93, 99}.

El receptor AT_{1a} está altamente expresado en hígado, riñón, aorta, útero, ovario, bazo, pulmón y cerebro. El receptor AT_{1b} se encuentra expresado en la pituitaria, glándula renal, riñón, útero e hígado y está ausente en el corazón, cerebro y bazo^{98, 108}.

La expresión de RNAm del receptor AT₁ cardíaco y sus sitios de unión se han localizado en los miocitos cardíacos, fibroblastos, células endoteliales, neuronas presinápticas y tejido conductor en el corazón¹¹¹.

La mayoría de los efectos fisiológicos de la Ang II son mediados a través de los receptores AT₁, como son la vasoconstricción, el incremento en la proliferación celular (células de músculo liso vascular, cardiomiocitos y células endoteliales coronarias), efectos hipertróficos, profibróticos, el aumento de los niveles plasmáticos de noradrenalina, aldosterona y hormona antidiurética (generando hipertensión arterial y sed)^{5, 70, 81, 105}.

El receptor AT₁ se caracteriza por acoplarse a proteínas G $\alpha_{q/11}$ (aunque también se puede acoplar a G $\alpha_{i/0}$, G $\alpha_{12/13}$). Esto le permite activar fosfolipasas como la A, la D y la C. Esta última genera inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol, una molécula que activa a la

la desensibilización del sistema. Una vez que el receptor AT₁ es internalizado, puede ser degradado o desfosforilado y reciclado hacia la superficie celular, cabe aclarar que lo anterior no sucede con el receptor AT₂⁸¹.

El receptor AT₁ se ha implicado en diversas patologías cardiovasculares, renales y cerebrales, tales como la hipertrofia ventricular izquierda, hipertrofia vascular media, arritmias cardíacas, aterosclerosis, glomeruloesclerosis, accidente cerebrovascular y demencia¹⁰⁵.

5.4.2 Receptor AT₂

El receptor AT₂ pertenece a la familia de proteínas G de siete dominios transmembranales. Tiene una masa molecular de 41 kDa. Comparte 34% de homología de la secuencia de aminoácidos de AT₁. El gen que codifica para el receptor AT₂ se encuentra en el cromosoma X, se compone de tres exones y la secuencia codificadora se encuentra en el tercer exón tanto en humanos como en ratones.^{43, 81, 91, 105}

Los receptores AT₂ están presentes principalmente en tejidos fetales, disminuyendo rápidamente después del nacimiento, encontrándose en baja cantidad en los tejidos de los adultos como el cerebro, corazón, útero, páncreas, retina, piel, en las células del músculo liso endoteliales y vasculares (CMLV), miometrio uterino y los folículos ováricos, a excepción de la glándula adrenal en el que se expresa altamente en la zona glomerular y la médula^{43, 51, 70, 81, 105, 111}.

Se ha demostrado que los niveles de los receptores AT₂ en la aorta son muy bajos (o no detectables) durante el desarrollo embrionario temprano, pero son muy altos durante las últimas etapas de desarrollo y en el recién nacido⁶⁰.

Es de destacar que una abundancia relativa de los receptores AT₂ y AT₁ en el corazón es más alta en los seres humanos en comparación con los roedores y otros modelos

animales⁷³. Normalmente la relación AT₁/AT₂ es 1:2 pero ésta se altera en la insuficiencia cardíaca⁵.

Cabe mencionar que en la etapa adulta los niveles de expresión de este receptor se incrementan bajo condiciones de estrés, de daño tisular, lesión vascular, heridas de la piel, lesiones del sistema nervioso y numerosas patologías cardiovasculares como IAM y la hipertrofia cardíaca^{43, 52, 64, 81, 105, 111}.

Tabla 1. Estado de la expresión del receptor AT₂ y su función en diferentes patologías cardiovasculares⁴³.

ENFERMEDADES	EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AT ₂ (DIRECCIÓN DEL CAMBIO, LOCALIZACIÓN)	FUNCIÓN
Hipertensión arterial (vasos)	↑ aorta SHR, (↑ joven, ↓ adultos mesentéricos SHR)	Anti-hipertrófica Vasoconstricción
Normotensión (vasos)	Presente en CMLV, CE	Vasodilatación
Hipertrofia del ventrículo izquierdo	↑'s y ↓'s	Hipertrófica/ anti hipertrófica
Insuficiencia cardíaca	Principalmente ↑ en corazón infartado (regiones fibróticas)	Anti-proliferativo
Fibrosis cardíaca	Principalmente ↑	Anti-fibrótico
Ruptura	↑ infarto cerebral	Neuroprotector
Enfermedades renales	Principalmente ↑	Renoprotector Pronatriurético
Diabetes tipo 1	↑'s & ↓ en riñón, ↑ en corazón, ↑ en la vasculatura	Renoprotector
Diabetes tipo 2	↑ en riñón (túbulos)	Pronatriurético
Aterosclerosis	↑ plaquetas y pared de los vasos	Vasoprotector/anti proliferativo
Formación en la neoíntima	↑ en la neoíntima	Vasoprotector/anti proliferativo
Mujeres	↑ en vasculatura y riñón	Vasoprotector
Envejecimiento	↑ corazón, aorta y arterias mesentéricas	Vasoconstricción de la arteria mesentérica

Los efectos fisiológicos del receptor AT₂ son contrarios a los del receptor AT₁, por lo que participa en la vasodilatación, antiproliferación celular (ésta última al disminuir la migración de células endoteliales, mientras que ambos son producidos por el aumento de óxido nítrico), además interviene en el desarrollo fetal, la diferenciación celular, la diferenciación tisular, la apoptosis, la regulación de la presión, la natriuresis, la dilatación preglomerular, el desarrollo vascular, la reparación de tejidos y contrarresta el efecto de AT₁^{5, 8, 51, 52, 74, 81, 113}.

Los receptores AT₂ aumentan la síntesis de colágeno, suprimen la hipertrofia miocárdica, la proliferación de fibroblastos y la hiperplasia de las células vasculares. Akishita y cols. han demostrado recientemente en ratones knock out que la fibrosis intersticial asociada con la hipertrofia del VI fue aumentada por una delección de AT₂ mientras que Kurisu y cols. demostraron que se inhibe por la sobreexpresión específica cardíaca de AT₂^{72, 73, 113}.

Mientras que la Ang II fomenta la fosforilación de varias proteínas mediante el receptor AT₁, la desfosforilación ocurre por el receptor AT₂.⁹¹ El bloqueo del receptor AT₁ aumenta la Ang II, que activa el receptor AT₂ y libera cininas y óxido nítrico (NO), que conduce a la cardioprotección¹¹³.

Las vías de señalización del receptor AT₂ no se conocen del todo, sin embargo existe evidencia que apoya el acoplamiento del receptor AT₂ a proteínas G inhibitoras (G α i₂/G α i₃) lo cual provoca la activación de fosfatasas tanto de serina-treonina como la PP2A, así como de tirosina como la proteína tirosina fosfatasa SHP-1. Este acoplamiento provoca la desfosforilación de proteínas activadas por el acoplamiento del receptor AT₁ con G α q (AT₁-G α q), siendo éste un mecanismo por el cual el receptor AT₂ antagoniza las acciones del receptor AT₁⁸¹.

Una de las vías de señalización más frecuentemente reportados para la estimulación de AT₂ en la vasculatura ha sido el aumento de la producción de monofosfato de guanósina

cíclica (GMPc), óxido nítrico (NO) y bradicinina (BK) como se ha descrito por primera vez por Siragy & Carey⁴³.

La activación de AT₂ estimula mecanismos intracelulares involucrados con las fosfatasa de tirosina, serina e inactivación de la cinasa MAPk. Con su activación también regula la apoptosis (en el músculo liso vascular la promueve y en los cardiomiocitos la disminuye), fomenta la apertura de los canales rectificadores retrasados de K y cierre de los canales de Ca⁺ de tipo T en las neuronas, tiene que ver también con diferenciación neuronal y modulación de proteínas de matriz y estructurales en las células endoteliales y neuronales^{91, 105}.

Al estimularse el receptor AT₂ en el músculo liso vascular (MLV) o en la célula endotelial (CE) bloquea el intercambio de sodio por hidrogeniones (Na-H) en la pared celular, resultando en una elevación de iones H en el interior de la célula (↑el pH), lo cual activa los cininógenos con el consiguiente aumento de la síntesis de bradicininas; posteriormente las bradicininas se unen al receptor B2 (tanto en la CE como en la célula del MLV) estimulando la actividad de la eNOS incrementando la concentración de óxido nítrico (NO). De esta forma se fomenta la relajación vascular al estimular a la monofosfato de guanosina cíclica (GMPc). Por otro lado, cuando se estimula el receptor B2 también aumenta la expresión extracelular e intracelular de la superóxido dismutasa (SOD) lo cual disminuye y bloquea la formación de moléculas superóxido (radicales libres); también se observa un aumento de la biodisponibilidad de NO, lo cual contribuye a disminuir la expresión del RNAm del receptor AT₁, reduciendo así la disponibilidad de estos receptores en el organismo para su unión con la Ang II. Este mecanismo otorga una protección a los tejidos ante la isquemia **(Figura 15)**⁹¹.

Tabla 2. Cuadro comparativo de las características de los receptores AT₁, AT₂, AT₃ y AT₄⁸¹.

	Receptor AT ₁	Receptor AT ₂	Receptor AT ₃	Receptor AT ₄
Cromosoma	Cromosoma 3 (humanos) 17, 2 (murinos)	Cromosoma X	?	?
Estructura	7 dominios transmembrana 359 aa ~ 41 kD	7 dominios transmembrana 363 aa ~ 44 kD	?	IRAP ~ 1025 aa ~ 170 kD
Kd (Ang II)	~ 2-5 nM	~ 2-5 nM	~ 3.3 nM	~ 1-10 nM
Isoformas	Única en humanos AT1a, AT1b en roedores	?	?	?
Orden de afinidad	Ang II > Ang III	Ang II = Ang III	Ang IV > Ang II	Ang IV > Ang II
Agonistas sintéticos	?	CGP42112A	?	LVV-hemorfin-7
Antagonistas sintéticos	Bifenilimidazoles (Losartán, Candesartán etc.), saralasin	Tetrahidroimidazopiridinas (PD123319, PD123177, EXP655), saralasin.	?	Divalinal-angiotensina IV
Distribución predominante	Tejidos adultos	Tejidos fetales	Descrito únicamente en una línea celular	Sistema nervioso, Riñón
Localización celular	Membrana plasmática, citoplasma y núcleo por internalización del complejo Ang II-AT1	Membrana plasmática. No se internaliza	Membrana plasmática	Membrana plasmática
Función	Vasoconstricción, liberación de aldosterona, filtración glomerular, proliferación celular	Vasodilatación, antiproliferación, diferenciación celular	?	?

Tabla 3. Efectos de estimulación de los receptores de Ang II ⁹¹.

Sitio	AT ₁	AT ₂
Arterias	<ul style="list-style-type: none"> • Vasoconstricción • Hipertrofia • Induce apoptosis • ↑ Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando la angiogénesis y remodelación vascular • Efecto inflamatorio vascular y endotelial 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatación • Promueve la apoptosis del músculo liso vascular • Fomenta en forma indirecta la producción de NO por estimulación de eNOs • Bloquea la acción de radicales libres • Disminuye la expresión de los AT₁
Corazón	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Contractilidad • ↑ Hipertrofia (proliferación de miocitos y colágena) • Induce apoptosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Antihipertrofia • Disminuye la apoptosis de miocitos • Disminuye la expresión de los AT₁
S.N.	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Actividad simpática 	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroprotección (apertura de los canales rectificadores retrasados de K y cierre de los canales de Ca) • Reparación nerviosa • Promueve la diferenciación celular
Endotelio	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Síntesis de radicales libres • Induce apoptosis • Disminuye síntesis de NO • ↑ La expresión del PAI-1(efecto procoagulante) • Activa a la Cox-2 • ↑ Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando la angiogénesis y remodelación vascular 	<ul style="list-style-type: none"> • Fomenta en forma indirecta la producción de NO por estimulación de la eNOs • Regula la apoptosis • Bloquea la acción de radicales libres • Promueve la diferenciación celular • Antiproliferativo • Reparación de tejido • Disminuye la expresión de los AT₁
Riñón	<ul style="list-style-type: none"> • Retención Na⁺ • Inhibición renina 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatación aferente
Suprarrenales	<ul style="list-style-type: none"> • Libera catecolaminas • Libera aldosterona 	
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Libera Ca²⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la proliferación y crecimiento celular, regula la apoptosis, libera estrógenos y bradicinina

5.5. Enzima Convertidora de Angiotensina

En el año de 1956, Skeggs y cols. descubrieron la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), los cuales demostraron que la ECA constituía la enzima clave en la generación de Ang II. En 1998, Deddish y cols. describieron la acción de la ECA en el catabolismo de Angiotensina (1-7). De esta manera, la ECA es capaz de producir un potente vasoconstrictor la Ang II e inactivar a la Ang (1-7) que tiene efectos vasodilatadores al actuar sobre el receptor Mas. Es el objetivo de agentes terapéuticos altamente eficaces utilizados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y renales⁵¹.

La ECA o cininasa II, es estructuralmente una metalopeptidasa de zinc y funcionalmente una ectoenzima unida a membrana que hidroliza el decapeptido angiotensina I al octapéptido vasoactivo angiotensina II ^{5, 13, 41, 46, 91}.

Existen 3 isoformas principales de la ECA: 1) ECA somática, 2) ECA testicular o germinal y 3) ECA plasmática o soluble.

1. **ECA somática o endotelial:** es una glucoproteína de 170 KDa que se encuentra en varios tejidos (vasos sanguíneos, riñones, corazón y cerebro principalmente). Es una ectoenzima bilobulada unida a la membrana celular y que tiene una región hemodimérica extracelular, la cual a su vez tiene 2 dominios homólogos uno en el exón 8 (Sitio activo N-terminal), y otro en el exón 21 (sitio activo C terminal) con un sitio catalítico activo cada uno constituido por el motivo de unión al zinc: HEMGH (His-Glu-X-X-His) que se encuentra en muchas de las zinc peptidasas, un dominio de anclaje transmembrana y una cola corta de carboxilo intracelular. El sitio C terminal es el responsable del 75% de la actividad de la ECA y el principal responsable de la conversión de la Ang I a Ang II (**Figura 16**). Tanto la ECA somática como la ECA testicular están codificadas por el mismo gen a través de transcripción por promotores alternativos. El gen que codifica para ECA somática está organizado en 21 kb, se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, está constituido por 26 exones, 25 intrones y contiene una región polimórfica en el intrón 16^{37, 77, 91}.

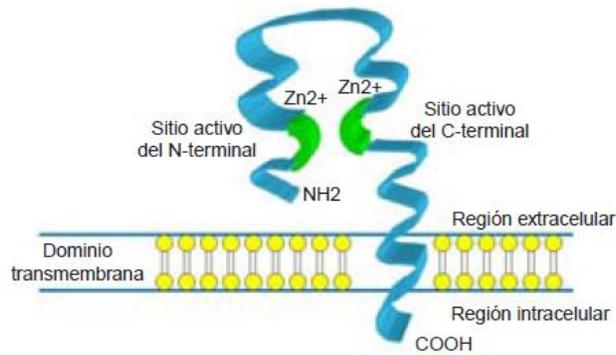


Figura 16. ECA somática⁹¹.

2. **ECA testicular o germinal:** es una glucoproteína de 90 KDa que se encuentra exclusivamente en las células germinales de los testículos, se diferencia a la ECA somática en que sólo tiene un amino terminal en la región extracelular y por lo tanto tiene un sitio catalíticamente activo (**Figura17**)⁹¹.

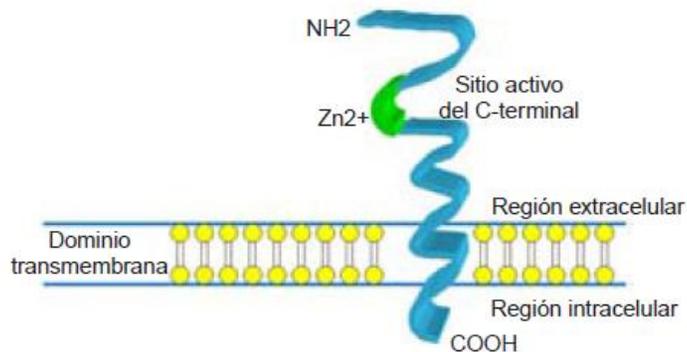


Figura 17. ECA testicular o germinal⁹¹.

3. **ECA plasmática o soluble:** se piensa que ésta deriva de la segmentación proteolítica de la región C-terminal de la ECA somática desde la membrana celular y carece del dominio transmembrana en la porción intracelular; por lo tanto, la ECA soluble corresponde a la región extracelular de la ECA somática y contiene 2 sitios activos. Su fracción soluble pasa a la circulación sistémica (sólo el 1% es circulante) gracias a su escisión del plasmalema por una secretasa, encontrándose en el suero y otros líquidos corporales. Probablemente se origina en las células endoteliales, sobre todo de pulmón debido a la expresión preferencial de ECA en los capilares del pulmón (**Figura 18**)^{5, 21, 77, 91}.

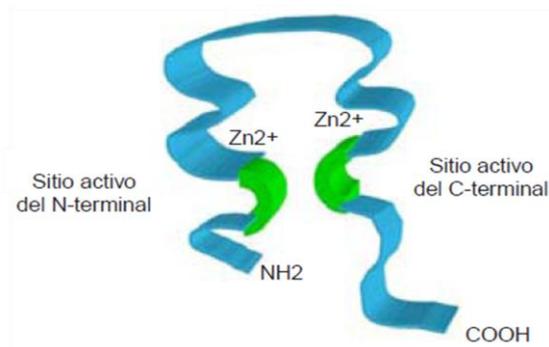


Figura 18. ECA plasmática o soluble⁹¹.

La ECA somática es la enzima principal para la producción de Ang II. La ECA es idéntica a la quininasa responsable del metabolismo y la degradación de la bradicinina, por lo que metaboliza la bradicinina (1-9) a su forma inactiva (1-7) mediante la liberación dipéptido Phe-Arg del extremo terminal del péptido y también tiene la capacidad de escindir di y tripéptidos de la región C-terminal de sustancias como la sustancia P, encefalinas, neurotensina, colecistocinina, bombesina y hormona liberadora de hormona luteinizante; así como metabolizar Ang (1-7) a su forma inactiva (1-5). La actividad de la ECA tiene un pH óptimo de 7 a 8 y cae rápidamente con la del disminución del pH^{23, 41, 91}.

La inhibición de la ECA previene la formación de Ang II y aumenta los niveles plasmáticos de la bradicinina, un potente vasodilatador dependiente del endotelio con propiedades hipotensoras y natriuréticas, que conduce a una disminución de la presión arterial^{5, 13, 77}.

En el tejido cardiaco, la ECA puede representar el principal mecanismo de generación de Ang II, por lo que los efectos terapéuticos de los iECA pudieran explicarse mediante la disminución en los niveles de Ang II y el aumento en la síntesis de bradicinina²³.

De este modo, la actividad de la ECA podría determinar de alguna manera los valores circulantes y tisulares de Ang II y contribuir a regular el tono vascular, la presión arterial y posiblemente algunos procesos de remodelado cardiovascular⁴¹.

La ECA se encuentra unida a la membrana en las células endoteliales parenquimatosas, epiteliales o neuroepiteliales, células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas), glomerulares, tubulares renales, testiculares, en los fibroblastos, en el cerebro, pulmones y como una forma soluble en la sangre y numerosos fluidos corporales^{5, 13, 21, 77, 93}.

En el corazón hay mayores concentraciones de ECA en las aurículas que en los ventrículos, y mayores en la aurícula derecha que en la izquierda. El tejido de conducción contiene poca cantidad de ECA, así como en los miocitos, pero hay regulación hacia arriba de ECA en corazones hipertróficos, y en los seniles; es probable que el estrés incremente sus niveles. Dzau y cols. señalan que se ha comprobado que los miocitos pueden producir ECA activados por el estiramiento. La enzima así formada es transportada por los macrófagos que la trasladan al intersticio⁹³.

La actividad plasmática de la ECA en los seres humanos depende de la edad. La Actividad de la ECA circulante es mayor en niños que en adultos y no está asociada con algunos factores ambientales como monóxido de carbono, el tabaco y el consumo de alcohol, ni con el recuento de leucocitos o tasa de sedimentación. En algunas enfermedades como la sarcoidosis, lepra, la enfermedad de Gaucher, cirrosis biliar primaria y la silicosis, la actividad de la ECA plasmática se incrementa debido a la sobreexpresión de ECA en las células inflamatorias^{21, 42}.

Cuando hay disfunción endotelial se altera la regulación vasomotora, el crecimiento celular, el estado inflamatorio de la pared vascular y la activación de la ECA tisular, con lo que se incrementa la producción local de Ang II y la degradación de bradicinina, estos factores alteran la homeostasis circulatoria. Los inhibidores de la ECA (iECA) tienen la capacidad de revertir en gran parte esas alteraciones. Menos del 10% de la ECA circula en el plasma, por lo que la ECA es una enzima fundamentalmente tisular. Además de su

importante función endotelial la ECA participa en la fisiopatología de la placa aterosclerótica⁹³.

En un estudio reciente con ratones transgénicos en los cuales se bloqueó la expresión de la ECA a nivel endotelial, se observó que las presiones arteriales de estos ratones se encontraban más bajas que el promedio, esta diferencia no fue significativa, mostrando con esto que la ECA es importante, pero no esencial para la regulación de la presión arterial⁹¹.

Se ha comprobado que la Ang II y la ECA desempeñan un importante papel en el engrosamiento neointimal es decir, el remodelamiento vascular que se produce cuando hay lesión, reestenosis, HTA, aterosclerosis y formación de aneurisma. Ese papel está mediado por el receptor AT₁, usando como vías la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) y la NADPH oxidasa. El remodelamiento vascular que lleva a la formación de aneurisma es contrarrestado por la inhibición de la ECA, por lo cual se estima que el metabolismo de las metaloproteinasas de la matriz extracelular está involucrado⁹³.

5.6. ECA2

En el año 2000, dos grupos independientes Donoghue y cols; y Tipnis y cols. identificaron una nueva enzima homóloga de la ECA, a la cual denominaron Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ECA2), que tiene una similitud del 56% con el dominio N-terminal de la ECA somática, sin embargo esta homología no la hace sensible a los inhibidores de la ECA (iECA) y no hidroliza bradicininas^{43, 51, 80}.

Esta expresada predominantemente en el endotelio, CMLV del corazón y riñón, testículo, también se encuentra en hígado, sistema nervioso central y placenta. Los valores altos de la ECA2 en el riñón y el corazón inducen a pensar que tiene un papel importante en la regulación cardiovascular y renal. Sin embargo, la actividad enzimática de la ECA2 es

mucho mayor en el tejido procedente de la corteza renal que en el tejido cardíaco^{43, 77, 91, 96}.

La ECA2 es una metaloproteasa de zinc, está constituida por 805 aa que incluyen la secuencia de señal N-terminal y una región hidrofóbica cerca del C-terminal y sirven como anclaje a la membrana celular. Contiene un solo motivo de unión al zinc, el cual es el sitio activo de la enzima. El gen que codifica la ECA2 se localiza en el brazo corto del cromosoma X, contiene 18 exones, 17 intrones y se extiende aproximadamente 40 kb (Figura 19)^{77, 96}.

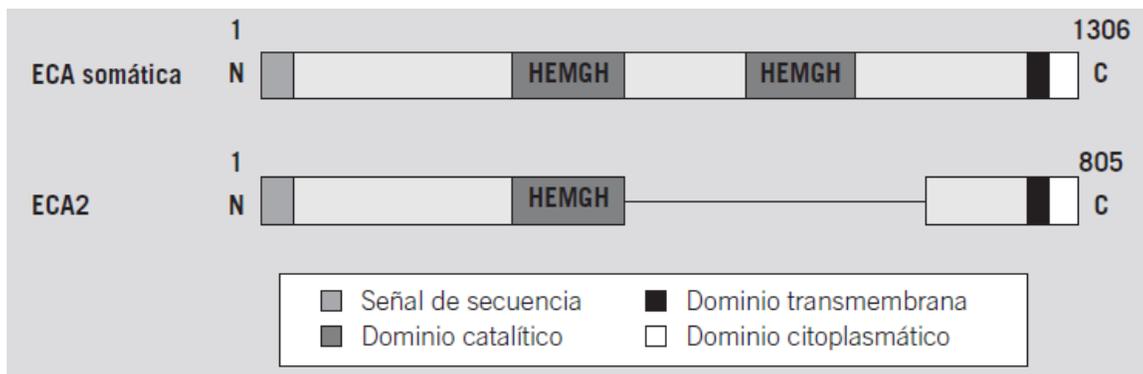


Figura 19. Estructuras del dominio de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) somática y de la ECA2. Cada una de ellas es una proteína integral tipo 1 con un péptido de señal, representado en color blanco, y un dominio transmembranario, en color negro. La proteína de unión del zinc (HEMGH) se repite 2 veces en la ECA y sólo aparece una vez en la ECA2 y se localiza en la región homóloga indicada en color gris oscuro. Los números representan los aminoácidos de cada proteína⁹⁶.

A diferencia de la dipeptidil carboxipeptidasa ECA, ECA2 escinde un solo aminoácido del extremo C-terminal del péptido sustrato. Por lo tanto, ECA2 escinde la Ang I en la Ang inactiva (1-9), el cual se puede convertir entonces al péptido vasodilatador, Ang (1-7) por acción de la ECA. Más importante aún, ECA2 también puede metabolizar directamente Ang II para formar Ang (1-7) y esta reacción se produce a un ritmo más rápido que la formación de Ang (1-9) a partir de Ang I, pero no convierte Ang I a Ang II. Por lo tanto, ECA2 puede contrarrestar-regular la actividad de ECA, disminuyendo al mismo tiempo los niveles de Ang II y el aumento de la formación de Ang (1-7)^{43, 46, 74, 91, 92, 96}.

Estudios *in vitro* realizados por Vickers y cols. en el 2002 indican que la actividad catalítica de ECA2 para Ang II es 400 veces mayor que para Ang I. Esto sugiere que el mayor efecto de ECA2 es la conversión de Ang II a Ang 1-7. De esta manera, el SRAA puede ser visto como un sistema endocrino dual en el que las acciones vasoconstrictoras/proliferativas y las acciones vasodilatadoras/antiproliferativas son reguladas en parte por un balance entre la ECA y la ECA2, lo cual hace fácilmente entendible el efecto benéfico que tienen los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) en el perfil de pacientes cardiometabólicos^{51, 77}.

Las primeras investigaciones con respecto a ECA2 sugirieron que el RNAm de ECA2 aumentó en modelos tanto humanos como animales de insuficiencia cardíaca de acuerdo con Goulter y cols. en 2004 y Burrell y cols. en 2005 y la disminución en ratas genéticamente hipertensas según Crackower y cols. en 2002, lo que provocó el interés que ECA2 puede desempeñar un papel importante modulador en la SRAA en ciertas patologías cardiovasculares⁴³.

Existen varios estudios que muestran el significado funcional de la ECA2 en la patofisiología cardiovascular. El tratamiento con ARA II de Ishiyama y cols. en 2004, en el modelo murino de infarto agudo al miocardio inducido tras la ligadura de la arteria coronaria aumentó 3 veces la expresión génica de la ECA2 en el miocardio viable, en comparación con el grupo con infarto agudo al miocardio tratado con vehículo y con el tratamiento de espironolactona también aumentaron los niveles de ECA2 en pacientes con insuficiencia cardíaca de acuerdo con Keidar y cols. en 2005. Un estudio realizado por Burrell y cols. en 2005 indica que en ratas Sprague-Dawley el infarto agudo al miocardio inducido mediante la ligadura de la arteria coronaria izquierda, aumenta la expresión génica cardíaca de la ECA y la ECA2. En otro estudio, Ferrario y cols. en 2005 en un modelo experimental murino (ratas Lewis) el tratamiento con iECA aumentó la expresión génica de la ECA2 en el corazón^{43, 96}.

En un trabajo fundamental de Crackower y cols. en 2002 describieron que en ratones de 6 meses de edad con delección del gen de la ECA 2 (ECA₂^{-/-}) produce adelgazamiento de la pared muscular así como, una reducción de la contractibilidad cardíaca y de la presión tanto ventricular como aórtica^{93, 96}.

De acuerdo con Ocaranza y cols. en 2007 un modelo de remodelamiento miocárdico tardío post infarto al miocardio (IAM) muestra aumentos en la actividad de ECA y los niveles de Ang II junto con una disminución de la actividad de ECA2 y los niveles de Ang (1-9), cambios que en conjunto favorecen el desarrollo de fibrosis miocárdica e hipertrofia ventricular patológica en el área no infartada. La inhibición de la ECA así como el bloqueo del receptor AT₁ previnieron la disminución de la actividad de ECA2 post-IAM, aumentaron significativamente los niveles de Ang (1-9) y disminuyeron el RM en el área no infartada⁸⁰.

Aún no se ha establecido cual es la participación de la ECA2 en el remodelamiento vascular aunque si se ha visto asociación con los cambios vasculares que acompañan a la HTA y a la aterosclerosis⁹³.

5.7 Otras Angiotensinas

La Ang II tiene por lo menos tres metabolitos activos: a) desaspartil-angiotensina II (Ang III ó 2-8), b) Ang IV ó (3-8) y c) Ang 1-7. Inicialmente se creía que estos péptidos eran productos de degradación inactivos de Ang II, sin embargo, ahora son reconocidos como componentes activos de la SRAA, a menudo con su propio perfil biológico único^{43, 96}.

5.7.1 Angiotensina III

La Ang III es un heptapéptido que se forma a partir de la Ang II por la acción de la aminopeptidasa A, que elimina el resto de ácido aspártico de la posición 1 o bien por la acción de la ECA sobre el nonapéptido des-Asp-Angiotensina I, del cual elimina el dipéptido His-Leu del extremo C-terminal¹⁰⁹.

La Ang III comparte los mismos receptores y ejerce efectos similares que la Ang II. La Ang III posee alrededor del 40% de la actividad presora de la Ang II, pero 100% de la actividad estimulante de la aldosterona. Sin embargo, en el cerebro es el principal componente del SRAA que controla la presión^{32, 43, 74, 109}.

5.7.2 Angiotensina IV

La Ang IV es formada por la ruptura de Ang III mediante la aminopeptidasa B o N^{43, 93}.

La Ang IV funciona como un mediador de relajación vascular pulmonar y cerebral vía NO e interviene en la proliferación de células endoteliales en la microvasculatura pulmonar. Se ha implicado en el aprendizaje, memoria, flujo sanguíneo, natriuresis y en el desarrollo neuronal. Se une al receptor AT₄ el cual se expresa principalmente en las células endoteliales^{74, 77, 91, 109}.

El papel de la Ang IV en la fisiopatología cardiovascular, al igual que otros fragmentos peptídicos de Ang, se está convirtiendo en un posible mediador en la enfermedad cardiovascular. Después de la identificación del receptor AT₄ como una aminopeptidasa por Albiston y cols. en 2001, se ha propuesto que los ligandos del receptor AT₄ actúan mediante la inhibición de la actividad catalítica IRAP, reduciendo de este modo la escisión de sustratos IRAP tales como Lys-bradiquinina y la vasopresina, así como la prolongación de su actividad biológica de acuerdo con Lew y cols. en 2003. Los mecanismos precisos de IRAP modulados por Ang IV aún no se ha dilucidado, sin embargo, la reciente identificación de un sitio de interacción Ang IV distinto del sitio activo del IRAP por Caron y cols. en 2003, sugiere que la Ang IV puede utilizar un mecanismo alostérico de modular la actividad de IRAP⁴³.

5.7.3 Angiotensina (1-7)

En 1988 Ferrario y cols. demostraron la existencia del heptapéptido Ang (1-7) y posteriormente tras el descubrimiento de la ECA2 resurgió el interés por el heptapéptido²⁷.

La Ang (1-7) puede formarse a partir de la Ang I, Ang II o Ang (1-9). A partir de Ang I se forma a través de la endopeptidasa neutra o nefrilisina NEP 24.11, de la timet oligopeptidasa NEP 24.15 o la propilendopeptidasa (PEP) 24.26. La formación a través de Ang (1-9) se da por la acción de la ECA o de la NEP 24.11. Por otra parte la Ang II se convierte en Ang (1-7) mediante la ECA2, la prolilcarboxipeptidasa (PCP) o angiotensinasa C y por la PEP 24.26. Siendo ésta última la vía que tiene una eficiencia de 500 veces superior que la de Ang I (**Figura 20**)^{28, 91, 93}.

Se ha encontrado que el corazón, cerebro, riñones, tejido útero-placentario, así como los ovarios son fuente de producción de Ang (1-7)²⁷.

La Ang (1-7) ha mostrado ser un importante regulador de la función cardiovascular y renal cuyos efectos principales son la vasodilatación, la apoptosis y el efecto antiproliferativo, además de que potencializa la acción de las bradicininas relacionadas a las prostaglandinas, tiene un efecto antitrófico y disminuye la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), lo que le confiere propiedades antiinflamatorias, fibrinolíticas y sobre el control de la remodelación vascular, también puede inhibir el estrés oxidativo y facilitar la diuresis y natriuresis^{27, 77, 80, 91}.

Por otra parte, la Ang (1-7) actúa como un agente antiarrítmico y protege el miocardio de las consecuencias de una lesión por reperfusión cardiaca. En 2004, De Mello demostró que Ang (1-7) activa la bomba de sodio, hiperpolariza las células del corazón y restablece la conducción de los impulsos durante la lesión-reperfusión²⁷.

La Ang (1-7) estimula la actividad de la fosfolipasa A₂ para liberar ácido araquidónico y así producir prostanoïdes. En contraste con la Ang II, Ang (1-7) no activa la fosfolipasa C en músculo liso vascular, células endoteliales, astrocitos o células mesangiales y no aumenta la fosfolipasa D en células de musculo liso vascular. Este péptido a través de su receptor Mas estimula la óxido nítrico sintetasa (NOS) y contrarresta las acciones de Ang II. La Ang (1-7) se degrada a péptidos inactivos por acción de la ECA por lo tanto, la inhibición de la ECA podría aumentar los niveles de Ang (1-7) y simultáneamente disminuir los de Ang II^{27, 80}.

Estudios realizados por Ferrario y cols. en el año de 1992 demostraron que la nefrilisina fue principalmente responsable de la formación de Ang (1-7) en la circulación y en 1993 que la prolilendopeptidasa 24.26 y la metalo endopeptidasa 24.15 fueron responsables de la formación de Ang (1-7) en las células del endotelio vascular y las células del músculo liso, respectivamente²⁷.

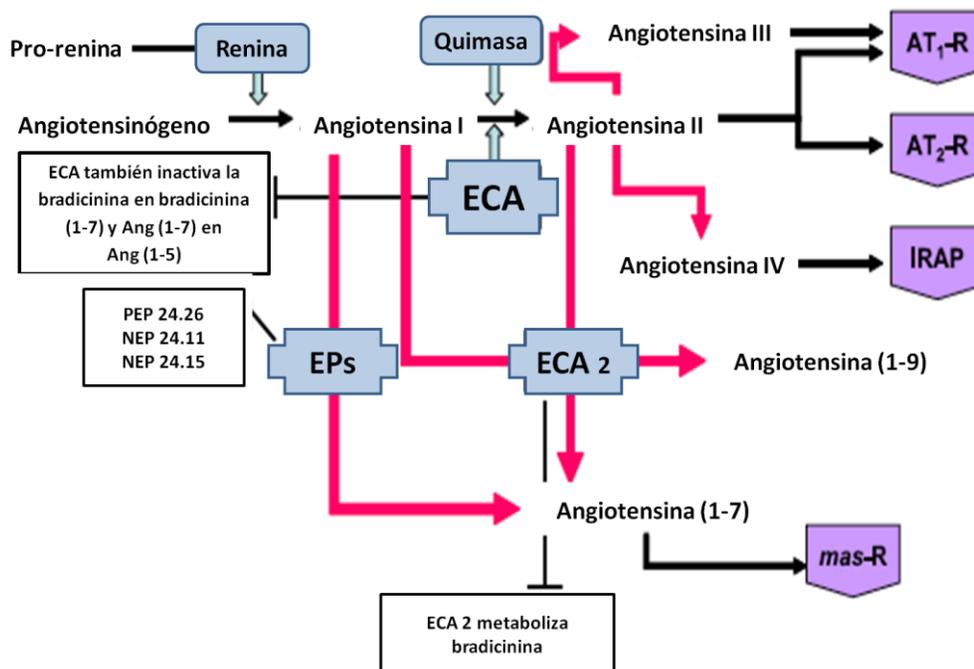


Figura 20. Vista actual de las enzimas del sistema renina angiotensina y de sus péptidos. ECA, enzima convertidora de la angiotensina; ECA 2, enzima convertidora de angiotensina 2; EPs, endopeptidasas (nefrilisina o endopeptidasa neutra 24.11, prolilendopeptidasa 24.26 y metalo endopeptidasa 24.15). El control de la producción específica de tejido de la angiotensina (1-7) [ANG-(1-7)] a partir de Ang I [ANG-(1-10)]; los receptores de Ang son AT₁-R, AT₂-R, y AT₁₋₇-R y aminopeptidasas reguladas por insulina (IRAP). (Modificado de Ferrario, 2005)

5.7.4 Angiotensina (1-12)

En el 2006 Nagata y cols., proporcionaron pruebas de la expresión de un nuevo péptido Ang-(1-12) [Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰-Leu¹¹-Tyr¹²] en el plasma, corazón, riñón y otros tejidos de ratas normotensas Sprague Dawley, encontrando que la administración periférica de Ang-(1-12) resultó en un aumento inmediato de la presión arterial y que la respuesta presora fue bloqueada por la administración de un iECA (captopril) o del antagonista del receptor AT₁ (candesartán). En contraste, Prosser y cols. en 2009 informaron que las acciones cardíacas de Ang-(1-12) fueron atenuadas por una serina proteasa inhibidora de la Cimostatina, pero no por el iECA captopril en una preparación de corazón aislado de rata. Las acciones de Ang I que fueron suprimidas por el iECA sugieren que la conversión de Ang-(1-12) y Ang I en Ang II son realizadas por múltiples enzimas, al menos, en el corazón de rata. Estos informes demuestran claramente que las acciones biológicas de Ang-(1-12) son probablemente a través de la conversión a la Ang II, aunque las vías enzimáticas para este péptido no se han dilucidado del todo¹¹².

5.8 Aldosterona

La aldosterona es un mineralocorticoide que se sintetiza a partir del colesterol. Es el eslabón final del SRAA y tiene receptores en los tejidos renal y del colon mediante los cuales regula la reabsorción de sodio y la secreción de potasio, así como también se han reportado receptores en el hígado, cerebro, hipófisis y monocitos. La secreción de aldosterona es promovida por los aumentos de las concentraciones plasmáticas de Ang II y de potasio. Se ha reportado la secreción extra adrenal de aldosterona en el corazón, tejido vascular y en el SNC^{9,96}.

Su efecto agudo a nivel renal es retener sodio y eliminar potasio en el túbulo distal y colector, y el efecto crónico es el depósito de colágeno en riñón, miocardio y en la pared vascular. La síntesis y liberación de aldosterona es también estimulada por la hormona adrenocorticotrofina, la noradrenalina, la hormona antidiurética y la acetilcolina, por eso

los iECA y ARA producen sólo un bloqueo transitorio en la síntesis de aldosterona en el tratamiento crónico⁵.

La aldosterona se une a receptores de mineralocorticoides (RM) citoplasmáticos de acuerdo con Fuller & Young en 2005. Ellos han sido encontrados tanto en células endoteliales como musculares lisas lo que ha llevado a especular el que la aldosterona sintetizada y secretada localmente podría actuar de una forma paracrina y/o autocrina, dando lugar a que altas concentraciones locales de esta hormona podrían ocupar una gran cuantía de RM vecinos según Connell y cols. en 2008. La cuantía de la expresión de los RM se encuentra aumentada en variadas situaciones patológicas tales como en el paciente hipertenso. Una concentración elevada de aldosterona en sangre ha demostrado tener efectos cardio y nefrotóxicos tanto in vitro así como también en modelos experimentales animales. En pacientes portadores de hiperaldosteronismo se han descrito una mayor hipertrofia ventricular izquierda y una mayor fibrosis miocárdica al ser comparados tales parámetros con los de individuos portadores de hipertensión esencial, con lo que se aumento la sospecha de que incluso niveles moderados de hiperaldosteronismo pudiesen ser patológicos⁹.

Algunos de los efectos perjudiciales de la aldosterona son la pérdida de Mg^{2+} y K^+ al aumentar su excreción urinaria y el incremento de la retención de Na^+ ; potenciación de las catecolaminas; induce arritmias ventriculares así como hipertrofia y fibrosis miocárdica; regulación hacia arriba de receptores de Ang II; aumento de la síntesis de PAI-1, por lo que se inhibe la fibrinólisis; atenuación de los barorreflejos; desarrollo de nefrosclerosis maligna; eleva la presión arterial; interfiere con la producción de NO endotelial, con la consecuente generación de disfunción endotelial (**Figura 21**)^{9, 93}.

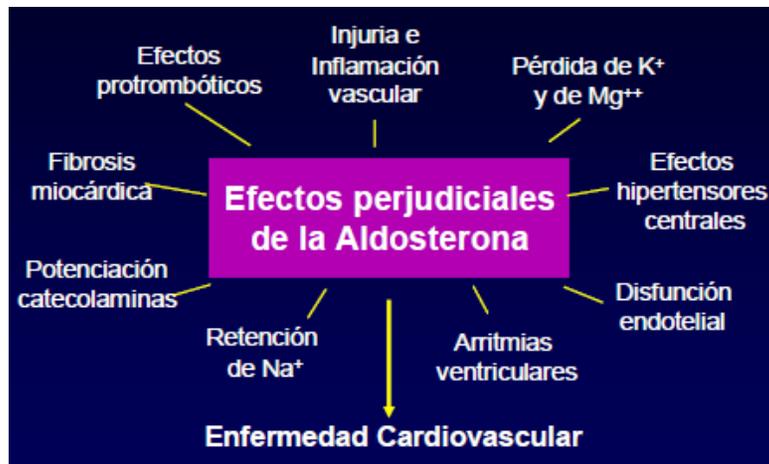


Figura 21. Efectos perjudiciales de la Aldosterona⁹³.

5.9 Formación de Angiotensina II

5.9.1 Vía dependiente de la ECA

Como se ha mencionado anteriormente, el SRAA es una cascada que consiste en una serie de interacciones entre enzimas y sustratos que comienza en el aparato yuxtaglomerular con la síntesis de la renina, esta actúa liberando al decapeptido Ang I del extremo amino del angiotensinógeno, posteriormente la ECA remueve el dipéptido His-Leu en el extremo carboxilo terminal de la Ang I (1-10) convirtiéndola en el octapéptido biológicamente activo Ang II (1-8)⁷⁷.

5.9.2 Vía independiente de la ECA

La Ang II se puede formar también por vías alternas independientes de ECA, como la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, enzima generadora de Ang II sensible a quimostatina o CAGE, (teniendo como sustrato a la Ang I) y a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato el angiotensinógeno). El papel de estas vías alternas no está entendido totalmente, sin embargo, su activación puede tener importancia en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas^{23, 77, 91}.

En el año 2000 Hollenberg describió variaciones entre especies en cuanto a la vía predominante de conversión de Ang I a Ang II en el corazón. En humano, perro y hamster se ha documentado que la conversión de Ang I en Ang II es debida a la presencia de quimasa. Estudios en corazones de humano y perro muestran que la quimasa es responsable de más del 90% de la formación de Ang II en extractos tisulares, mientras que la ECA es la encargada de la conversión de más del 80% de Ang II en el lecho coronario. Wei y cols. sugieren que hay diferentes compartimientos a nivel cardiaco, los cuales presentan variaciones en las vías enzimáticas encargadas de la conversión de Ang I a Ang II, que pueden cambiar en presencia de una patología. Hollenberg propone que en rata la generación de Ang II depende prácticamente de la ECA, pero existe la posibilidad de que vías de conversión de Ang alternas a ECA, sean importantes en estados patológicos²³.

La quimasa es una serina proteinasa presente en los gránulos secretores de las células cebadas que ha sido detectada en el ventrículo izquierdo, la cual adquiere la capacidad de actuar enzimáticamente transformando la Ang I en Ang II luego de que las células cebadas son activadas por un fuerte estímulo como puede ser la injuria vascular producida por catéter⁹³.

Se ha observado que en ratas la quimasa no hidroliza Ang I para formar Ang II, sino que favorece la degradación de Ang II, por lo que las vías enzimáticas independientes de ECA probablemente son de otra naturaleza²³.

En corazones isquémicos o hipóxicos la formación de Ang II es dada por una vía independiente de la ECA, mientras que en ratas normotensas e hipertensas esta conversión está mediada prioritariamente por la ECA^{23,93}.

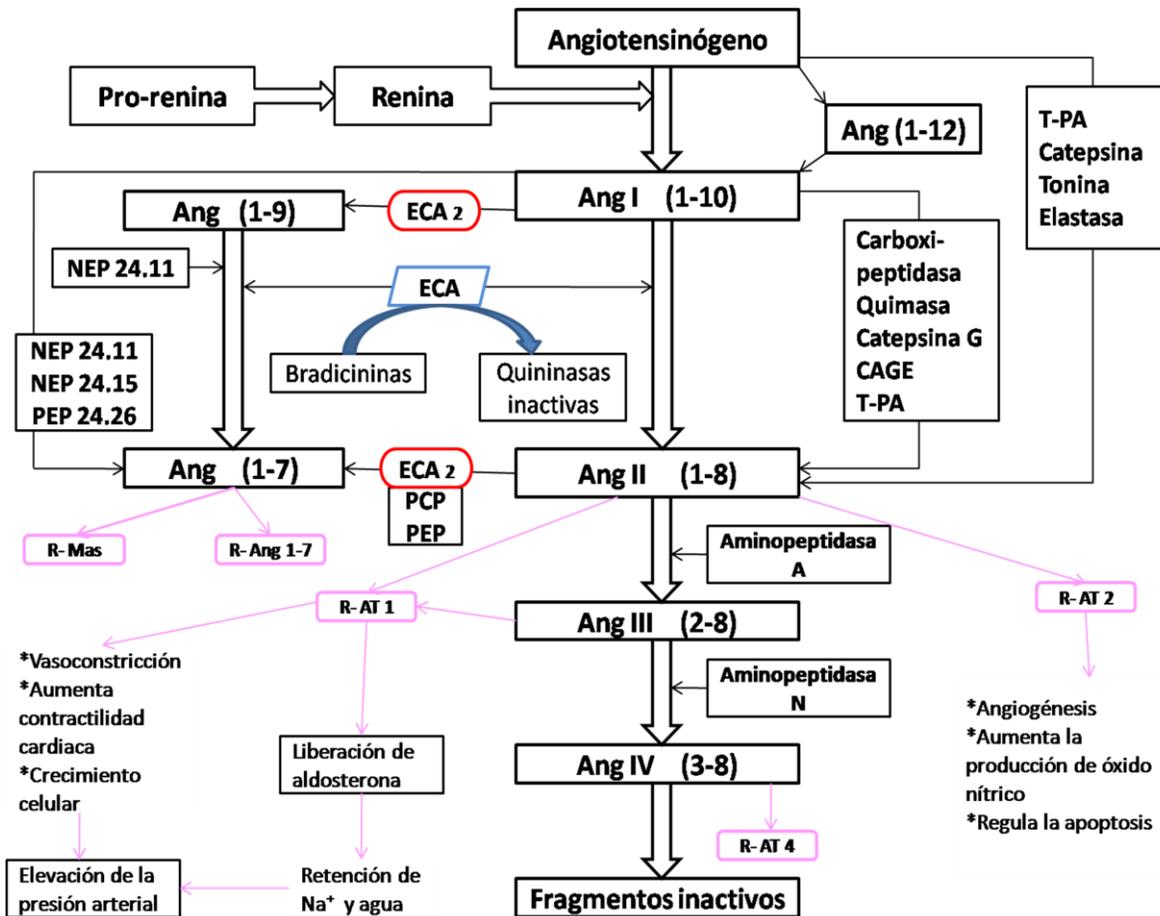


Figura 22. Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). (Modificado de Santeliz y cols. 2008)

6.0 INFARTO MIOCÁRDICO

La obstrucción parcial del flujo de sangre en las arterias coronarias suele causar isquemia coronaria, ésta generalmente produce hipoxia que debilita las células sin darles muerte. El infarto al miocardio se define por la muerte celular patológica debido a la isquemia prolongada^{7, 104}.

La Organización Mundial de la Salud sobre la base de estudios de prevalencia, definió el infarto agudo al miocardio (IAM) mediante la presencia de por lo menos dos de los siguientes criterios: 1) cuadro clínico, 2) elevación de marcadores bioquímicos de daño miocárdico, 3) cambios en el ECG característicos con presencia de ondas Q patológicas (Figura 23)^{33, 48}.

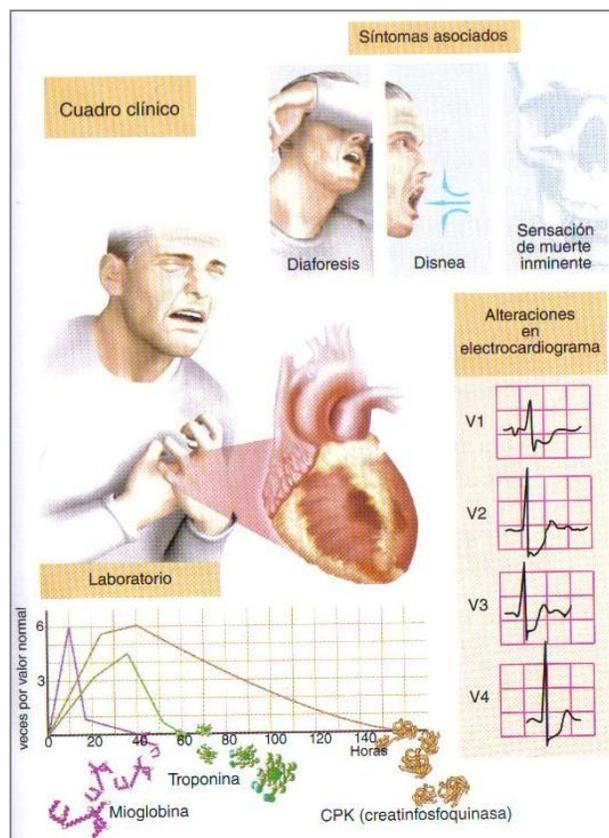


Figura 23. Triada diagnóstica en el IAM⁴⁸.

El IAM se caracteriza por dolor torácico (aunque algunos pacientes experimentan infartos indoloros o infartos silentes), opresión o malestar precordial opresivo, que puede

extenderse al epigastrio, la mandíbula, el miembro superior izquierdo o el dorso, el cual se prolonga aproximadamente 30 min y se percibe durante el esfuerzo o en reposo. Suele asociarse con disnea, diaforesis, náuseas y vómitos, mareos y síncope^{4, 33, 48}.

Tabla 4. Diferentes aspectos en el infarto agudo del miocardio³³.

Patología	Muerte celular miocárdica
Clínica	Síntomas isquémicos
Bioquímica	Biomarcadores de muerte celular en estudios de sangre
ECG	Evidencia de isquemia miocárdica (cambios del segmento ST) Evidencia de tejido con pérdida de actividad eléctrica (ondas Q)
Alteraciones funcionales	Reducción o pérdida de perfusión tisular. Anormalidades en la contractilidad parietal del corazón

6.1 Fisiopatología

El infarto al miocardio se presenta cuando hay una oclusión coronaria de origen trombótico que se produce tras la ruptura de una placa de ateroma vulnerable, fenómeno que depende de la relación sinérgica de diferentes factores: a) Factores relacionados con la misma placa: superficie y profundidad de la ruptura, tipo de colágeno contenido en la placa, presencia de material lipídico, niveles de tromboplastina tisular etc.; b) Factores relacionados con la coagulación: hipercoagulabilidad sanguínea como los niveles de fibrinógeno o factor VII elevados, aumento de la agregabilidad plaquetaria, entre otros y c) Factores relacionados con la pared del vaso y el flujo sanguíneo⁴.

En más del 80% el principal mecanismo fisiopatogénico es la ruptura de una placa asociada a inflamación, trombosis aguda, (aterotrombosis) vasoconstricción y microembolización. La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico de las capas íntimas y media de las arterias, que consiste en la acumulación de lipoproteínas ricas en colesterol y triglicéridos y de un infiltrado de células mononucleares y fibroblastos. Al sustrato anatómico se le denomina “placa”, la cual obstruye parcial o totalmente el vaso involucrado, dicha obstrucción provoca la ruptura de la placa exponiendo elementos al torrente sanguíneo como el colágeno y el factor tisular estimulando la agregación

plaquetaria y la vía extrínseca respectivamente, llevando ambos a la formación de un trombo oclusivo que causa la detención absoluta de la irrigación del vaso involucrado y con ello el infarto al miocardio^{15, 33, 89}.

Así el infarto al miocardio resulta en la migración de macrófagos, monocitos y neutrófilos en la zona del infarto, lo que inicia la señalización intracelular y la activación neurohormonal, que localiza la respuesta inflamatoria. Los cambios en la circulación hemodinámica se determinan principalmente por la magnitud de la pérdida de miocitos, la estimulación del sistema nervioso simpático, el SRAA y la liberación de péptidos natriuréticos⁹⁷.

El daño después de un infarto al miocardio lleva a una remodelación, que se caracteriza por cambios moleculares, celulares e intersticiales y se ha dividido en una fase temprana (dentro de las 72 horas) y una fase tardía (después de 72 horas). La primera fase consiste en la expansión de la zona de infarto. La fase tardía implica la dilatación del VI, hipertrofia de los miocitos y la fibrosis intersticial. La remodelación ventricular izquierda a menudo conduce a la disfunción ventricular izquierda, miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. Las alteraciones adversas en el corazón después de un infarto al miocardio se asocian con un marcado aumento en la morbilidad y la mortalidad cardiovascular^{72, 86, 97}.

6.2 Tipos de infarto al miocardio

El tipo de infarto que se presenta está dado de acuerdo con el tamaño y la localización de la necrosis así como, de la duración de la oclusión y la existencia previa de vasos colaterales, los cuales pueden haberse formado anteriormente y haber nutrido la parte del miocardio que no es irrigada por la arteria coronaria obstruida^{48, 55}.

6.2.1 Infarto dependiente del tamaño

De acuerdo con la extensión parietal de la necrosis, el infarto se clasifica en transmural, subendocárdico o intramural (**Figura 24**).

6.2.1.1 Infarto transmural o Infarto con onda Q.

En el infarto transmural la oclusión coronaria es prolongada y se llega a necrosar el grosor completo de la pared del corazón desde el endocardio hasta el epicardio. Este tipo de infartos presentan la aparición de ondas Q en el ECG, por lo que se les conoce también como infarto con onda Q^{48, 55}.

El infarto transmural suele ser más extenso y afecta la contractilidad de una parte del corazón, así como también presenta un mayor riesgo de complicaciones tanto a corto como a largo plazo⁵⁵.

6.2.1.2 Infarto subendocárdico o Infarto sin onda Q

En el infarto subendocárdico generalmente el tiempo de oclusión es corto o existe una abundante circulación colateral lo que produce un infarto pequeño que no afecta al grosor completo de la pared del corazón, sino a las capas más internas (el endocardio), por lo que se preserva la viabilidad y la funcionalidad de las capas más externas. Este tipo de infartos suelen tener una buena evolución, sobre todo si la arteria comprometida es reparada o se revasculariza mediante trombólisis o angioplastia dentro de las primeras horas del evento. En los infartos subendocárdicos no aparecen ondas Q en el ECG, solo se asocian con cambios en el ST-T por lo que se conocen también como infartos sin onda Q^{48, 55}.

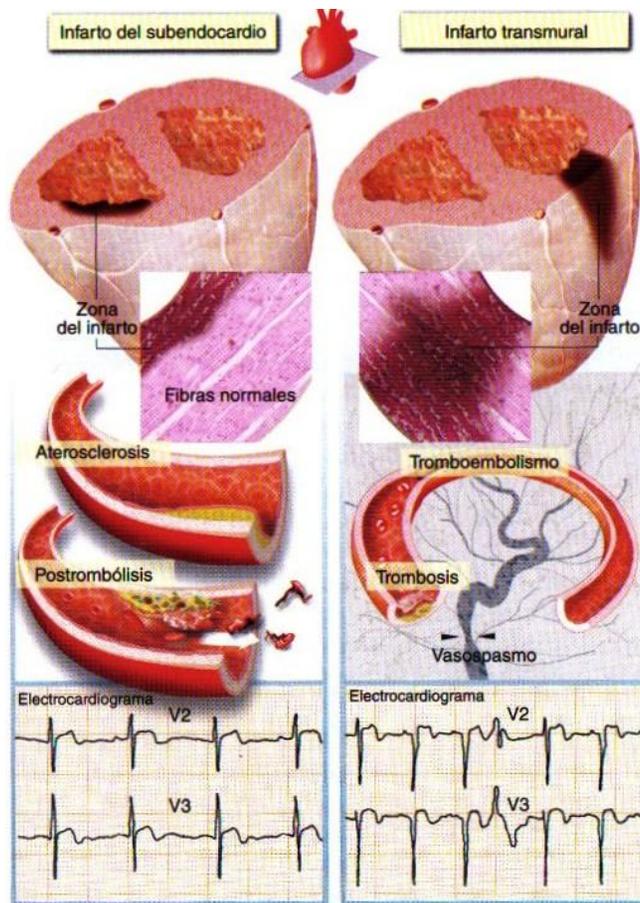


Figura 24. Tipos de infarto al miocardio de acuerdo a su tamaño⁴⁸.

6.2.2 Infartos de acuerdo a su localización

Por su localización, los infartos al miocardio pueden ser:

- a) Anteriores o anterolaterales: cuando se obstruye la arteria descendente anterior
- b) Posteriores o posterolaterales: si se obstruye la arteria circunfleja
- c) Inferiores o inferolaterales: cuando se afecta la coronaria derecha (**Figura 25**)^{48, 55}.

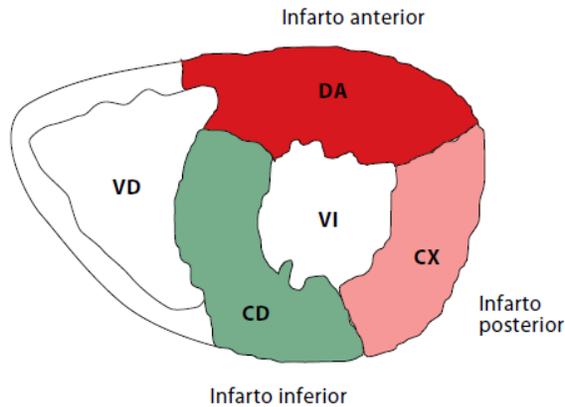


Figura 25. Tipos de infarto al miocardio de acuerdo a su localización. VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; DA: arteria coronaria descendente anterior; CX: arteria coronaria circunfleja; CD: arteria coronaria derecha⁵⁵.

6.3 Factores de riesgo.

Los factores de riesgo cardiovascular se pueden dividir en factores modificables y no modificables. Los no modificables son: la edad varones por encima de los 40 años, mujeres post-menopáusicas, el género siendo el sexo masculino al tener más predisposición por carecer de la protección de los estrógenos, antecedentes familiares y factores de predisposición genéticos. Los factores modificables son la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la diabetes mellitus, la hipertensión, la obesidad, el sedentarismo y el estrés. Otros factores de riesgo cardiovascular son la homocisteinemia, una elevación sanguínea de homocisteína, un aminoácido tóxico que se eleva con bajos niveles o insuficientes en la ingesta de vitamina B2, B6, B12 y ácido fólico, así como mujeres que usan pastillas anticonceptivas combinadas, las cuales tienen un modesto aumento de riesgo de sufrir un infarto al miocardio, en especial en presencia de otros factores como el hábito de fumar^{4, 48}.

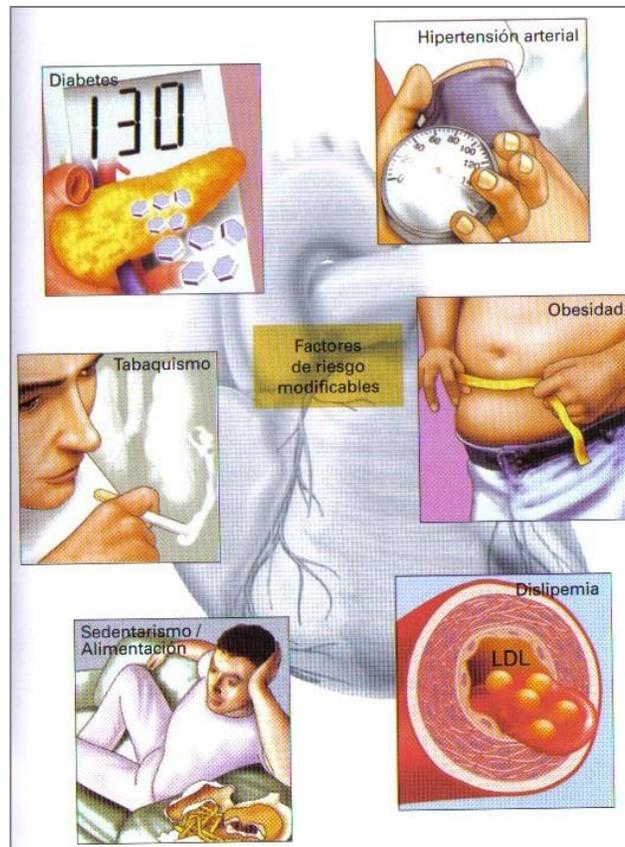


Figura 26. Factores de riesgo cardiovascular⁴⁸.

6.4 Incidencia e importancia del estudio del infarto al miocardio.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares, entre ellas el infarto al miocardio y el accidente cerebrovascular, cobran 17.5 millones de vidas al año en el mundo. Durante el 2007, en México, poco más de 87 mil personas fallecieron a causa de alguna enfermedad del corazón, siendo ésta la principal causa de muerte de hombres y mujeres (Tablas No. 5 y 6). Ya que estas enfermedades se pueden prevenir al cambiar estilos de vida, malos hábitos y conductas de riesgo, es de gran importancia favorecer su prevención^{39, 76}.

Tabla 5. Principales causas de defunción de mujeres en México en 2007 ³⁹.

Orden de Importancia	Causas	Defunciones	Porcentaje
1	ENFERMEDADES DEL CORAZÓN b/	41,877	18.26%
2	DIABETES MELLITUS	37,202	16.22%
3	TUMORES MALIGNOS	33,455	14.58%
4	ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES	15,362	6.69%
5	ACCIDENTES	9,047	3.94%
6	ENFERMEDADES DEL HÍGADO	8,001	3.48%
7	ENFERMEDADES PULMONARES OBSTRUCTIVAS CRÓNICAS	6,876	2.99%
8	CIERTAS AFECCIONES ORIGINADAS EN EL PERÍODO PERINATAL c/	6,358	2.77%
9	INFLUENZA Y NEUMONÍA	5,969	2.60%
10	INSUFICIENCIA RENAL	4,758	2.07%
TOTAL DE DEFUNCIONES DE MUJERES EN 2007		229,336	100%

b/ Se excluye paro cardíaco
c/ Incluye tétanos neonatal

Tabla 6. Principales causas de defunción de hombres en México en 2007 ³⁹.

Orden de Importancia	Causas	Defunciones	Porcentaje
1	ENFERMEDADES DEL CORAZÓN b/	45,301	15.9%
2	DIABETES MELLITUS	33,310	11.69%
3	TUMORES MALIGNOS	31,654	11.11%
4	ACCIDENTES	30,275	10.62%
5	ENFERMEDADES DEL HÍGADO	22,549	7.91%
6	ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES	13,912	4.88%
7	CIERTAS AFECCIONES ORIGINADAS EN EL PERÍODO PERINATAL c/	8,610	3.02%
8	ENFERMEDADES PULMONARES OBSTRUCTIVAS CRÓNICAS	8,552	3.00%
9	AGRESIONES	7,776	2.72%
10	INFLUENZA Y NEUMONÍA	6,956	2.44%
TOTAL DE DEFUNCIONES DE HOMBRES EN 2007		284,910	100%

b/ Se excluye paro cardíaco
c/ Incluye tétanos neonatal

En 2007, del total de egresos hospitalarios en México (18, 536, 322), las enfermedades relacionadas con problemas cardiacos representan menos de uno por ciento (89 mil 773 casos). Este tipo de enfermedades se encuentran presentes en toda la población. En el

análisis de la población con alguna afección cardíaca por sexo, se observa que las cinco principales enfermedades cardiovasculares entre los hombres son el infarto agudo al miocardio (7.7%), seguido de otras enfermedades cerebrovasculares (6.5%), hipertensión esencial (primaria) (4.7%), enfermedad isquémica crónica del corazón (4.4%) y hemorragia intraencefálica (4.3%). Mientras que entre las mujeres son: otras enfermedades cerebrovasculares (7.3%), seguidas de hipertensión esencial (primaria) e infarto agudo al miocardio (ambas con 6.4%), insuficiencia cardíaca (4.6%) y la enfermedad isquémica crónica del corazón (4.5%)⁹⁵.

Datos sobre la población que presentan alguna afección cardíaca indican que: cerca del 50% de los niños menores de 5 años han presentado cardiomiopatías o insuficiencias cardíacas, enfermedades relacionadas con alteraciones durante la etapa fetal; así mismo, en 3 de cada 10 niños de 5 a 14 años se reportan complicaciones con su sistema circulatorio por hemorragias intraencefálicas (18.5%) y por otras hemorragias intracraneales no traumáticas (16.5%); de igual forma, cerca del 30% de la población de 15 a 44 años, han sufrido de hemorragia intraencefálica (16.5%) y enfermedades renales hipertensivas (13.7%)⁹⁵.

El 20.5% de la población de 45 a 54 años con alguna complicación cardíaca tuvo un infarto agudo al miocardio, seguida por otras enfermedades cerebrovasculares (15.2%) y por hipertensión esencial (14.2%). En los adultos de 65 años y más, el conjunto de otras enfermedades cerebrovasculares se observa el porcentaje más alto de egreso (20.2%), seguido por el infarto agudo al miocardio (19.2%) y la hipertensión esencial (15.3%)⁹⁵.

Tabla 7. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por enfermedades del sistema circulatorio para cada grupo de edad en 2007⁹⁵.

Enfermedades del Sistema Circulatorio	Grupos de edad					
	< 1 año	De 1 a 4 años	De 5 a 14 años	De 15 a 44 años	De 45 a 64 años	65 y más años
Hipertensión esencial primaria	1.0	10.0	5.5	10.8	14.2	15.3
Enfermedad renal hipertensiva	0.2	1.6	5.1	13.7	7.7	4.9
Infarto agudo al miocardio	0.6	0	0.4	11.3	20.5	19.2
Enfermedad isquémica crónica del corazón	0.2	0	0.4	3.4	9.2	13.8
Cardiomiopatía	32.9	15.2	21.3	5.1	1.8	0.9
Insuficiencia cardiaca	19.5	30.0	13.8	10.5	8.8	10.6
Complicaciones y descripciones mal definidas de enfermedad cardiaca	8.0	5.6	3.9	1.6	1.0	1.1
Hemorragia subaracnoidea	3.4	7.2	9.1	11.5	6.5	2.7
Hemorragia intracéfálica	16.7	7.6	18.5	16.5	13.9	10.1
Otras hemorragias intracraneales no traumáticas	17.1	8.4	16.5	2.8	1.4	1.2
Otras enfermedades cerebrovasculares	0.4	14.4	5.5	12.7	15.2	20.2

Se excluyeron del análisis las enfermedades relacionadas con circulación pulmonar

6.5 SRAA en el infarto al miocardio.

El SRAA juega un papel clave en la remodelación estructural y funcional después de un infarto al miocardio. De acuerdo con Anavekar & Solomon en 2005 la Ang II desempeña un papel fundamental en el desarrollo de remodelado del VI después del IM. Se ha demostrado que el RNAm y los niveles de proteína para angiotensinógeno, la ECA y los receptores de la angiotensina se incrementan en corazones de rata después de un IM^{40, 86,}

⁹⁰.

Los receptores de Ang II AT₁ y AT₂ juegan un papel crucial en la fisiología cardiovascular y la enfermedad. La señalización del receptor AT₁ contribuye a la remodelación cardíaca después de un infarto al miocardio por la mediación de la vasoconstricción, hipertrofia de los cardiomiocitos, la proliferación de fibroblastos y la deposición de colágeno intersticial⁸⁶.

El receptor AT₂ ejerce un efecto opuesto al receptor AT₁ en el sistema cardiovascular. Varios hallazgos experimentales han demostrado que AT₂ es regulado positivamente en condiciones patológicas, como la insuficiencia cardíaca, además desempeña un papel cardioprotector en el mecanismo de prevención de desarrollo temprano de la dilatación y la insuficiencia del VI después de un IAM. De acuerdo con Kaschina y cols. en 2008 la estimulación directa de AT₂ mejora la función sistólica y diastólica post-IM^{72, 86}.

Oishi y cols. en 2003 indicaron que la supresión de AT₂ en ratones knockout resultó en un mayor deterioro de la insuficiencia cardíaca y un aumento de la mortalidad después de un IM. Sin embargo, hay estudios opuestos que no apoyan un efecto cardioprotector para la sobreexpresión de AT₂. Se ha informado que la sobreexpresión crónica de AT₂ disminuye la contractilidad cardíaca en ratones transgénicos según Nakayama y cols. en 2005^{73, 86}.

La expresión de los receptores AT₁ y AT₂ en el tejido cardíaco está estrechamente regulada. Después de la inducción del infarto al miocardio por ligadura coronaria en ratas, se observó un aumento dependiente del tiempo en los niveles de los receptores AT₁ y AT₂ en el corazón durante la primera semana después del infarto. Recientes investigaciones, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), demostraron que aproximadamente el 40% de los cardiomiocitos de rata adulta expresaron receptores AT₁ y aproximadamente el 10% expresaron receptores AT₂. Estas proporciones se mantuvieron sin cambios después de la inducción del IAM en el día 1, sin embargo, en el día 7 después del infarto, los receptores AT₂ se expresaron en el 50% de los cardiomiocitos¹⁰⁵.

Gerc & Buksa en 2010 indicaron que los inhibidores farmacológicos del SRAA han demostrado una protección significativa contra el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca tanto en modelos animales y pacientes humanos. De acuerdo con Jugdutt & Menon en 2004 los bloqueadores de los receptores de angiotensina reducen la mortalidad y morbilidad cardiovascular en pacientes con insuficiencia cardíaca después de un IM. Los antagonistas del receptor AT_1 han demostrado mejorar la función cardíaca y la remodelación de la IC en los estudios clínicos y de animales. Se ha propuesto que el bloqueo de los receptores AT_1 aumenta la Ang II y la activación de los receptores AT_2 , lo que conduce a la cardioprotección, ya sea directamente o a través de cininas, aunque su papel fisiológico o fisiopatológico exacto no está claramente definido^{52, 86}.

Hay varios informes de la literatura que sugieren que el receptor AT_2 ejerce sus efectos protectores sobre el corazón post-IM a través de la interacción con el eje ECA2 – Ang (1-7) – Receptor Mas⁸⁶.

Estudios demuestran que la inhibición de ECA puede reducir la ampliación progresiva después de un infarto al miocardio en animales de experimentación, así como en los seres humanos. Varios estudios han examinado el efecto de los inhibidores de la ECA en la mortalidad después de un IM. La gran mayoría de estos ensayos han demostrado una disminución en la mortalidad cardiovascular y una disminución de la progresión de la insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes tratados con inhibidores de la ECA¹³.

Existen varios estudios que muestran el significado funcional de la ECA2 en la patofisiología cardiovascular. De acuerdo con los resultados de Ocaranza y cols. en 2010 en un modelo de remodelamiento miocárdico tardío post infarto al miocardio, existe un aumento en la actividad de ECA y de los niveles de Ang II junto con una disminución de la actividad de ECA2 y los niveles de Ang (1-9), éstos cambios en conjunto favorecen el desarrollo de fibrosis miocárdica e hipertrofia ventricular patológica en el área no infartada. La inhibición de la ECA así como el bloqueo del receptor AT_1 previnieron la

disminución de la actividad de ECA2 post-IAM y aumentaron significativamente los niveles de Ang (1-9). Estos resultados sugieren una inter regulación entre ECA y ECA2 en el remodelado miocárdico post-IAM, además que la Ang II podría ser el estímulo determinante de la expresión cardíaca de la ECA2, ya que la disminución de los niveles de Ang II o la prevención de su unión a los receptores AT₁ aumentaron los niveles del RNAm para ECA2^{27, 80}.

En un estudio realizado en ratas a las que se les ligó la arteria coronaria y que fueron medicadas con un bloqueador del receptor AT₁ durante todo el período del tiempo posterior al procedimiento, los resultados indicaron que a los 28 días post-IM, el RNAm de ECA2 mostró un aumento de tres veces en el miocardio viable¹³.

De acuerdo con Qi y cols. en 2011 la sobreexpresión de Ang (1-7) puede atenuar la isquemia inducida en la fisiopatología cardíaca⁸⁶.

Se ha reportado que tanto ECA2 y Ang (1-7) proporcionan efectos cardioprotectores contra la insuficiencia cardíaca y la hipertrofia cardíaca. El tratamiento crónico de Ang (1-7) no sólo atenúa el desarrollo de la insuficiencia cardíaca en el modelo del IM según estudios realizados por Ishiyama y cols. en 2004, también impide la hipertrofia cardíaca y la fibrosis en ratas⁸⁶.

7.0 FARMACOLOGÍA DEL INFARTO MIOCÁRDICO

El tratamiento farmacológico tras un infarto al miocardio es muy amplio e incluye: a) fármacos trombolíticos: como la estreptoquinasa, uroquinasa y alteplasa que disuelven los trombos a nivel coronario, la rápida administración de éstos limitan la extensión del infarto y mejora la supervivencia del paciente. La administración de ácido acetilsalicílico mejora el pronóstico y reduce el riesgo de reinfarto, b) analgésicos opioides: los cuales reducen el dolor, la actividad del sistema nervioso autónomo simpático y tienen efectos vasodilatadores por lo que ayudan a disminuir la carga cardíaca, c) diuréticos: son utilizados para tratar en algunos pacientes la insuficiencia cardíaca que se presenta como consecuencia del infarto, d) antieméticos: tras un infarto habitualmente se presentan náuseas y vómitos los cuáles se deben de tratar además de que el uso de opioides incrementan éstas condiciones, e) antiarrítmicos: debido a que una de las complicaciones del infarto es la aparición de arritmias, f) heparina: después de sufrir un infarto existe el riesgo de que se presente una trombosis venosa profunda o una embolia pulmonar, por lo que se suele administrar heparina de bajo peso molecular, g) nitratos: Son vasodilatadores que reducen la presión y el llenado ventricular (precarga) y, en menor grado, también la poscarga, lo que se traduce en un menor volumen cardíaco, lo cual disminuye la tensión en las paredes y con ello, el consumo de oxígeno en el miocardio. Los nitratos dilatan los vasos del sistema coronario a su máxima capacidad y mejoran el flujo sanguíneo colateral en el miocardio, h) β bloqueadores: Reducen la demanda de oxígeno en el miocardio, causada por disminución de la contractilidad y de la tensión en la pared miocárdica. Disminuyen la frecuencia cardíaca y la presión arterial, lo que disminuye la carga total de trabajo cardíaco. Al disminuir la frecuencia cardíaca, el periodo diastólico se prolonga, lo cual mejora el riego sanguíneo coronario además inhiben la liberación de renina, lo que aminora la formación de Ang II^{11, 29, 63, 75}.

7.1 Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA)

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) bloquean la enzima que favorece la transformación de Ang I a Ang II un potente vasoconstrictor. Así los iECA

disminuyen los niveles plasmáticos y tisulares de Ang II, de aldosterona (lo que produce una disminución de la retención de sodio y agua) y se inhibe el tono simpático. Además, dado que la ECA presenta una estructura similar a la quininasa II que degrada la bradicinina estos fármacos reducen la velocidad de inactivación de la bradicinina. Las quininas son potentes vasodilatadoras, liberan NO, prostaglandinas vasodilatadoras (E, y F,) que poseen propiedades vasodilatadoras y antiproliferativas que se oponen a las acciones tróficas de la Ang II, por lo tanto, las acciones antiproliferativas de los iECA son consecuencia de la inhibición de la síntesis de Ang II y del tono simpático así como del aumento de los niveles de quininas, NO y prostaglandinas^{29, 63, 88}.

Los iECA atenúan la resistencia vascular, el tono venoso y la presión sanguínea, y con ello también el gasto cardíaco. Éstos producen una vasodilatación arteriovenosa que es más marcada en niveles coronario, renal, cerebral y del musculo esquelético. Además, como inhiben la síntesis de Ang II, de aldosterona, aumentan el volumen minuto, el flujo sanguíneo y la síntesis de prostaglandinas renales, producen aumento de la diuresis y la natriuresis. A diferencia de otros vasodilatadores, no estimulan, sino que suprimen, la activación neurohumoral y no modifican la frecuencia y la contractilidad cardíacas, por lo que disminuyen las demandas miocárdicas de O₂ y mejoran los signos de isquemia cardíaca^{29, 63, 75}.

Diversos estudios (ISIS-4, GISSI-3, CCS y SMILE) han demostrado que en ausencia de insuficiencia cardíaca o de disfunción ventricular sintomática, la administración oral de un iECA desde las primeras 24 horas de evolución del infarto del miocardio durante 4-6 semanas reduce la mortalidad del 6-24 % (**Tabla 8**). En el estudio CONSENSUS-II, en el que se administró enalapril por vía IV en las primeras horas del infarto y se continuó el tratamiento por vía oral durante 6 meses, se constató que en los pacientes tratados con el iECA aumentaba la mortalidad al cabo de 30 y 180 días de evolución. El enalapril tampoco reducía el número de reingresos por insuficiencia cardíaca ni los episodios isquémicos, e incluso los pacientes tratados con él presentaron más episodios de

hipotensión, lo que podría reducir la presión de perfusión coronaria y aumentar la isquemia cardíaca y la mortalidad de los pacientes. Estos resultados plantean serias dudas acerca de la conveniencia de administrar un iECA por vía IV en las primeras horas postinfarto^{29, 63}.

Tabla 8. Resultados de los ensayos clínicos en los que se ha administrado un iECA en las primeras 24 horas del infarto de miocardio²⁹.

Estudio	SMILE	CONSENSUS-II	GISSI-3	ISIS-4	CCS
Pacientes	1.556	6.090	19.394	58.050	13.634
IM previo	Anterior	Sí	Sí	Sí	Sí
Tratamiento					
Inicio	6-24 horas	≤ 1 día	≤ 1 día	≤ 1 día	≤ 36 horas
Fármaco	Zofenopril	Enalapril IV	Lisinopril	Captopril	Captopril
Dosis (mg)	7,5-30	5-20	2,5-10	6,25-50	6,25-12,5
Dosis/día	2	2	1	2	3
Duración	12 meses	41-180 días	4 días	1 mes	28 días
Reducción de la mortalidad (%)	24	—	11	7,0	6,0
Pacientes tratados para salvar una vida	63	—	125	200	200

IM: infarto de miocardio; SMILE: Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation; CONSENSUS-II: Cooperative New Scandinavian Enalapril Survival Study II; GISSI-3: Grupo Italiano per lo studio della Sopravivenza nell'Infarto Miocardio; ISIS-4: Fourth International Study of Infarct Survival; CCS: Chinese Captopril Study.

Tras un infarto de miocardio se presentan cambios en el volumen y masa muscular ventricular a los que se denomina remodelado. A las pocas horas después del infarto, la fuerza ejercida por la presión intraventricular sobre la zona infartada produce primero su adelgazamiento y luego su expansión. Al cabo de unas semanas de evolución, el proceso de expansión se detiene debido a la formación de tejido fibroso y en el miocardio sano se produce una hipertrofia compensadora y una dilatación ventricular global progresiva, que conducen a la larga a la insuficiencia cardíaca. La administración crónica de un iECA a las 2-3 semanas del infarto reduce el volumen telediastólico del ventrículo izquierdo y aumenta la fracción de eyección, así como también reduce las hospitalizaciones y retrasa la

progresión hacia la insuficiencia cardíaca. Este efecto es más evidente en pacientes con infartos anteriores extensos, fracción de eyección inferior al 30 % y oclusión coronaria mantenida durante las primeras semanas de evolución. El posible efecto beneficioso de los iECA se explica por sus acciones vasodilatadoras (que reducen la presión y el estrés de la pared ventricular, y que facilitan la expansión de la zona necrótica), antitróficas, antiisquémicas (disminuyen las demandas miocárdicas de O₂) y cardioprotectoras²⁹.

7.2 Antagonistas de los receptores de Angiotensina II (ARA II)

La primera sustancia descubierta de este grupo de fármacos fue el losartán. Los ARA II bloquean directamente los efectos de la interacción de la Ang II en sus receptores AT₁. Estos fármacos en el corazón y los vasos sanguíneos, originan vasodilatación arterial y venosa e impiden las acciones cardíacas de Ang II, disminuyen la precarga, la poscarga y la demanda de O₂ por el miocardio así como también favorecen la circulación coronaria. Al bloquear las acciones tróficas en el corazón corrigen la hipertrofia ventricular y la fibrosis, lo cual mejora el funcionamiento cardíaco, mientras que en los vasos sanguíneos los ARA II reducen el grosor de la pared vascular, incrementan la luz del vaso y tienden a recuperar la función endotelial^{29, 56, 109}.

Los efectos principales y adversos de estos fármacos son parecidos a los de los iECA sin embargo al impedir las acciones de Ang II independientemente de la vía que se haya seguido para su formación aventajan a los iECA. Los ARA II al no producir la acumulación de cininas disminuyen la incidencia de presentar tos o el angioedema, por lo que constituyen una importante alternativa en pacientes en los que estas reacciones adversas les impiden seguir el tratamiento con un iECA. Al igual que los iECA, los antagonistas de los receptores AT₁ están contraindicados en pacientes con hiperpotasemia, con estenosis renal bilateral o con estenosis de la arteria renal con riñón único y en embarazadas^{56, 109}.

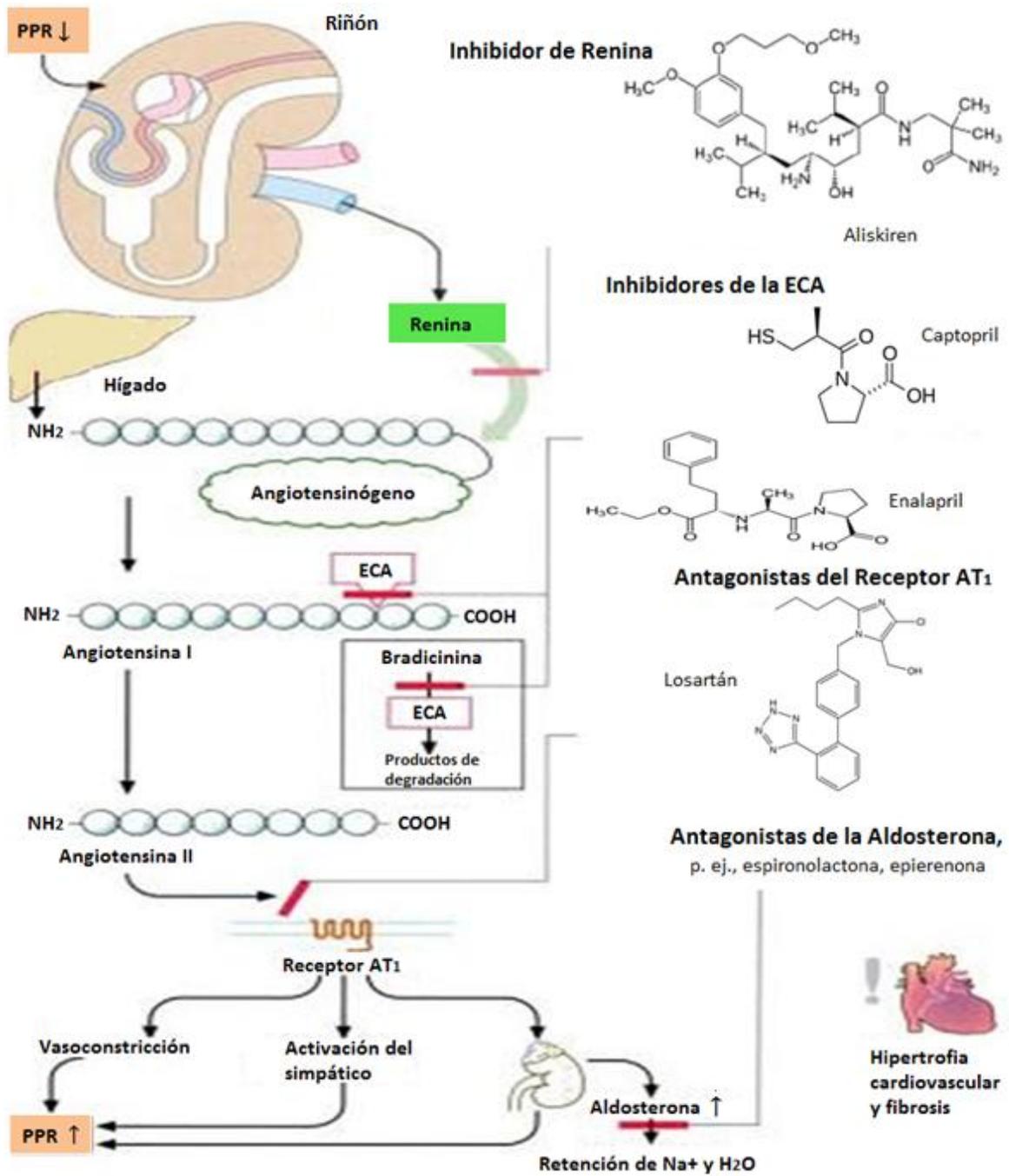


Figura 27. Inhibidores del SRAA⁵⁶.

8.0 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECA y ECA2 Y DE LOS RECEPTORES AT₁ y AT₂

Es importante considerar que los cuidados de las muestras así como de los reactivos empleados para realizar estas técnicas deben ser minuciosas, el investigador deberá usar guantes de látex mientras se encuentre trabajando con RNA y proteínas. Este paso ayudará a evitar la degradación de las biomoléculas por acción de las ribonucleasas o proteasas presentes en la superficie de las manos. El material biológico debe ser conservado a bajas temperaturas. Todas las muestras biológicas deben ser repartidas en alícuotas y en volúmenes pequeños para evitar etapas de descongelamiento o congelamiento drásticos que ocasionarían un eventual deterioro de las moléculas. Se recomienda que las puntas que se insertan en las micropipetas y que tienen contacto directo con las muestras sean nuevas y estériles, a fin de evitar una posible contaminación. Es posible trabajar con puntas previamente usadas, siempre y cuando estén libres de restos orgánicos y hayan sido previamente esterilizadas en autoclave. Con respecto a la manipulación de las proteínas, no se exige el uso de puntas nuevas pero sí se recomienda esterilizarlas previamente. Los reactivos a usarse durante los procesos de extracción y purificación de ácidos nucleicos y proteínas deben tener grado "biología molecular" para asegurar el éxito del procedimiento¹¹⁴.

8.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

8.1.1 Fundamento

El método de Bradford se basa en la cuantificación del complejo proteína-colorante y su comparación con diferentes cantidades de una proteína estándar albúmina de suero bovino (BSA), en donde el colorante azul brillante de coomassie G-250 al encontrarse en forma libre tiene una coloración roja y al formar el complejo obtiene un coloración azul la cual se puede medir a 595nm^{12, 35, 87}.

Este método es sensible (1-15 μg), rápido al tener una formación del complejo en 2 min, estable (1 h), simple, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas¹².

8.1.2 Equipo y reactivos

- Balanza
- Homogenizador
- Sonicador
- Centrifuga
- Microcentrífuga
- Lector de placas de ELISA
- Placas para ELISA
- Tubos eppendorf
- Micropipetas y puntas
- Reactivo de Bradford
- Stock de BSA
- Buffer que contiene PBS, EDTA, tritón y PMSF

8.1.3 Técnica

8.1.3.1 Preparación de la muestra de tejido

Pesar el tejido congelado en un tubo eppendorf y añadir 1 mL de Buffer que contiene PBS, EDTA, tritón y PMSF; homogenizar el tejido manteniéndolo en hielo, posteriormente sonicar el homogenizado durante 2 ciclos manteniéndolo en hielo, al finalizar centrifugar durante 10 min a 12000 rpm a 4 °C. Se separa el sobrenadante y se toman 10 μL a los cuales se les adicionan 990 μL de PBS, se toman 40 μL del sistema anterior y se añaden 160 μL de solución diluída de Bradford en una microplaca de 96 pozos.

8.1.3.2 Preparación de la curva estándar

Preparar una solución diluida de Bradford empleando 0.5 mL de reactivo de Bradford en 1.5 mL de agua desionizada. Preparar una solución stock de BSA 5 mg/mL. Los sistemas de la curva estándar se preparan en microtubos de 1.5 mL de acuerdo a la tabla siguiente:

Tabla 9. Curva estándar de BSA.

Vol de soln Stock de BSA (μL)	PBS (μL)	Proteínas (μg/ml)	Alícuota * (μL)	Soln diluída de Bradford * (μL)	Proteínas (μg)	Proteínas (μg/mL)
0	1000	0	40	160	0	0
80	920	400	40	160	16	80
100	900	500	40	160	20	100
120	880	600	40	160	24	120
140	860	700	40	160	28	140
160	840	800	40	160	32	160
180	820	900	40	160	36	180
200	800	1000	40	160	40	200

Las columnas marcadas con * en la tabla se colocan en una microplaca de 96 pozos y se realiza la lectura en un lector de placas de ELISA a 595nm.

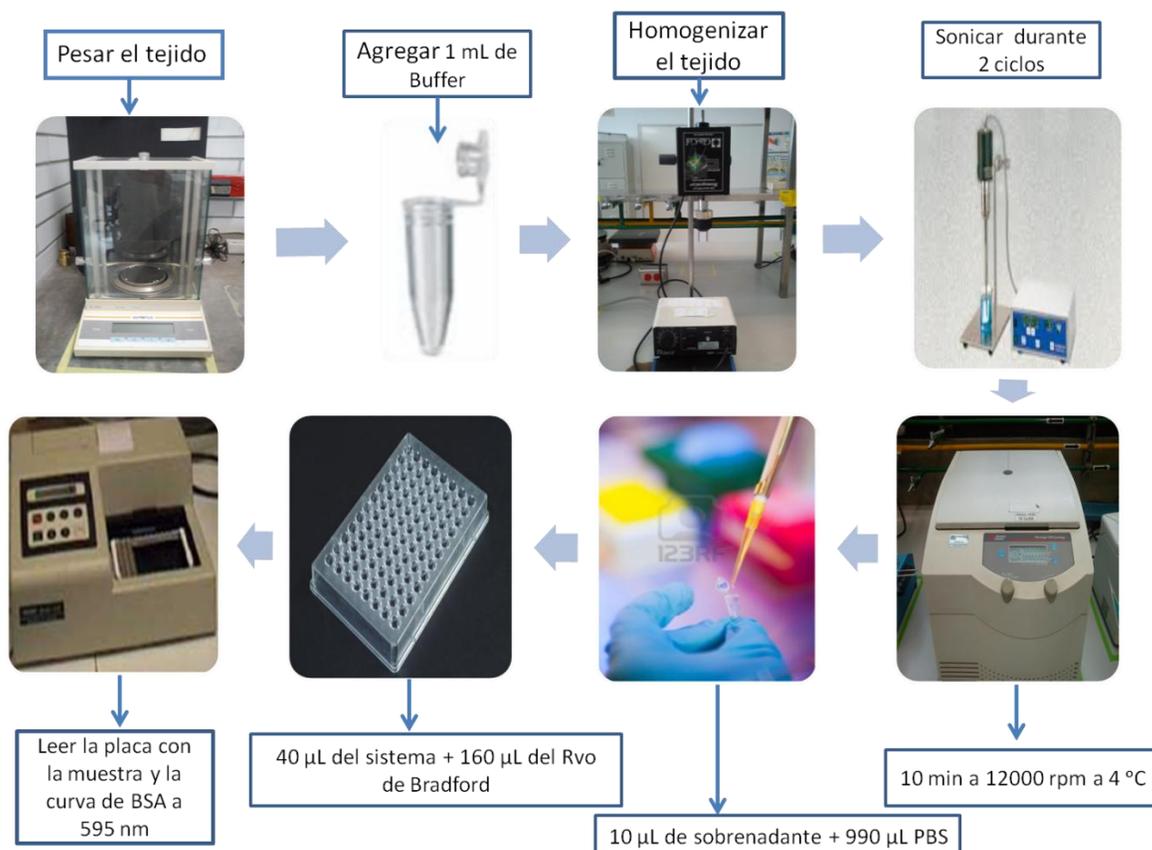


Figura 28. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

8.2 Western Blot

8.2.1 Fundamento

La técnica de Western Blot es una variante de la desarrollada por Edwin Southern para la separación de fragmentos de DNA (Southern Blot). El Western blot es una técnica analítica utilizada para la identificación de una proteína diana en una mezcla de proteínas complejas gracias a la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno. El método se basa en la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida, la transferencia (blotting) de dichas proteínas a membranas de nitrocelulosa o polivinildifluoruro (PVDF) y la posterior detección de una o más bandas proteicas identificadas por su unión con anticuerpos específicos. La migración de las proteínas se realiza en presencia de detergentes (Dodecil Sulfato de Sodio, SDS) a fin de que su migración dependa fundamentalmente del peso molecular (PM) de los péptidos (**Figura 29**)^{57, 62, 69}.

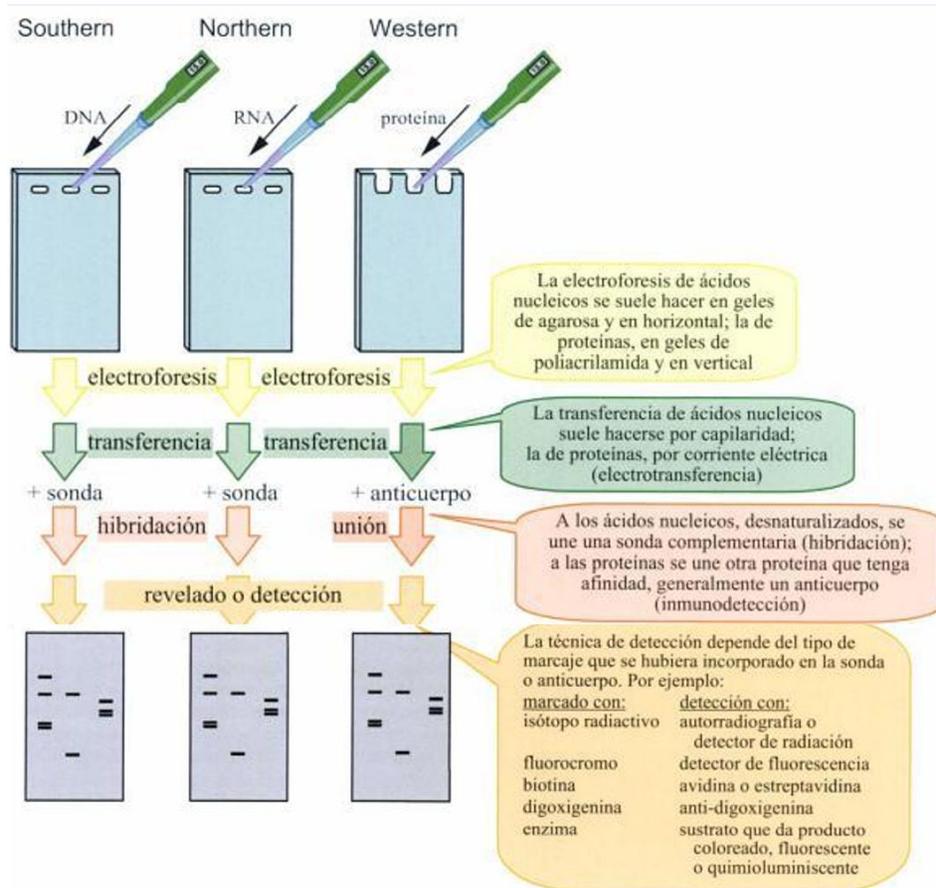


Figura 29. Comparaci6n de las t3cnicas Southern, Northern y Western blot⁵⁷.

8.2.2 Equipo y reactivos

- Micropipetas diversos volúmenes.
- Cámara de electroforesis vertical y accesorios.
- Fuente de poder.
- Microcentrifuga
- Calentador para tubos eppendorf
- Gradilla para tubos de 1.5 mL.
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Vasos de precipitados de 500 mL de capacidad.
- Gel separador (Acrilamida/Bis acrilamida 10%)
- Gel concentrador (Acrilamida/Bis acrilamida 4%)
- Buffer de carga
- Solución de poliacrilamida al 30%
- Buffer Tris-base 1.5 M pH= 8.8
- Buffer Tris-HCL 0.5M pH= 6.8
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%
- Persulfato de amonio (APS) al 10% recién preparado
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED solución stock)
- Agua bidestilada
- Buffer Tris-Glicina
- Buffer de transferencia SDS
- Solución desteñidora
- Azul de coomassie
- Tween 20
- Solución bloqueadora
- Anticuerpo primario
- Anticuerpo secundario
- Buffer TBS

- Membrana de nitrocelulosa o PVDF

8.2.3 Técnica

El procedimiento a seguir se puede marcar en tres grandes etapas: separación de las proteínas mediante electroforesis, transferencia e inmunodetección.

a) Separación electroforética: La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, éste método fue empleado por primera vez por Tiselius en 1937. Más tarde en 1959 Raymond & Weintraub emplearon un gel de poliacrilamida (PAGE) como soporte para la electroforesis y posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis & Ornstein. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970 y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)³⁴.

La separación de las proteínas por tamaño se hace mediante la influencia de un campo eléctrico que induce el movimiento de las proteínas a través de geles de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) en presencia de SDS, un detergente aniónico. La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de la electroforesis en gel de poliacrilamida es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2=\text{SO}_3-\text{Na}^+$. El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes disulfuro, como el beta mercaptoetanol (β ME) o el DTT desnatura las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. Se ha determinado que con 5 min a 95-100 °C es suficiente para la formación de enlaces estables SDS-proteína a una concentración de 1 % de SDS, en

presencia de EDTA y condiciones reductoras. Esto hace que en la mezcla las proteínas se muevan hacia el ánodo y se localicen de acuerdo con su peso molecular^{3, 34, 57}.

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además de que al variar la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, etc. Las condiciones óptimas de una buena separación, en la práctica se determinan experimentalmente, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. Una vez separadas las proteínas pueden ser visualizadas utilizando colorantes como el azul de Coomassie o la coloración de plata³⁴.

b) Transferencia: Mientras las proteínas están aún en la matriz del gel no pueden ser alcanzadas por los anticuerpos, por lo que después de la separación electroforética de las proteínas, éstas deben transferirse desde el gel de electroforesis a la membrana. Esto puede hacerse con procedimientos como la difusión, la capilaridad, por vacío o por electroelución (o transferencia electroforética), aunque éste último es el más ampliamente utilizado en la mayoría de las ocasiones por su rapidez y alta eficacia de

transferencia. Este método se basa en la movilidad electroforética de las proteínas para transferirlas desde el gel hasta la membrana e implica poner en contacto directo el gel de poliacrilamida con las proteínas con la membrana de nitrocelulosa o de cualquier otro material adecuado para la unión de las mismas, formando un sándwich entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora^{3, 19, 62}.

Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenían en el gel de poliacrilamida¹⁹.

c) Inmunodetección: para iniciar este paso previamente se deben de bloquear los sitios libres de la membrana no relacionados con las proteínas separadas, para evitar la unión inespecífica de los reactivos proteicos empleados para revelar la reacción. En la actualidad se utilizan una amplia variedad de soluciones de bloqueo (desde la simple leche hasta proteínas altamente purificadas) para bloquear los sitios sin reaccionar de la membrana. Estas soluciones de bloqueo incrementan la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de fondo (background) sin embargo, no todas son compatibles con todos los sistemas, por lo que están disponibles comercialmente una gran variedad de bloqueantes tanto en buffers TBS como PBS, dependiendo la elección del bloqueante más adecuado del propio antígeno así como de la enzima que se vaya a utilizar. La solución de bloqueo ideal se va a unir a todos los potenciales sitios de unión inespecífica de la membrana, eliminando todo el ruido de fondo sin alterar o bloquear los epítomos para la unión del anticuerpo primario. Como otros inmunoensayos, el Western Blot consiste en una serie de pasos de incubación con diferentes reactivos (soluciones de bloqueo, anticuerpos, etc.) separados por pasos de lavado. Estos lavados son necesarios para eliminar los excesos de reactivos no unidos ya que un lavado insuficiente de la membrana ocasionara un elevado ruido de fondo, mientras que un exceso del mismo puede ocasionar una disminución de la sensibilidad debido al lavado del antígeno y/o anticuerpo

de la membrana. Para realizar estos lavados, se pueden utilizar buffers fisiológicos como el TBS o el PBS a los que en la mayoría de los casos se les agrega un detergente como el Tween 20 (0.05%) para ayudar a eliminar el material unido inespecíficamente. Otra técnica muy utilizada es hacer los lavados con la solución de bloqueo diluido al que se le agrega detergente; esto suele ayudar a disminuir el ruido de fondo del ensayo. Posteriormente la membrana debe ser incubada con un anticuerpo primario contra la proteína de interés así como con un anticuerpo secundario, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores. Los anticuerpos primarios dependerán del antígeno que se desee detectar, pueden emplearse tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, los primeros son muy valorados por su gran especificidad, pureza y consistencia que originan un menor ruido de fondo mientras que los segundos son más baratos, su producción es más rápida y normalmente tienen una elevada afinidad por su antígeno. Existe una gran variedad de anticuerpos secundarios marcados de diferentes maneras para la detección del Western Blot. Su elección depende de la especie en la que se haya obtenido el anticuerpo primario; es decir, si el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal de ratón, entonces el secundario debe ser un anticuerpo anti-ratón obtenido en un hospedador diferente del ratón. La elección del anticuerpo secundario depende también del tipo de marcaje que se desee (biotina, fluoróforos o enzimas). El marcaje con enzimas es usado ampliamente y es bastante sensible, las dos enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano (HRP) y hay una amplia variedad de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes disponibles comercialmente para cada enzima. La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis de los grupos fosfato de la molécula de sustrato originando un producto coloreado, fluorescente o la liberación de luz como producto. Su principal ventaja es que su tasa de reacción permanece lineal por lo que se puede incrementar la sensibilidad de la detección simplemente dejando la reacción durante más tiempo. La peroxidasa de rábano cataliza la oxidación de los sustratos por el peróxido de hidrógeno, originando un producto coloreado, fluorescente o la liberación de luz como producto. Su gran estabilidad, bajo costo y gran disponibilidad de sustratos hacen que sea la enzima de

elección para la mayoría de las aplicaciones. Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína. Los sustratos cromogénicos son los más ampliamente utilizados ya que el método de detección es más barato y sencillo; cuando estos sustratos entran en contacto con la enzima correspondiente, se transforman en productos insolubles coloreados que precipitan sobre la membrana, por lo que no necesitan ninguna instrumentación especial para realizar la visualización de los resultados. Para la HRP los sustratos más utilizados son el TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina), el 4-CN (4-cloro-1-naftol) y el DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina), mientras que para la AP, los más utilizados son el NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul), el BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) y el Fast Red (fosfato de naftol AS-MX + sal Fast Red TR). El proceso de la quimioluminiscencia se define como la emisión de energía en forma de luz a partir de una sustancia, como consecuencia de una reacción química. El luminol es uno de los sustratos más ampliamente utilizados y su oxidación en presencia de peróxido, origina la formación de un producto en estado excitado llamado 3-aminofalato, que al pasar a un estado de energía menor, emite fotones de luz^{3, 19}.

8.2.3.1 Ensamblaje de la cámara de electroforesis

Ensamblar los vidrios en el porta placas y una vez asegurados colocarlos en el soporte de alineación, esto se debe de realizar en una superficie plana y nivelada para que cuando se vierta la solución del gel dentro de la cámara se evite el derrame de la solución y la generación de una matriz desnivelada, la cual podría generar la distorsión del perfil de las bandas de las proteínas al final de la electroforesis.

8.2.3.2 Preparación de geles de poliacrilamida

Utilizar un sistema de geles discontinuos, se le denomina así porque está conformado por dos geles de poliacrilamida de resolución y empacamiento que presentan diferente

concentración, composición y pH. Ambos geles se encuentran unidos pero limitados por una fase de separación visible al trasluz. Debido a que en estado líquido ambos geles pueden mezclarse fácilmente, deben ser preparados por separado esperando la total polimerización del primero para continuar con la polimerización del otro. El gel de empacamiento o concentradores la matriz de poliacrilamida que tiene como característica retener a las proteínas manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel separador, se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras. Este proceso permite mejorar la resolución de las proteínas en la electroforesis. El gel de resolución o separador es la matriz de poliacrilamida donde las moléculas de DNA o proteínas, van a migrar generando un perfil de bandas o patrón electroforético. Dicho patrón varía de acuerdo al peso molecular de cada una de las moléculas y a la concentración del gel mismo¹¹⁴.

Preparar un gel separador al 4%, una vez finalizada la preparación de la solución, añadir los catalizadores APS y TEMED tratando de mezclar cada reactivo de manera uniforme en todo el volumen. Agregar la solución de poliacrilamida entre las placas de vidrio hasta 2/3 partes de la altura del vidrio. Dejar polimerizar a temperatura ambiente durante 15 a 30 min, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente.

El gel concentrador se preparará al 10%, al finalizar la preparación de la solución, agitar moderadamente sin hacer burbujas a fin de asegurar que el TEMED y el APS se distribuyan uniformemente en todo el volumen de la solución. Agregarlo entre los vidrios de la cámara y sobre el gel de separación ya polimerizado. Inmediatamente después, colocar el peine entre ambos vidrios secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que lleguen a derramarse. Dejar polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el tubo, una vez formado el gel retirar el peine.

Una vez que polimerizo el gel, colocar los vidrios en el disipador interno de tal manera que el vidrio pequeño se localice en la parte interna del disipador, y si sólo se correrá una placa, debe colocarse otro juego de vidrios en el disipador con el fin de poder contener el baño superior del buffer de corrida.

8.2.3.3 Preparación de la muestra

En un tubo eppendorf ajustar la muestra a una concentración de 40-60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína del sonicado obtenido para la cuantificación de proteínas en una relación 1:3 con buffer de carga. Centrifugar y calentar a 90 °C durante 5 min.

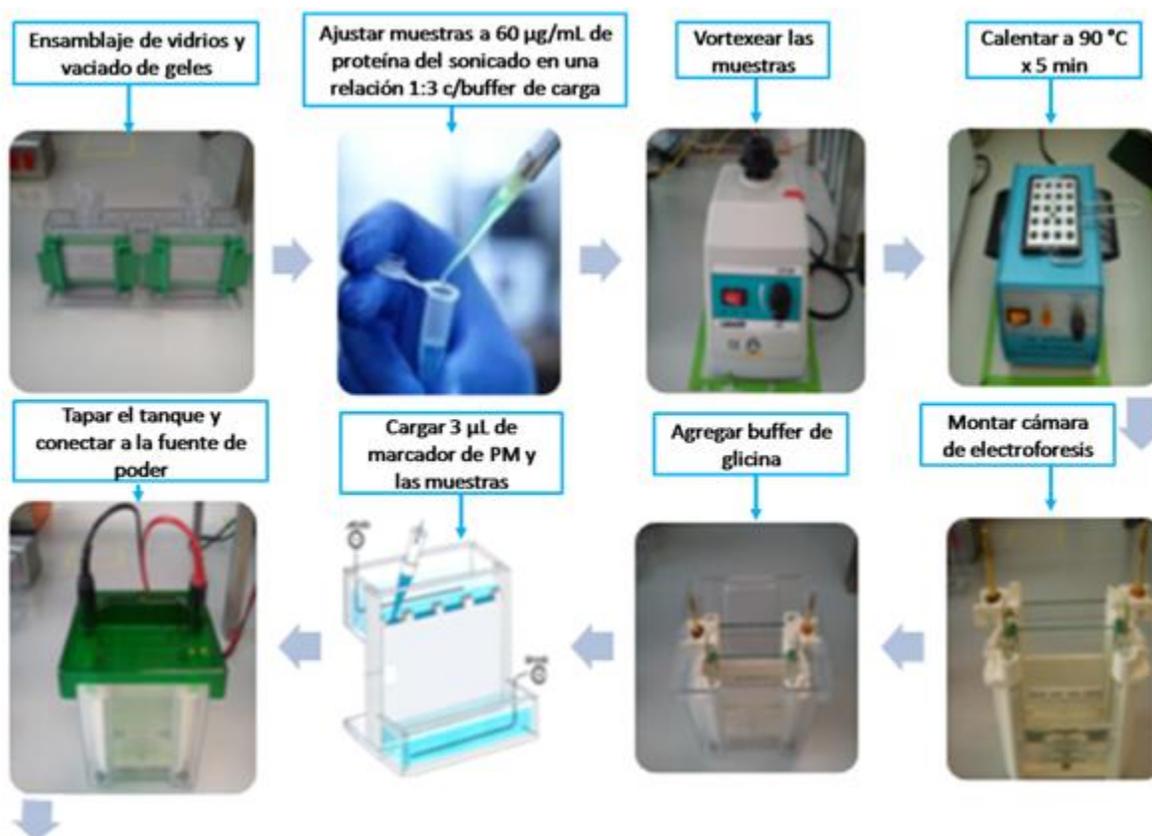
8.2.3.4 Electroforesis

Colocar el disipador en una cámara de electroforesis, posteriormente llenarla con buffer de glicina, asegurándose que los pocillos del gel se encuentren completamente sumergidos. Cargar 3 μL de marcador de peso molecular en un pocillo así como depositar cuidadosamente las muestras en los pocillos evitando la contaminación del pocillo contiguo, terminado esto cubrir el tanque con la tapa y conectar los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder. Encender la fuente de poder y proceder a seleccionar el voltaje y amperaje correspondientes. Las condiciones de la electroforesis serán: 80 V, 100 mA. Realizar la electroforesis hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) haya llegado a los límites de la parte inferior del gel. Finalizada la electroforesis desmontar el equipo y remover el sistema que contiene el gel de poliacrilamida. Separar el gel concentrador del gel de resolución realizando un corte transversal.

8.2.3.5 Transferencia

Una vez concluida la electroforesis, transferir las proteínas sin teñir a una membrana de PVDF previamente sumergida en metanol hasta que se encuentre traslúcida, para realizar la transferencia sumergir en buffer de transferencia el gel y la membrana así como fibras y

papel de filtro que permitan este proceso. Colocar en el siguiente orden los componentes: inserte el casete de plástico con el lado negro hacia abajo, poner una fibra encima, seguida de un papel filtro eliminando las burbujas de aire, poner el gel, la membrana de PVDF eliminando las burbujas de aire, colocar el papel filtro y la fibra, cerrar el casete. Colocar el casete de revelado haciendo coincidir la cara negra con su mismo color, introducir el dispositivo en el tanque de electroforesis junto con una tina de hielo, llenar la cámara con buffer de transferencia. Las condiciones de la corrida serán de 200 mA, 100 V durante 1 h. El bloqueo de la membrana se realizará en 10 mL de TBS 10X que contiene leche descremada al 5 % y 0.1 mL de Tween 20 al 1 %, durante 12 horas. Dejar teñir los geles con azul de Coomassie durante 12 horas. Lavar la membrana de transferencia con TBS 1X y Tween 20 al 1 %. Agregar el anticuerpo primario durante 1 h en agitación, posteriormente se añade el anticuerpo secundario bajo las condiciones anteriores, al término de cada incubación se realiza una serie de lavados a la membrana. El revelado de la membrana se realiza con 1 tableta de Diaminobencidina en 15 mL de buffer tris 1X adicionando 12 μ L de H_2O_2 (Figura 30).



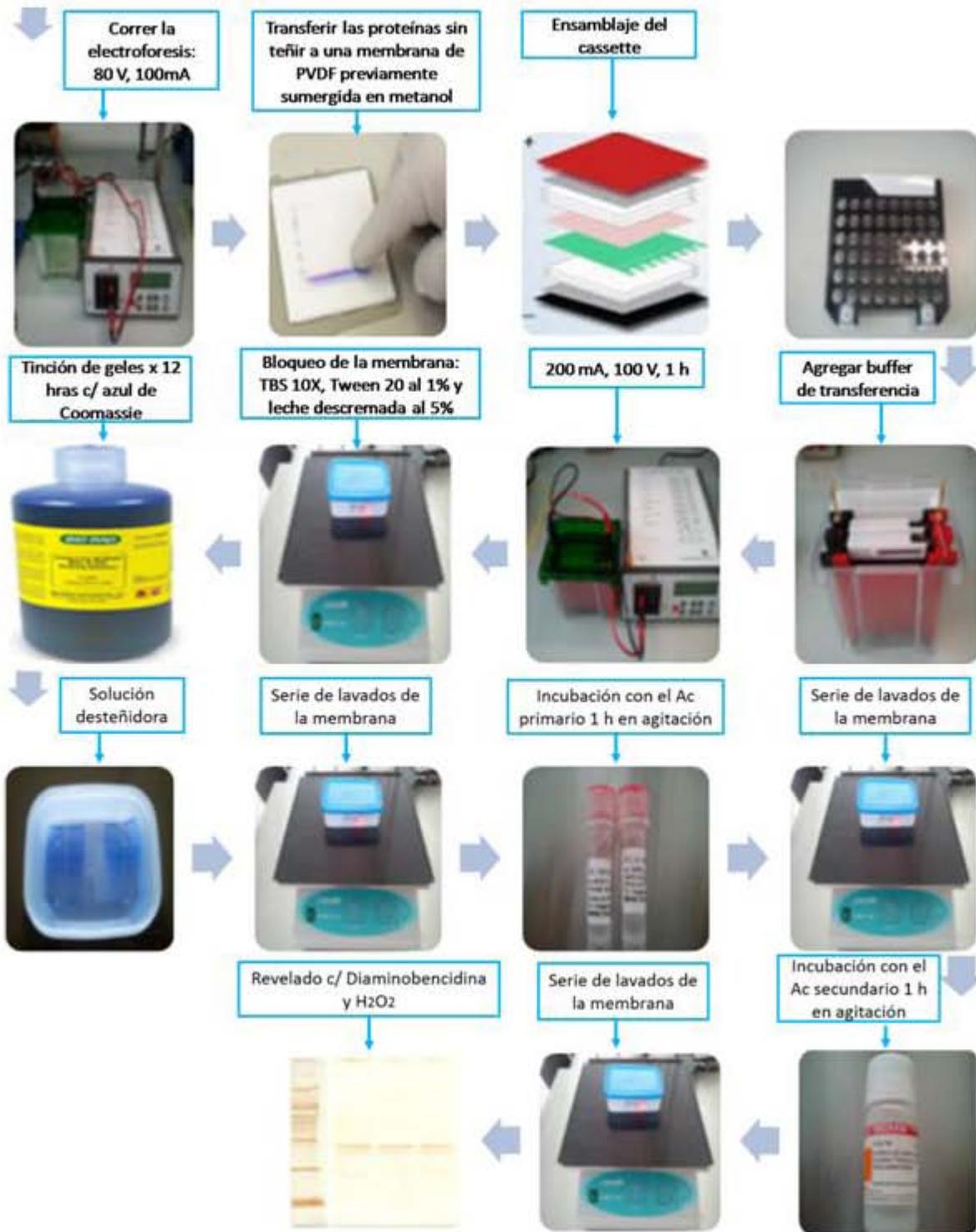


Figura 30. Metodología Western blot.

8.3 Aislamiento de RNA por el método del trizol.

8.3.1 Fundamento

El trizol es un reactivo empleado para el aislamiento del RNA total de células y tejidos. Es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante la homogenización o lisis de las muestras el trizol mantiene la integridad del RNA, mientras se destruyen las células y se disuelven los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida por centrifugación separa la solución en una fase acuosa (que contiene al RNA) y una fase orgánica (que contiene DNA y proteínas). El RNA recuperado de la fase acuosa es precipitado con alcohol isopropílico⁵⁰.

8.3.2 Equipo y reactivos

- Centrífuga refrigerada.
- Vortex
- Micropipetas diversos volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Microcentrifuga
- Nanodrop
- Cámara de electroforesis horizontal
- Agua tratada con DEPC (1:1000)
- Cloroformo - alcohol isoamílico
- Etanol al 75%.
- Isopropanol.
- Trizol

8.3.3 Técnica

Homogenizar el tejido congelado adicionando 1 mL de Trizol por cada 50 mg de tejido. (Emplear de 50-100 mg de tejido). Adicionar 200 µL de cloroformo-alcohol isoamílico por

cada 1 mL de Trizol usado para homogenizar. Agitar en el vortex vigorosamente por 15 segundos e incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar el homogenizado a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Remover la fase incolora (RNA total), colocarla en un tubo eppendorf y adicionar 0.5 mL de isopropanol por 1 ml de trizol usado en la homogenización (Rendimiento aproximado 600 µL). Mezclar las soluciones y permitir que el RNA precipite durante 1 día a -20 °C. Centrifugar a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Remover el sobrenadante y lavar el pellet de RNA dos veces usando 1mL de etanol frío al 75 %. Vortexear las muestras después de cada adición de alcohol y centrifugar a 10000 rpm por 7 min a 4 °C (Los viales se mantendrán en hielo durante todo el procedimiento). Secar el RNA por aproximadamente 10 min dentro del hielo y con el tubo eppendorf abierto. Suspender la muestra en 20 µL de agua DEPC y posteriormente colocarlas en hielo. Medir el volumen de la muestra y determinar la concentración de RNA total mediante el nanodrop. Correr la muestra en un gel de agarosa-formaldehído al 2 % para verificar la integridad del RNA (**Figura 31**).

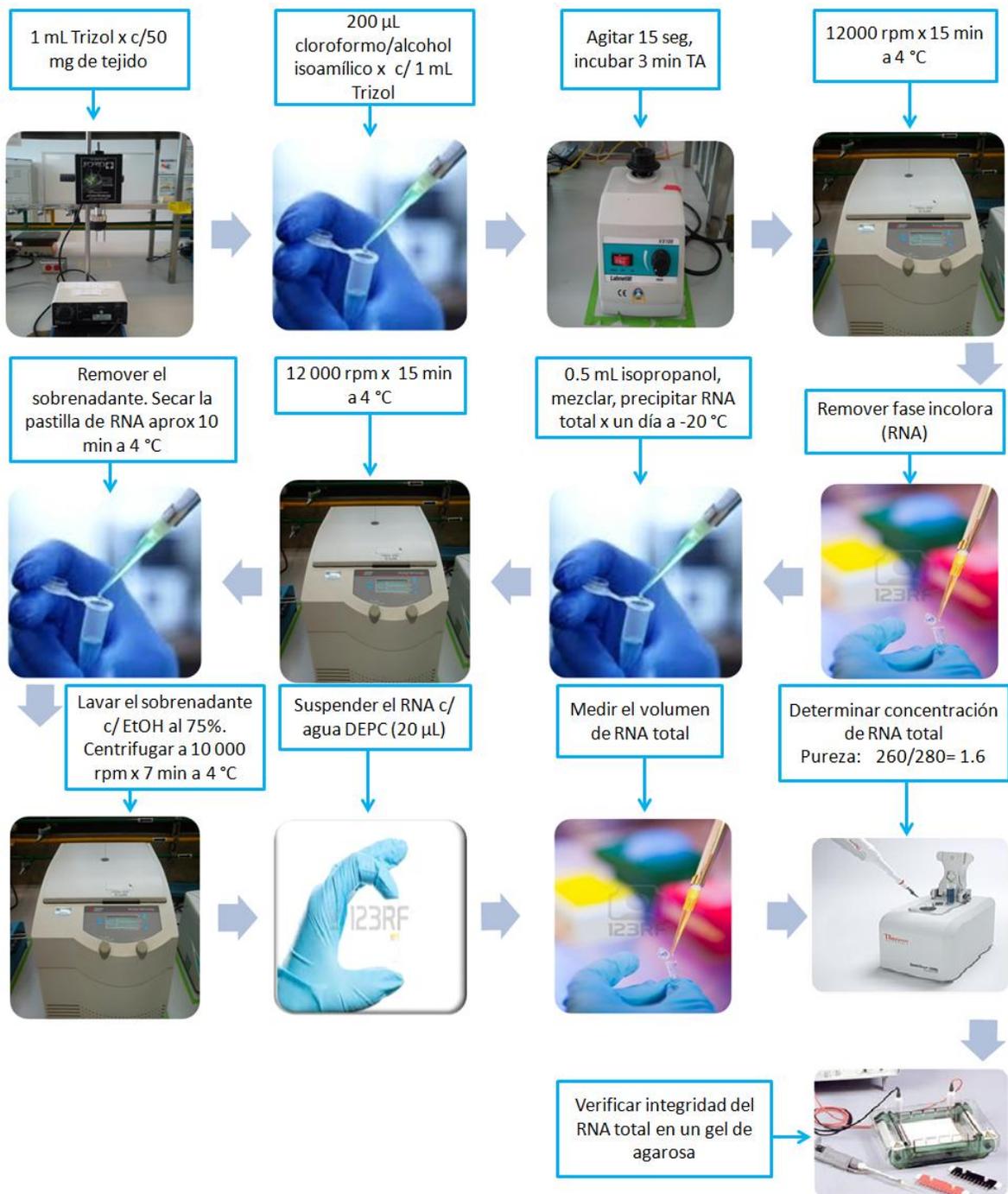


Figura 31. Aislamiento de RNA por el método del trizol.

8.4 PCR

8.4.1 PCR punto final

8.4.1.1 Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. En la reacción, si usamos como sustrato DNA genómico, entonces se habla de una PCR^{54, 57, 101}.

8.4.1.2 Etapas de la PCR

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (**Figura 32**).

Desnaturalización: En esta etapa, las cadenas de DNA son calentadas y separadas a una temperatura entre 68 y 97 °C durante 20-30 s. La temperatura de desnaturalización debe ser superior a la de fusión (T_m) de la región de DNA que se desea amplificar. El tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso^{54, 57, 101}.

Hibridación: En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que en el enfriamiento la temperatura este por debajo de la T_m ; generalmente se usan temperaturas entre 37-65 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo

será eficiente. La temperatura de fusión o melting (T_m), depende del contenido en pares de bases C≡G o A=T de la cadena de DNA. Mientras los pares de bases C≡G sean más abundantes que A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C≡G es más fuerte que A=T. La temperatura de fusión se calcula: $T_m = 4(\#G + \#C) + 2(\#A + \#T)$ ^{54, 57, 101}.

Extensión: Etapa de amplificación en la que la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador^{54, 57, 101}.

Las tres etapas mencionadas se repiten cíclicamente. El número de ciclos puede variar en un rango de 20 y 40 ciclos.

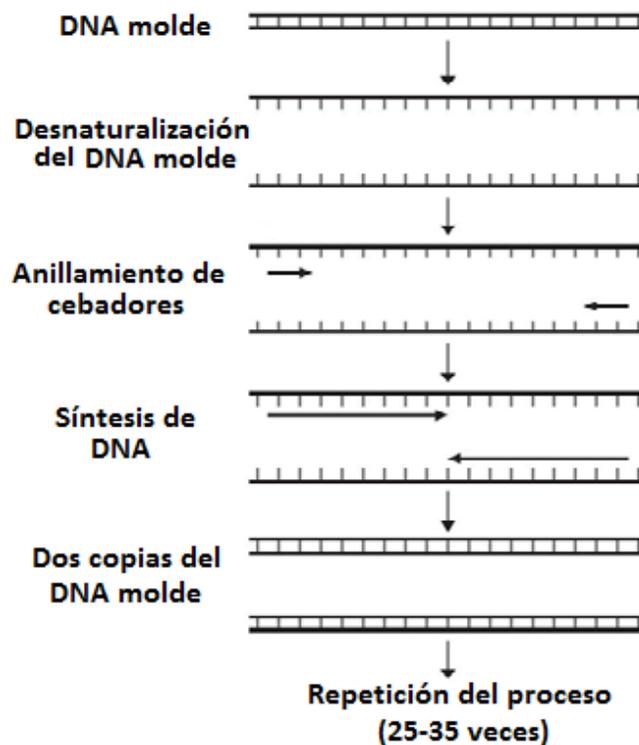


Figura 32. Representación esquemática de los distintos pasos de una reacción de PCR⁶¹.

8.4.1.3 Componentes de la reacción

Los elementos para realizar una PCR son: el templado o molde (DNA o DNAc), la enzima (DNA polimerasa), los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O ^{54, 101}.

DNA diana: Es el elemento principal en la PCR. La molécula de DNA está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena de tal forma, que el DNA se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del DNA es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de DNA que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés¹⁰¹.

Primers: son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Para realizar una PCR se utilizan dos secuencias diferentes de primers, una denominada forward o sentido y otra reverse o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de DNA puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3'. Las características que deben tener son: un tamaño que oscile entre 15-25 pares de bases, es recomendable que el par de primers sea de la misma longitud o que no rebase una diferencia de 3 nucleótidos; la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia; la temperatura de fusión (T_m) calculada para los primers no debe diferir en 5 °C o más, mientras que la T_m del producto amplificado no debe diferir por más de 10 °C con los valores de T_m del par de oligos, así se asegura que el producto amplificado será eficientemente desnaturalizado durante cada ciclo de PCR; la secuencia terminal 3' de los primers es crucial, es recomendable que la base en 3' sea G o C. Si no se respetan estas

condiciones existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos, lo que repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado^{36, 54, 57, 101}.

DNA polimerasa: se encarga de unir nucleótidos (dNTPs) a la cadena complementaria a partir del primer, formando una nueva cadena doble de DNA a partir de una cadena sencilla. Debido a que las etapas de reacción involucran temperaturas variables, es requerida una enzima termoestable. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su DNA polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas^{57, 101}.

Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina): son nucleótidos sintéticos con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de DNA. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Para ser reconocidos por la polimerasa, deben de ir acompañados por Mg^{2+} ^{57, 101}.

8.4.1.4 Equipo y reactivos

- Vortex
- Micropipetas diversos volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Microcentrifuga
- Termociclador
- Kit para PCR
- Primer forward

- Primer reverse

8.4.1.5 Técnica

Las cantidades necesarias para realizar la reacción dependerán del kit empleado, sin embargo, aquí se proponen las condiciones siguientes:

Combinar los siguientes reactivos en un tubo eppendorf de 0.5 mL y realizar la reacción en hielo como se muestra en la tabla siguiente:

Reactivos	Volumen	Concentración final
Agua libre de nucleasas (Para completar un Vf de 100 μ L)	X μ L	----
Buffer de reacción 10X	10 μ L	1X
50 mM MgCl ₂ *	3 μ L	1.5 mM
dNTP mix (10 mM)	2 μ L	0.2 mM
Mix de Primers (10 μ M cada uno)	5 μ L	0.5 μ M
DNA (200 ng/ μ L)	1 μ L	200 ng (6×10^4 moléculas)
DNA polimerasa <i>Tfi</i> (5 U/ μ L)	0.5 μ L	2.5 U/ μ L

Los viales preparados se agitan perfectamente para homogenizar la solución y se colocan dentro del termociclador. Incubar los tubos en un termociclador a 94 °C durante 3 min para desnaturalizar completamente la plantilla.

Para la amplificación del DNA realizar 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización (94 °C durante 45 s), alineamiento (55 °C durante 30 s) y extensión (72 °C durante 1 min 30 s), realizar 1 ciclo para una extensión final (72 °C durante 10 min) y mantener la reacción a 4 °C. Las muestras se pueden almacenar a -20 °C hasta su uso. Analizar los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa y visualizar por tinción con bromuro de etidio⁴⁹.

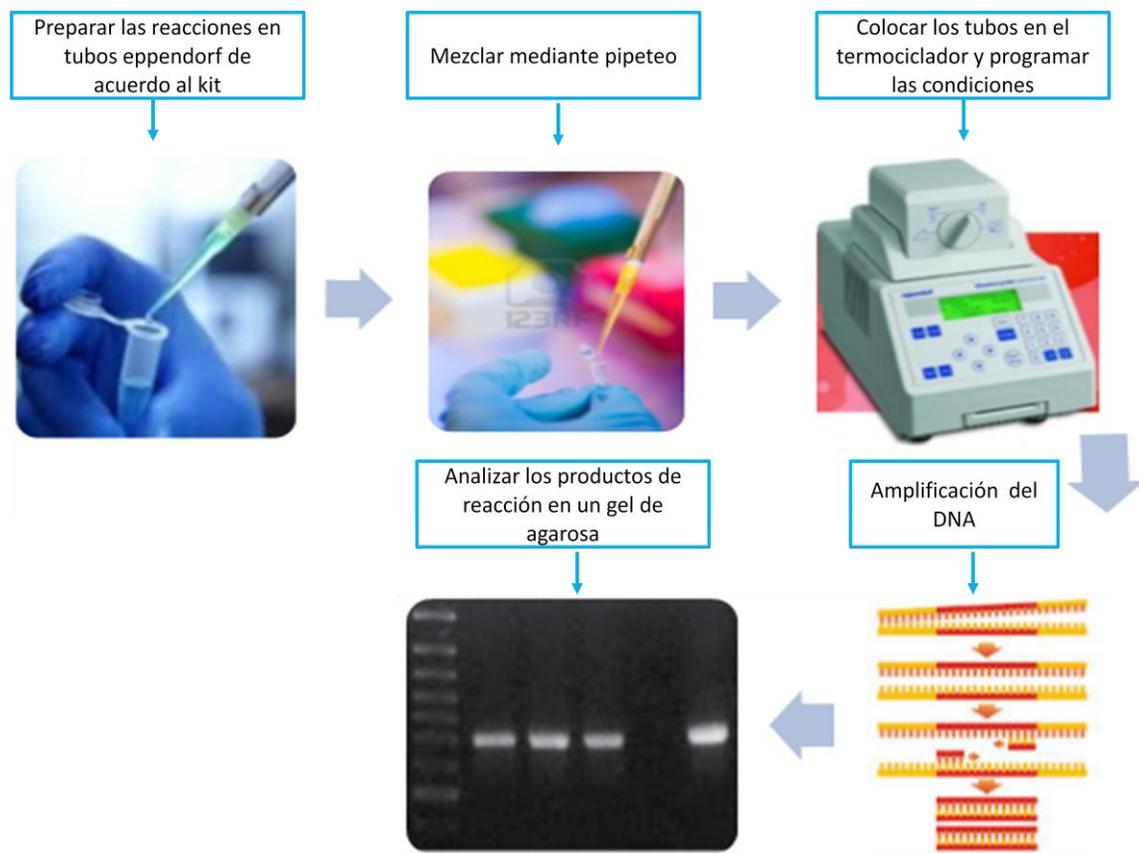


Figura 33. Metodología PCR punto final.

8.4.2 RT-PCR

8.4.2.1 Fundamento

El nombre de RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés) indica una amplificación proveniente de RNAm el cual se convierte en DNA complementario (DNAc) mediante la enzima transcriptasa reversa^{57, 101}.

8.4.2.2 Equipo y reactivos

- Vortex
- Micropipetas diversos volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Microcentrifuga

- Termociclador
- Kit para PCR
- Primer forward
- Primer reverse

8.4.2.3 Técnica

Las cantidades necesarias para realizar la reacción dependerán del kit empleado, sin embargo, aquí se proponen las condiciones siguientes:

Combinar los siguientes reactivos en un tubo eppendorf de 0.5 mL y realizar la reacción en hielo como se indica en la tabla siguiente:

Reactivos	Volumen	Concentración final
Agua libre de nucleasas (Para completar un Vf de 50 μ L)	X μ L	—
AMV / <i>Tfl</i> 5X Buffer de reacción	10 μ L	1X
dNTP mix (10mM)	1 μ L	0.2 mM
Primer forward	50 pmol	1 μ M
Primer reverse	50 pmol	1 μ M
MgSO ₄ 25mM	2 μ L	1 mM

Mezclar mediante pipeteo y agregar los componentes restantes:

Reactivos	Volumen	Concentración final
Transcriptasa Reversa AMV (5 U/ μ L)	1 μ L	0.1 U/ μ L
DNA polimerasa <i>Tfl</i> (5 U/ μ L)	1 μ L	0.1 U/ μ L

Mezclar en vortex suavemente. La reacción se inicia añadiendo:

Reactivos	Volumen	Concentración final
Templado de RNA	Y μ L	10 ³ - 10 ⁶ copias

Para la síntesis de DNAc realizar 1 ciclo a 45 °C por 45 min para la transcripción reversa y 1 ciclo a 94 °C por 2 min para la inactivación de AMV RT y la desnaturalización del DNAc.

Para la amplificación del DNAc realizar 40 ciclos bajo las siguientes condiciones:

desnaturalización (94 °C por 30 s), alineamiento (60 °C por 1 min) y extensión (68 °C por 2 min), realizar un ciclo para una extensión final (68 °C por 7 min) y mantener la reacción a 4 °C. Analizar 2.5 µL de los productos de reacción en un gel de agarosa⁸⁴.

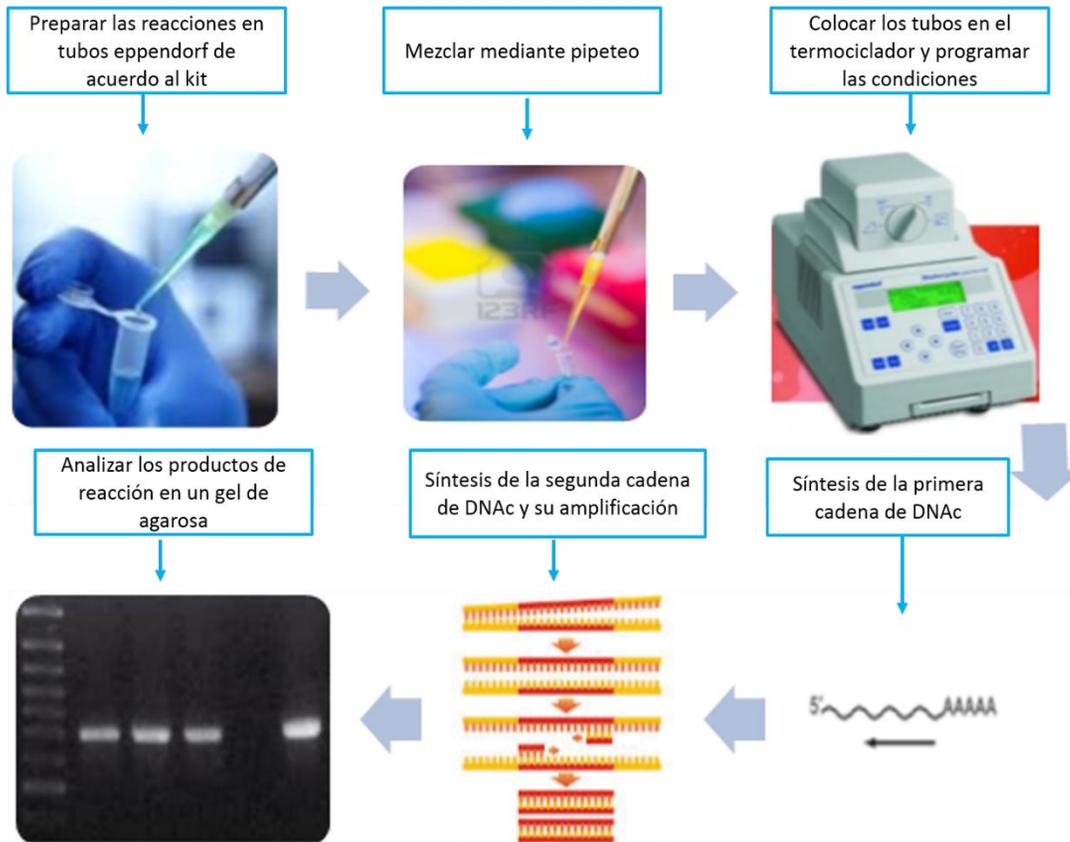


Figura 34. Metodología RT-PCR.

8.4.3 PCR en tiempo real

8.4.3.1 Fundamento

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sin embargo, la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. En la PCR tiempo real la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción y es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, sin la necesidad de que el producto amplificado sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final (**Figura 35**)¹⁰¹.

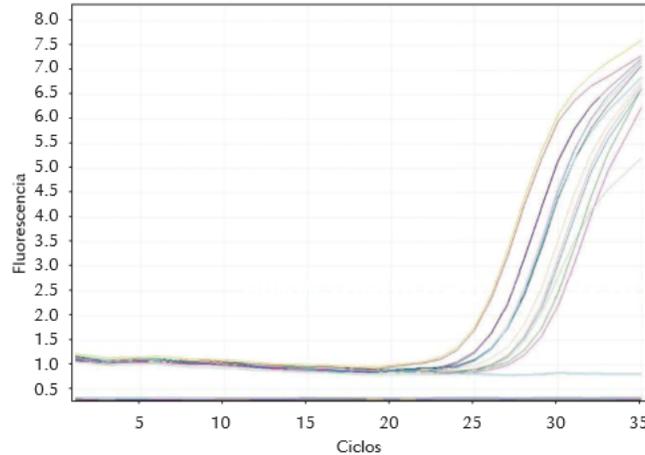


Figura 35. Curva de amplificación. En el eje "Y" se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje "X" los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de DNA¹⁰¹.

En este tipo de PCR si se utiliza DNA genómico entonces se habla de una qPCR (quantitative PCR), mientras que si primero se obtiene DNAc y luego se realiza la PCR nos referimos a una RT-qPCR¹⁰¹.

La PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. A diferencia de la PCR punto final, en la PCR en tiempo real la cantidad de RNAm que detecta la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas¹⁰¹.

8.4.3.2 Componentes de la reacción

Los componentes que se emplean son los mismos utilizados en la PCR punto final, sin embargo, en este caso generalmente la enzima, los dNTP's, el Mg²⁺, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como Master mix, el agua que se utiliza es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que

oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente¹⁰¹.

8.4.3.3 Métodos para detectar los amplificados

La detección de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real y se logra empleando sistemas basados en diferentes compuestos fluorescentes o fluoróforos que pueden proporcionar una detección de tipo no específica o específica¹⁰¹.

Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el DNA de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR, esto permite que las concentraciones de DNA puedan ser cuantificadas. Dentro de los colorantes fluorescentes, el más utilizado es el SYBR Green que al unirse al DNA de doble cadena emite hasta 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución (**Figura 36**). Este sistema de detección tiene la ventaja de ser más barato que las sondas específicas, sin embargo la principal limitación de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a cualquier molécula de DNA de doble cadena, ya sean productos generados inespecíficamente o dímeros de cebadores. Para evitar esta situación, se debe de realizar una curva melting o curva de disociación al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de primers. Actualmente la mayoría de los softwares de los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar^{14, 17, 18, 54, 101}.

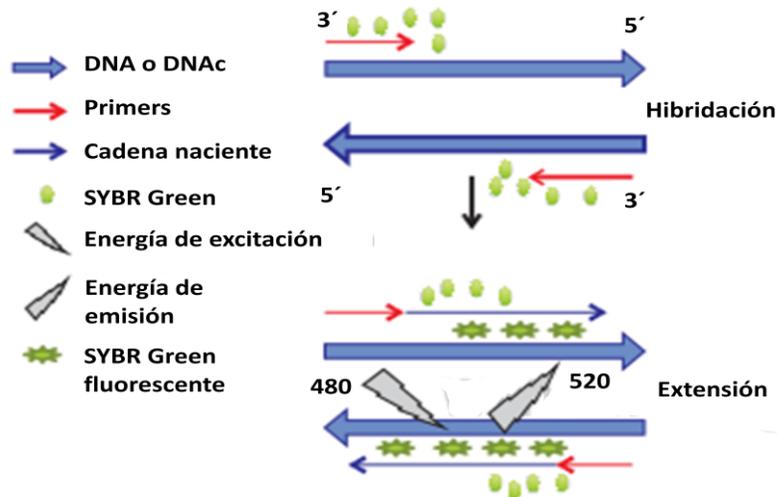


Figura 36. Método no específico. Cuando el SYBR Green está unido al DNA de doble cadena, es excitado a una longitud de onda de 480 nm, mientras que la longitud de onda de emisión corresponde a 520 nm¹⁰¹.

Los métodos específicos parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) para generar la señal que se va a medir en el termociclador a medida que se obtenga el producto de la PCR; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o quencher^{14, 17, 101}.

Existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Los primeros se basan en el uso de oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador, lo cual ocurre cuando ambos se encuentran en estrecha unión y la sonda no ha hibridado a su secuencia blanco. Durante la amplificación de DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria y al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq polimerasa que tiene actividad 5'-3' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador y con ello que la

fluorescencia emitida por éste sea liberada y capturada por el equipo. Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan. Los métodos por hibridación consisten en dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del DNA diana. Una de las sondas lleva una molécula donadora en el extremo 3' y la otra una molécula aceptora en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitada la molécula donadora por la energía luminosa que el equipo introduce en el sistema transfiere su energía a la molécula aceptora que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (**Figura 37**). Los métodos específicos son más costosos que los no específicos, pero son más eficientes al garantizar la especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos^{17, 101}.

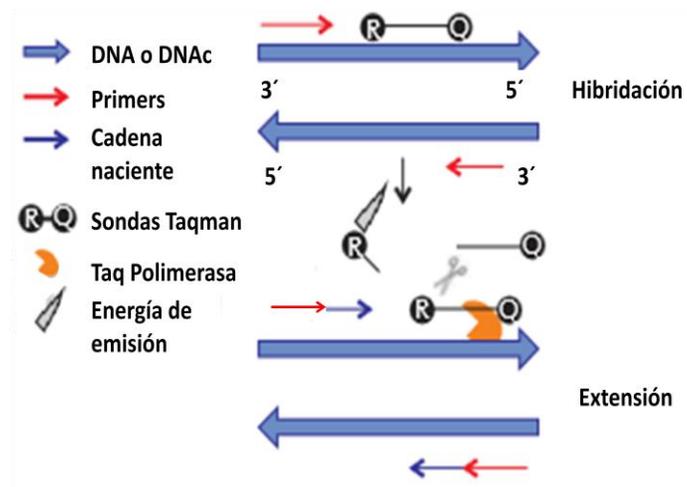


Figura 37. Método específico mediante la utilización de sondas Taqman¹⁰¹.

8.4.3.4 Equipo y reactivos

- Micropipetas diversos volúmenes
- Puntas para micropipetas
- Placas de reacciones múltiples
- Cubiertas de película adhesiva

- Termociclador en tiempo real
- Kit para qPCR
- DNA diana
- Primers qPCR
- Agua libre de nucleasas

8.4.3.5 Técnica

Las cantidades necesarias para realizar la reacción dependerán del kit empleado, sin embargo, aquí se proponen las condiciones siguientes:

Efectuar la serie de dilución de DNA en agua libre de nucleasas. Almacenar en hielo hasta su uso. Añadir con cuidado 10 µl del templado de DNA (o agua para las reacciones de control negativo) a los pocillos apropiados de la placa de reacción.

Descongelar el qPCR[®] Master Mix GoTaq a temperatura ambiente. Agitar suavemente para asegurar que se mezcle adecuadamente. Tener cuidado para evitar la formación de espuma o la exposición prolongada a la luz. Almacenar en hielo hasta su uso.

Preparar la mezcla de reacción y el control negativo, mediante la combinación de los siguientes reactivos:

Reactivos	Volumen	Concentración final
GoTaq [®] qPCR Master Mix, 2X	25µl	1X
Agua libre de nucleasas	Completar un Vf de 40 µL	--
Primers forward y reverse	X µL	0.2µM o 0.05–0.9µM cada uno

Agitar suavemente para mezclar evitando la formación de espuma. Añadir la mezcla anterior a los pocillos de la placa de reacción que contienen el templado de DNA. Sellar la placa de reacción, y centrifugar a baja velocidad durante 1 min.

Programar el termociclador según las instrucciones del fabricante seleccionando SYBR® o FAM como el tinte de detección para toda la placa. Realizar 1 ciclo de Activación Hot-Start (de activación en caliente) (95°C por 2 min), para la amplificación del DNA 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización (95°C por 15 s), alineamiento (60 °C por 1 min) y extensión (60°C por 1 min), realizar un ciclo de disociación (60-95°C).

Designar que los datos se recogerán durante la etapa de hibridación de cada ciclo. Colocar la placa en el instrumento y pulsar "Inicio". Al finalizar analizar los datos⁸⁵.

8.5 Inmunohistoquímica

8.5.1 Fundamento

La inmunohistoquímica corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o en un corte o sección de tejido utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o bien produce una coloración. Dependiendo del método empleado para evidenciar los anticuerpos específicos contra los antígenos tisulares pueden realizarse técnicas inmunofluorescentes cuando los anticuerpos se revelan mediante fluoróforos o técnicas inmunoenzimáticas cuando los anticuerpos se revelan mediante reacciones enzimáticas^{59, 82}.

Existen dos tipos de métodos inmunohistoquímicos: en el método directo un anticuerpo primario marcado reacciona directamente con el antígeno en secciones de tejido. El marcador generalmente resulta en la producción de una sustancia colorada o en un aumento en la cantidad de luz emitida a una longitud de onda determinada si el antígeno está presente, en el caso de ausencia de antígeno no hay unión del anticuerpo primario marcado y por lo tanto no hay señal; mientras que en el método indirecto un anticuerpo específico sin marcar se une al antígeno presente en el tejido, en una segunda

fase el tejido se incubaba con un anticuerpo marcado que se acopla con el complejo antígeno-anticuerpo formado previamente en el tejido⁵⁹.

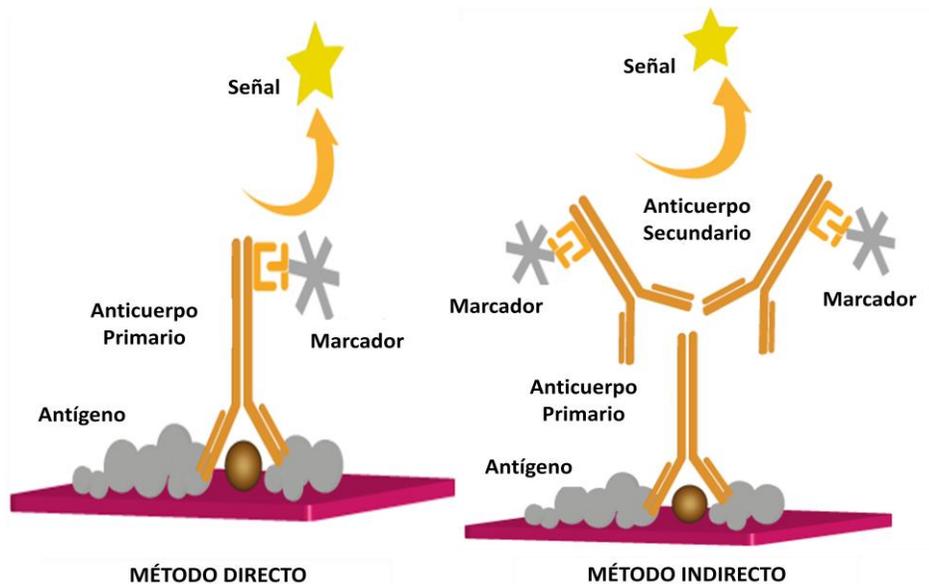


Figura 38. Representación del marcate de anticuerpos de los métodos directo e indirecto⁶⁸.

8.5.2 Técnica

El protocolo estándar para el método indirecto es el siguiente: Tras la obtención del tejido, éste se fija con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 4 horas, posteriormente se realiza la crioprotección del tejido en sacarosa al 30% en PBS 0.1M a 4 °C toda la noche (este paso sólo se realizará en el caso de secciones de criostato), se realizan cortes de 10 a 25 mm de grosor y finalmente se realiza la inmunoreacción en donde para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas, el tejido se preincuba en una solución de H₂O₂ al 0.3% en metanol durante 20 min (este paso no es necesario en el caso de técnicas de inmunofluorescencia). Se realizan 2 lavados de 10 min con PBS que contiene triton al 0.25% (PBST). Se preincuba el corte durante 30 min con PBST que contiene 1% de BSA para reducir el marcate inespecífico. Después se incubaba durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario (los anticuerpos se diluirán en una solución de PBS con 0.5% de BSA). Se realizan 2 lavados de 10 min de los cortes con PBST y se incuban las secciones durante 1 hora con el anticuerpo secundario (biotinilado, unido a peroxidasa o a fluorescencia) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan lavados con PBS y se

incuban los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente, se lava durante 10 min con PBST y después se hace un lavado de 10 min con buffer Tris-HCl 0.1M a pH 7.2 y se incuban las secciones en una solución de DAB al 0.05% en buffer Tris-HCl que contiene 0.025% de H₂O₂ durante 5 a 10 min.

El protocolo estándar para el método directo es el mismo que el indirecto sólo se omiten los pasos que involucran la incubación con el anticuerpo secundario hasta los lavados con PBST^{79, 106}.

9.0 CONCLUSIONES

- ⊗ El SRAA se encarga principalmente de regular la presión arterial, el tono vascular, la volemia y la homeostasis hidroelectrolítica, por lo cual regula las funciones cardiovasculares y renales. Las alteraciones de éste sistema desempeñan un papel importante en la fisiopatología de varias enfermedades cardiovasculares y renales, por ejemplo en la remodelación ventricular del infartado y del hipertenso, así como en la remodelación vascular.
- ⊗ Las enfermedades cardiovasculares entre ellas el infarto al miocardio son unas de las principales causas de muerte en México y a nivel mundial, esta enfermedad se define por la muerte celular patológica debido a la isquemia prolongada. Debido a que estas enfermedades se pueden prevenir al cambiar estilos de vida, malos hábitos y conductas de riesgo, es de gran importancia favorecer su prevención.
- ⊗ El SRAA juega un papel clave en la remodelación estructural y funcional después de un IM. La Ang II desempeña un papel fundamental en el desarrollo de remodelado del VI después del IM. Los niveles del RNAm y de proteína de angiotensinógeno, ECA y los receptores de angiotensina se incrementan en corazones de rata después de un IM.
- ⊗ La señalización del receptor AT_1 contribuye a la remodelación cardiaca después de un IM por la mediación de la vasoconstricción, hipertrofia de los cardiomiocitos, la proliferación de fibroblastos y la deposición de colágeno intersticial, mientras que el receptor AT_2 ejerce un efecto opuesto en el sistema cardiovascular. Hallazgos experimentales han demostrado que AT_2 es regulado positivamente en condiciones patológicas, como la insuficiencia cardíaca, además desempeña un papel cardioprotector en el mecanismo de prevención de desarrollo temprano de la dilatación y la insuficiencia del VI después de un IAM.

- ⊗ La inhibición de ECA puede reducir la ampliación progresiva después de un infarto al miocardio en animales de experimentación, así como en los seres humanos. Varios ensayos han demostrado una disminución en la mortalidad cardiovascular y una disminución de la progresión de la insuficiencia cardíaca congestiva en pacientes tratados con iECA.

- ⊗ Las acciones antiproliferativas de los iECA son consecuencia de la inhibición de la síntesis de Ang II, del tono simpático así como del aumento de los niveles de quininas, NO y prostaglandinas. El posible efecto beneficioso de los iECA se explica por sus acciones vasodilatadoras (que reducen la presión y el estrés de la pared ventricular, y que facilitan la expansión de la zona necrótica), antitróficas, antiisquémicas (disminuyen las demandas miocárdicas de O₂) y cardioprotectoras.

- ⊗ Los ARA II al bloquear directamente los efectos de la interacción de la Ang II en sus receptores AT₁ originan vasodilatación arterial y venosa e impiden las acciones cardíacas de Ang II en el corazón y los vasos sanguíneos. Estos fármacos bloquean las acciones tróficas en el corazón corrigiendo la hipertrofia ventricular y la fibrosis, lo cual mejora el funcionamiento cardíaco, mientras que en los vasos sanguíneos reducen el grosor de la pared vascular, incrementan la luz del vaso y tienden a recuperar la función endotelial.

- ⊗ La cuantificación de proteínas por el método de Bradford es un método sensible, rápido, estable, simple, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación gracias a esta técnica es posible conocer la cantidad de proteína presente en la muestra para así realizar el Western blot. Esta es una técnica analítica utilizada para la identificación de una proteína diana en una mezcla de proteínas complejas gracias a la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno y está formado por tres

etapas: separación de las proteínas mediante electroforesis, transferencia e inmunodetección.

- ⊗ La técnica de inmunohistoquímica permite detectar la proteína de interés visualizandola en el tejido sin embargo no se puede cuantificar a diferencia del Western blot.

- ⊗ La PCR en tiempo real combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares. Este es el método más sensible, rápido y con menor riesgo de contaminación para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. A diferencia de la PCR punto final, en la PCR en tiempo real la cantidad de RNAm que detecta la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas, la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción y es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, sin la necesidad de que el producto amplificado sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa, es por esto que la PCR en tiempo real irá reemplazando a la PCR punto final.

10.0 REFERENCIAS

1. A.D.A.M. Images. (2013). Órganos torácicos. Tomado de: <http://www.adamimages.com/Illustration/SearchResult/2/coraz%C3%B3n>. Fecha de consulta: agosto de 2013.
2. Achard, V., Boullu-Ciocca, S., Desbriere, R., Nguyen, G., & Grino, M. (2007). Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292, R274–R282.
3. Acosta, A., Agudelo, C., Barrientos, S., Chávez, M., Cuellar, A., Durán, C., Gamboa, F., Gamboa, L., Gómez, O., Gómez, M., Gómez, S., González, O., Herazo, B., Jaramillo, L., Otero, L., Roa, N., Rodríguez, A., Suárez, L. & Valdivieso, C. (2006). Fundamentos de ciencia básicas aplicadas a la odontología. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
4. Aguilar, J., & Garabito, R. (2008). Infarto agudo de miocardio. *Revista Papeña de Medicina Familiar*, 5(8), 102-114.
5. Alvarez M. (2009). Inhibidores de la enzima convertidora y antagonistas de los receptores de angiotensina II en la insuficiencia cardíaca crónica. *Rev Insuf Cardíaca*, 4(4), 152-156.
6. Álvarez, I., & Flórez, Y. (2012). Pathophysiological effects of rennin-angiotensin-aldosterone system on congestive heart failure in dogs. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 3(25), 511-522.
7. Antman, E., Bassand, J., Klein, W., Ohman, M., Lopez, J., Rydén, L., Simoons, M., & Tendera, M. (2000). Myocardial Infarction Redefined—A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 3(36), 959-969.
8. Bautista, R., Sánchez, A., Hernández, J., Oyekan, A., & Escalante, B. (2001). Angiotensin II Type AT2 Receptor mRNA Expression and Renal Vasodilatation Are Increased in Renal Failure. *Hypertension*, 38, 669-673.

9. Benavente, D., Chue, C., & Ferro, C. (2010). Principales componentes del sistema renina-angiotensinaaldosterona: historia, modulación farmacológica e impacto clínico. *Rev. Med. Clin. Condes*, 21(4), 516-529.
10. Berne, R. & Levy, M. (2000). Fisiología. 3° Ed. Madrid: Elsevier.
11. Betés, M. (2008). Farmacología para fisioterapeutas. México: Médica Panamericana.
12. Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
13. Brown, N., & Vaughan, D. (1998). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation*, 97, 1411-1420. Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET*, 2(10), 1-13.
14. Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET*, 2(10), 1-13.
15. Burke, A., & Virmani, R. (2007). Fisiopatología del infarto agudo de miocardio. *Med. Clin. N. Am.*, 91, 553-572. Cardiomed. (2013). Histología del corazón. Tomado de: <http://www.cardiomedica.es/ccbasicas/histo/index.php>. Fecha de consulta: agosto de 2013.
16. Cardiomed. (2013). Histología del corazón. Tomado de: <http://www.cardiomedica.es/ccbasicas/histo/index.php>. Fecha de consulta: agosto de 2013.
17. Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 22(5), 299-305.
18. Crepaldo, C. (junio 2008). Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Noti Wiener. Tomado de: <http://www.wiener-lab.com/wienerreport/NW%20140%20-%20Jun%2008.pdf>.
19. Cultek. Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. Tomado de: <http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/WBhandbook.pdf>. Fecha de consulta: enero de 2014.

20. Dale, D. (2008). Interpretación del ECG: su dominio rápido y exacto. 4° Ed. México: Médica Panamericana.
21. Danilov, S., Gordon, K., Nesterovitch, A., Lunsdorf, H., Chen, Z., Castellon, M., Popova, I., Kalinin, S., Mendonca, E., Petukhov, P., Schwartz, D., Minshall, R., & Sturrock, E. (2011). An Angiotensin I-Converting Enzyme Mutation (Y465D) Causes a Dramatic Increase in Blood ACE via Accelerated ACE Shedding. *PLoS ONE*, 6, 1-14.
22. Danser, J., & Deinum, J. (2005). Renin, Prorenin and the Putative (Pro)renin Receptor. *Hypertension*, 46, 1069-1076.
23. Díaz, K., Exaire, J., & Escalante, B. (2001). Importancia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la circulación coronaria. *Archivos de Cardiología de México*, 4 (71), 278-285.
24. Dvorkin, M., Cardinali, D. & Iermoli, R. (2010). Bases fisiológicas de la práctica médica. 14° Ed. México: Médica Panamericana.
25. Esteban, A. & Martín, C. (1996). Manual de cuidados intensivos para enfermería. Barcelona: Springer.
26. Fernández C. (2009). Renina: descubierta en 1898, inhibida en 2008. Historia de su investigación. Evolución y desarrollo de sus inhibidores. *Revista Española de Cardiología Supl.*, 9, 1A-23A.
27. Ferrario, C., Trask, A., & Jessup, J. (2005). Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, H2281-H2290.
28. Figueira, L., Villalobos, J., & Colina, V. (2009). Sistema Renina Angiotensina Renal: El papel de la Angiotensina 1-7 y la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 en el riñón. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 38, 70-84.
29. Florez, J. (2003). Farmacología humana. 4° Ed. México: Masson.
30. Fonseca, F. (2009). Anatomofisiología y patología básicas. Madrid: Arán.
31. Gal, B., Gallardo, M., Velasco, A. & Prieto, J. (2007). Bases de la fisiología. Madrid: Tebar.
32. Ganong, W. (2002). Fisiología médica. 20° Ed. México: El manual moderno.

33. García, A., Sánchez, C., Martínez, C., Llamas, G., Cardona, E., Barragán, R., González, F., Sahagún, G., & Treviño, A. (2006). Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST. *Archivos de Cardiología de México*, 3(76), S12-S120.
34. García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-41.
35. Giraldo, G., Loango, N. & Mejía, C. (2010). Laboratorio de bioquímica: una visión práctica. Colombia: ELIZCOM.
36. Grande, A. Diseño de Oligonucleótidos para PCR. Tomado de: http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers_anagrande.htm. Fecha de consulta: febrero de 2014.
37. Harmer, D., Gilbert, M., Rorman, R., & Clark, K. (2002). Quantitative mRNA expresión profiling of ACE2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS*, 532, 107-110.
38. Ibarra, M., & Pedraza, J. (1993). Estructura y regulación de la expresión del gen de angiotensinógeno. *Rev Invest Clin*, 45(4), 387-398.
39. INEGI. Principales causas de mortalidad. Tomado de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp.%20Fecha%20de%20consulta:%20noviembre%20de%202013>. Fecha de consulta: noviembre de 2013
40. Ishiyama, Y., Gallagher, P., Averill, D., Tallant, E., Brosnihan, K., & Ferrario, C. (2004). Upregulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 After Myocardial Infarction by Blockade of Angiotensin II Receptors. *Hypertension*, 43, 970-976.
41. Jalil, J., & Ocaranza, M. (2002). Genotipos del sistema renina-angiotensina-aldosterona: a la búsqueda de enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol.*, 55(2), 89-91.
42. Jalil, J., Paz, M., Piddo, A., & Jalil, R. (1999). Reproducibility of plasma angiotensin-converting enzyme activity in human subjects determined by fluorimetry with Z-phenylalanine-histidyl-leucine as substrate. *J. Lab. Clin. Med.*, 133 (5), 501-506.

43. Jones, E., Vinh, A., Mc Carthy, C., Gaspari, T., & Widdop, R. (2008). AT₂ receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 120, 292–316.
44. Junta de Andalucía. (2013). Circulatorio. Tomado de: <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/circu.htm>. Fecha de consulta: agosto de 2013.
45. Klett, C., & Granger, J. (2001). Physiological elevation in plasma angiotensinogen increases blood pressure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 281, R1437–R1441.
46. Larrinaga, G., Pérez, I., Saenz, B., Blanco, L., López, J., Cándenas, M., Pinto, F., Gil, J., Irazusta, J., & Varona, A. (2010). Angiotensin-converting enzymes (ACE and ACE2) are downregulated in renal tumors. *Regulatory Peptides*, 165, 218-233.
47. Lassegue, B., Alexander, R., Nickenig, G., Clark, M., Murphy, T., & Griendling, K. (1995). Angiotensin II Down-regulates the Vascular Smooth Muscle AT1 Receptor by Transcriptional and Post-transcriptional Mechanisms: Evidence for Homologous and Heterologous Regulation. *Molecular Pharmacology*, 48, 601-609.
48. Lépori, L. (2005). Infarto de miocardio. Buenos Aires: E. C. S. A.
49. Life technologies. (2010). PCR Reagent System. Tomado de: <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/references/protocols/nucleic-acid-amplification-and-expression-profiling/pcr-protocol/pcr-reagent-system.html>. Fecha de consulta: febrero de 2014.
50. Life technologies. Trizol reagent. Tomado de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf. Fecha de consulta: enero de 2014.
51. Lima, M., Nuccio, J., Villalobos, M., Torres, C., & Balladares, N. (2010). Sistema renina angiotensina y riesgo cardiometabólico. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 8(1), 3-10.
52. Liu, Y., Yang, X., Shesely, E., Sankey, S., & Carretero, O. (2004). Role of Angiotensin II Type 2 Receptors and Kinins in the Cardioprotective Effect of Angiotensin II Type

- 1 Receptor Antagonists in Rats With Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(8), 1473–1480.
53. Llorens-Cortes, C., Greenberg, B., Huang, H., & Corvol, P. (1994). Tissue expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension*, 24, 538-548.
54. Lo, D., Chiu, R. & Chan, A. (2006). *Methods in molecular medicine. Clinical applications of PCR*. New Jersey: Human Press.
55. López, F., & Macaya, C. (2009). *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos*. Madrid: Fundación BBVA.
56. Lüllmann, H., Mohr, K. & Hein, L. (2010). *Farmacología texto y atlas*. 6° Ed. México: Médica Panamericana.
57. Luque, J. (2002). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Madrid: Harcourt.
58. Martín, E. (2006). *Fundamentos de fisiología*. Madrid: Paraninfo.
59. Martínez, R. & Gragera, R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. Madrid: CSIC.
60. Masahiro, A., Horiuchi, M., Yamada, H., Zhang, L., Shirakami, G., Tamura, K., Ouchi, Y., & Dzau, V. (2000). Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiol. Genomics*, 2, 13–20.
61. Méndez, S., & Pérez, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), 183-192.
62. Müller, W. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. México: Reverte.
63. Mycek, M. (2004). *Farmacología*. México: Mc Graw Hill.
64. Nakajima, M., Hutchinson, H., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratif, R., & Dzau, V. (1995). The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: Gain-of-function study using gene transfer. *Physiology*, 92, 10663-10667.

65. Netter, F. (2006). Colección CIBA de ilustraciones médicas. Tomo V: Corazón. Elsevier-Masson. Tomado de: <http://www.medicinapreventiva.com.ve/ekg.htm>. Fecha de consulta: Agosto de 2013.
66. Nguyen G. (2006). Renin/prorenin receptors. *Kidney International*, 69, 1503–1506.
67. Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., & Sraer, J. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to rennin. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1417–1427.
68. Nitzipper. Inmunohistoquímica. Tomado de: <http://www.nitzipper.com/es/nitzipper-aplicaciones-bioconjugacion/inmunohistoquimica.html>. Fecha de consulta: marzo de 2014.
69. Nitzipper. Western blot. Tomado de: <http://www.nitzipper.com/es/nitzipper-aplicaciones-bioconjugacion/western-blot.html>. Fecha de consulta: enero de 2014.
70. Nostramo, R., Tillinger, A., Saavedra, J., Kumar, A., Pandey, V., Serova, L., Kvetnansky, R., & Sabban, E. (2012). Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene expression in the adrenal medulla by acute and repeated immobilization stress. *Journal of Endocrinology*, 215, 291-301.
71. Nostramo, R., Tillinger, A., Saavedra, J., Kumar, A., Pandey, V., Serova, L., Kvetnansky, R., & Sabban, E. (2012). Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene expression in the adrenal medulla by acute and repeated immobilization stresses. *J. Endocrinology*, 215(2), 291-301.
72. Oishi, Y., Ozono, R., Yano, Y., Teranishi, Y., Akishita, M., Horiuchi, M., Oshima, T., & Kambe, M. (2003). Cardioprotective Role of AT2 Receptor in Postinfarction Left Ventricular Remodeling. *Hypertension*, 41, 814-818.
73. Oishi, Y., Ozono, R., Yoshizumi, M., Akishita, M., Horiuchi, & M., Oshima, T. (2006). AT2 receptor mediates the cardioprotective effects of AT1 receptor antagonist in post-myocardial infarction remodeling. *Life Sciences*, 80, 82–88.
74. Oliveira, L., Costa-Neto, C., Nakaie, C., Schreier, S., Shimuta, S., & Paiva, A. (2007). The Angiotensin II AT1 Receptor Structure-Activity Correlations in the Light of Rhodopsin Structure. *Physiol Rev.*, 87: 565–592.

75. Oliveri, R. & Thierer, J. (1999). Insuficiencia cardiaca. México: Médica Panamericana.
76. Organización Mundial de la Salud. (2009). El día mundial del corazón. Tomado de: http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_heart_day/es/index.html. Fecha de consulta: agosto de 2013.
77. Ortega, L., Higareda, A., Pardo, M., Beltrán, E., Gómez, A., Farías, V., & Álvares, C. (2007). Implicaciones del Sistema renina – angiotensina en la nefrología diabética. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 45(6), 601-610.
78. Paul, M., Poyan, A., & Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86, 747–803.
79. Pawlikowski, M., Minias, R., Sosnowski, M., & Zieliński, K. (2011). Inmunohistochemical detection of angiotensin AT 1 and AT 2 receptors in prostate cancer. *Central European Journal of Urology*, 64 (4), 252-255.
80. Paz, M., Moya, J., Pinto, M., Escudero, N., Valenzuela, F., Varas, M., Godoy, I., Chiang, M., Lavandero, S., & Jalil, J. (2010). Menores niveles tisulares de la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (eca-2) y angiotensina (1-9) están asociados a mayor remodelamiento de la pared aórtica de ratas hipertensas. *Rev. Chil. Cardiol.*, 29, 69-82.
81. Pérez, I., Hiriart, M., Olivares, J., & Robles, D. (2006). Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT₁ y AT₂: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Rev. De Educación Bioquímica*, 25(2), 55-60.
82. Pontificia Universidad Católica de Chile. Manual de patología general. Tomado de: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol_125.html. Fecha de consulta: marzo de 2014.
83. Pontificia Universidad Javeriana. Angiotensina. Tomado de: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/angiotensina.htm>. Fecha de consulta: junio de 2013.

84. Promega. (2010). Access RT-PCR System Technical Bulletin. Tomado de: <http://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/access-rtPCR-system-protocol/>. Fecha de consulta: febrero de 2014.
85. Promega. (2011). GoTaq® qPCR Master Mix. Tomado de: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/101/GoTaq%20qPCR%20Master%20Mix%20Protocol.ashx>. Fecha de consulta: febrero de 2014. Fecha de consulta: marzo de 2014.
86. Qi, Y., Li, H., Shenoy, V., Li, Q., Wong, F., Zhang, L., Raizada, M., Summers, C., & Katovich, M. (2011). Moderate cardiac-selective overexpression of angiotensin II type 2 receptor protects cardiac functions from ischaemic injury. *Experimental Physiology*, 97(1), 89-101.
87. Roca, P., Oliver, J. & Rodríguez, A. (2004). Bioquímica: técnicas y métodos. Madrid: Hélice.
88. Rosenfeld, G. & Loose, D. (2007). Temas clave farmacología. 4° Ed. Barcelona: Wolters Kluwer.
89. Ruíz, R. G. (2010). Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. México: Editorial Médica Panamericana.
90. Sandmann, S., Yu, M., Kaschina, E., Blume, A., Bouzinova, E., Aalkjaer, C., & Unger, T. (2001). Differential Effects of Angiotensin AT1 and AT2 Receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 8(37), 2154-2165.
91. Santeliz, H., Romano, L., González, A., & Hernández, H. (2008). El sistema renina-angiotensina- aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21-29.
92. Schmieder, R., Hilgers, K., Schlaich, M., & Schmidt, B. (2007). Renin- angiotensin system and cardiovascular risk. *The Lancet*, 362, 1208-1219.

93. Serna, F. (2009). Insuficiencia cardiaca crónica. Argentina: FAC. Tomado de: http://fac.org.ar/edicion/inscac/Cap4_2009.pdf. Fecha de consulta: septiembre de 2013.
94. Silverthorn, D. (2009). Fisiología humana: un enfoque integrado. 4° Ed. México: Médica Panamericana.
95. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). (2009). Cubos dinámicos de egresos hospitalarios. Tomado de: <http://www.sinais.salud.gob.mx/basesdedatos/index.html>. Fecha de consulta: 9 de agosto de 2013.
96. Soler, M., Lloveras, J., & Batlle, D. (2008). Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. *Med. Clin. (Barc)*, 131(6), 230-236.
97. Sutton, M., & Sharpe, N. (2000). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Pathophysiology and Therapy. *Circulation*, 101, 2981-2988.
98. Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M., & Inada, M. (1993). Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circulation Research*, 73, 439-447.
99. Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Núñez, L., Vaquero, M., & Delpón, E. (2006). Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales?. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.*, 6, 10C-24C.
100. Tamargo, J., Gómez, R., Amorós, I., Barana, A., Caballero, R., & Delpón, E. (2009). Fisiopatología de la prorenina y la renina. Cincuenta años en busca de los inhibidores directos de la renina. Sus ventajas y sus limitaciones. *Revista Española de Cardiología Supl.*, 9, 24A-40A.
101. Tamay, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 2(2), 70-78.

102. Texas Heart Institute. (2013). Anatomía del corazón. Tomado de: http://www.texasheartinstitute.org/HIC/anatomy_Esp/anato_sp.cfm. Fecha de consulta: agosto de 2013.
103. Texas Heart Institute. (2013). El sistema de conducción. Tomado de: http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Anatomy_Esp/cond_sp.cfm. Fecha de consulta: agosto de 2013.
104. Tortora, G. & Reynolds, S. (2003). Principios de anatomía y fisiología. 9° Ed. México: Oxford University Press.
105. Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *American Journal Of Cardiology*, 89, 3A–10A.
106. Universidad de Salamanca. Técnica inmunohistoquímica. Tomado de: <http://campus.usal.es/~histologia/histotec/especial/espe18/espe18.htm>. Fecha de consulta: marzo de 2014.
107. Universidad del fútbol y ciencias del deporte. (2013). El electrocardiograma. Tomado de: http://terapiafisicaufd.mex.tl/771891_ELECTROCARDIOGRAMA.html. Fecha de consulta: septiembre de 2013.
108. Vázquez, A., Cruz, N., González, Z., & Vázquez, A. (1998). Antagonistas de los receptores de Angiotensina II. *Rev Cubana Med.*, 37(2), 83-92.
109. Velasco, A. (2003). Farmacología Fundamental. Madrid: Mc Graw Hill/Interamericana.
110. Velez, D. (2009). Pautas del electrocardiograma (ECG). 2° Ed. Madrid: Marban.
111. Wang, Z., Moore, A., Ozono, R., Siragy, H., & Carey, R. (1998). Immunolocalization of Subtype 2 Angiotensin II (AT2) Receptor Protein in Rat Heart. *Hypertension*, 32, 78-83.
112. Westwood, B. & Chappell, M. Divergent pathways for the angiotensin-(1-12) metabolism in the rat circulation and kidney. *Peptides*. 35(2), 190-195, 2012.

113. Xu, J., Carretero, O., Liu, Y., Shesely, E., Yang, F., Kapke, A., & Yang, X. (2002). Role of AT2 Receptors in the Cardioprotective Effect of AT1 Antagonists in Mice. *Hypertension*, 40, 244-250.
114. Yábar, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima: INS. Tomado de: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>. Fecha de consulta: enero de 2014.