



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

‘Seguimiento temporal del mRNA de genes del Sistema Renina
Angiotensina y Sistema Calicreína-Cinina en el Infarto Miocárdico en
ventrículo izquierdo de rata Wistar macho’

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Presentan:

Eva Itzel Baca Tesillo

Daniel Cortés Avalos

Aesora: Dra. Jazmín Flores Monroy

Coasesora: Dra. Luisa Martínez Aguilar

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017



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
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Seguimiento temporal del mRNA de genes del Sistema Renina Angiotensina y Sistema Calicreina-Cinina en el Infarto Miocárdico en ventrículo izquierdo de rata Wistar macho.

Que presenta la pasante: Eva Itzel Baca Tesillo

Con número de cuenta: 310058708 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Abril de 2017

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Salvador Fonseca Coronado</u>	
VOCAL	<u>Dra. Jazmín Flores Monroy</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Alejandro Gutiérrez García</u>	
1er. SUPLENTE	<u>LBD. Rosa María de los Ángeles López Cabrera</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Diego Lezama Martínez</u>	

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Seguimiento temporal del mRNA de genes del Sistema Renina Angiotensina y Sistema Calicreína-Cinina en el Infarto Miocárdico en ventrículo izquierdo de rata Wistar macho.

Que presenta el pasante: Daniel Cortés Avalos

Con número de cuenta: 310093808 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Abril de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Salvador Fonseca Coronado</u>	
VOCAL	<u>Dra. Jazmín Flores Monroy</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Alejandro Gutiérrez García</u>	
1er. SUPLENTE	<u>LBD. Rosa María de los Ángeles López Cabrera</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Diego Lezama Martínez</u>	

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT); proyecto IN212213 DGAPA-UNAM; Cátedra PIAPIC-30, PIAPIME2.11.02.16; PIAPI 1645, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que nos permitió forjarnos como profesionales y conocer personas extraordinarias en cada semestre.

DEDICATORIA

A nuestros padres por su esfuerzo estamos aquí, siempre estaremos agradecidos por su dedicación, creer siempre en nosotros y por enseñarnos el valor de las cosas. Ustedes siempre serán nuestro hogar.

A mis hermanos: Airt por estar al pendiente de nosotros, apoyarnos en cada momento y demostrarnos que podemos lograr lo que nos proponemos, siempre serás mi ejemplo. Antonio mi hermano fiestero, por su manera peculiar de enseñarme que relajarme y disfrutar de buenos momentos con amigos hacen más divertida la vida. Estaré eternamente agradecida porque son mis compañeros de vida, para ustedes siempre tendré tiempo y un lugar en mi corazón que nadie lo podrá remplazar, los amo.

A mis hermanos: Roberto, Edgar y Pilar quienes me han cuidado, apoyado, me han compartido su experiencia y dado grandes enseñanzas que me servirán para toda la vida. Siempre estaré agradecido por lo que he aprendido junto a ustedes.

A la Dra. Jazmín Flores Monroy por darnos la oportunidad de trabajar con ella, por compartirnos su experiencia y sus consejos que nos permitieron aprender cosas nuevas que nos motivan para ser mejores cada día.

A la Dra. Luisa por abrirnos las puertas de su laboratorio y con ellos permitarnos formar parte de su equipo de trabajo que siempre está a la vanguardia en nuevas investigaciones.

Al equipo del Laboratorio de Farmacología del Miocardio por brindarnos su conocimiento y su amistad.

A Vero, Angie, Greg, Lau y Susy por demostrar que nuestra amistad no solo eran fiestas, horas libres y risas entre clases... siempre estuvimos para apoyarnos en nuestros desvelos por reportes, exámenes, exposiciones y sobre todo por impulsarnos en ser mejores estudiantes y personas.

A mis amigas del alma: Angie, Cyn y Fer gracias por brindarme su amistad desde hace siete años y por comenzar juntas este camino en la UNAM. Aun nos faltan muchos años de risas y consejos, las quiero mucho.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	III
1.0 Introducción.....	11
2.0 MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Infarto de miocardio.....	12
2.1.1 Definición.....	12
2.1.2 Clasificación.....	12
2.1.3 Fisiopatología del infarto.....	13
2.1.3.1 Regulación de la contractilidad.....	14
2.1.4 Epidemiología.....	16
2.1.4.1 Prevalencia en México.....	16
2.1.4.2 Prevalencia en el mundo.....	17
2.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA).....	18
2.2.1 Renina.....	19
2.2.2 Angiotensinógeno.....	20
2.2.3 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....	21
2.2.4 Angiotensina II.....	22
2.3 Receptores de Angiotensina II.....	23
2.3.1 Receptor AT ₁	23
2.3.1.1 Función.....	25
2.3.2 Receptor AT ₂	28
2.3.2.1 Función.....	29
2.4 Sistema Calicreína-Cininas.....	30
2.4.1 Cininógenos.....	31
2.4.2 Calicreínas.....	32
2.4.3 Cininas.....	32
2.5 Receptores de cininas.....	33
2.5.1 Receptor B ₁	34
2.5.2 Receptor B ₂	35
2.6 Angiotensina y el Sistema Calicreína Cinina.....	36

2.6.1 Prolilcarboxipeptidasa	37
2.6.2 Calicreína	37
2.6.3 ECA	38
2.6.4 Angiotensina (1-7)	38
2.6.5 Receptores de angiotensina AT ₁ /AT ₂ y receptores de bradicinina B ₂	38
2.6.6 Interacciones a nivel transcripcional	39
3.0 Justificación	40
4.0 Hipótesis	40
5.0 Objetivos	40
5.1 Objetivo general	40
5.2 Objetivos específicos	40
6.0 Material y métodos	41
6.1 Material	41
6.1.1 Reactivos biológicos	41
6.1.2 Material de laboratorio y consumibles	41
7.0 Metodología	42
7.1 Selección de primers	42
7.2 Inducción del Infarto Miocárdico	47
7.3 Extracción de mRNA	47
7.4 Cuantificación de las muestras	48
7.5 RT-PCR	48
7.6 Amplificación	49
7.7 Análisis estadístico	51
8.0 Resultados	52
9.0 Análisis de resultados	57
10.0 Conclusiones	62
11.0 Perspectivas	63
12.0 Referencias	64

ABREVIATURAS

IM	Infarto de Miocardio
CI	Cardiopatía Isquémica
SRA	Sistema Renina Angiotensina
Ang I	Angiotensina I
AT₁	Receptor tipo I de Angiotensina II
AT₂	Receptor tipo II de Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang II	Angiotensina II
SCC	Sistema Calicreína-Cinina
BK	Bradicinina
B₁	Receptor tipo I de Bradicinina
B₂	Receptor tipo II de Bradicinina
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECA2	Enzima Convertidora de Angiotensina 2
ADP	Adenosín Difosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
GDP	Guanosín Difosfato
GTP	Guanosín Trifosfato
PIP₂	Fosfatidilinositol Bifosfato
IP3	Inositol-1,4,5-trisfosfato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Cinasa C
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
COX-2	Ciclooxigenasa-2
SHP-1	Proteína Tirosina Fosfatasa
MLV	Músculo Liso Vascular
CE	Célula Endotelial
ON	Óxido Nítrico
GMPc	Guanosín Monofosfato cíclico
SHP-1	Proteína Tirosina Fosfatasa
CPN	Carbopeptidasa N
CPM	Carbopeptidasa M
EPN	Endopeptidasa Neutra
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
PRCP	Enzima Prolilcarboxipeptidasa
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas de mortalidad por enfermedades México y los países de la OCDE	16
Figura 2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona	19
Figura 3. Modelo del receptor AT ₁	24
Figura 4. Estructuras celulares involucradas en el mecanismo excitación-contracción de los miocitos cardíacos	26
Figura 5. Mecanismo de contracción muscular.	27
Figura 6. Modelo del receptor AT ₂	28
Figura 7. Sistema calicreínas-cininas	31
Figura 8. Representación de la secuencia de aminoácidos de los receptores B ₁ y B ₂ en humano	34
Figura 9. Receptores de cininas y vías de transducción implicadas en sus efectos fisiológicos.....	36
Figura 10. Interacciones entre el sistema renina-angiotensina y el sistema calicreína-cinina	37
Figura 11. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de GAPDH.....	42
Figura 12. Especificaciones de primers para GAPDH.....	43
Figura 13. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA.....	43
Figura 14. Especificaciones de primers para ECA.....	43
Figura 15. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA2.....	44
Figura 16. Especificaciones de primers para ECA2.....	44
Figura 17. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de AT ₁	41
Figura 17. Especificaciones de primers para AT ₁	45
Figura 19. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de AT ₂	45
Figura 20. Especificaciones de primers para AT ₂	45
Figura 21. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de B ₁	46
Figura 22. Especificaciones de primers para B ₁	46
Figura 23. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de B ₂	46
Figura 24. Especificaciones de primers para B.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de estimulación de los receptores de Ang II.....	23
Tabla 2. Secuencia y tamaño de producto de los primers de GAPDH, ECA, ECA2, AT ₁ , AT ₂ , B ₁ y B ₂	42
Tabla 3. Reactivos y volumen utilizados en RT-PCR	48
Tabla 4. Condiciones a utilizar en el termociclador para RT-PCR	49
Tabla 5. Reactivos a utilizar y cantidades en la amplificación	50
Tabla 6. Condiciones a utilizar en el termociclador para la amplificación	50
Tabla 7. Temperaturas de alineamiento para cada proteína	51
Tabla 8. Expresión de ECA y ECA2.....	52
Tabla 9. Expresión relativa de B ₁ y B ₂	53
Tabla 10. Expresión relativa de AT ₁ y AT ₂	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Expresión de ECA en ventrículo izquierdo infartado	52
Gráfica 2. Expresión relativa de ECA2 en ventrículo izquierdo infartado	53
Gráfica 3. Expresión relativa de B ₁ en ventrículo izquierdo infartado	54
Gráfica 4. Expresión relativa B ₂ en ventrículo izquierdo infartado	54
Gráfica 5. Expresión relativa de AT ₁ en ventrículo izquierdo infartado.....	55
Gráfica 6. Expresión relativa de AT ₂ en ventrículo izquierdo infartado	56
Gráfica 7 .Comparación de la expresión relativa del mRNA de las proteínas del SRA y SCC en ventrículo izquierdo infartado.....	56

1.0 Introducción

El infarto agudo de miocardio constituye una de las enfermedades más frecuentes y de elevada mortalidad en los servicios de urgencias, representando un gran problema de salud pública. Actualmente existe un ascenso progresivo de la mortalidad por Cardiopatía isquémica (CI) en las mujeres, se estima que la mortalidad incrementará al 59.8% en el 2025 [41].

El infarto de miocardio (IM) es la necrosis de miocitos secundaria a una obstrucción completa y sostenida del flujo sanguíneo en una de las arterias coronarias. Este proceso activa diversos mecanismos de regulación, entre ellos:

1. Sistema renina angiotensina (SRA), en el que la angiotensina II es el producto principal y sus efectos biológicos son mediados a través de la activación de diferentes receptores a nivel celular, de los cuales los más estudiados son el AT₁ y AT₂. Ambos receptores acoplados a proteína G, comparten aproximadamente el 34% de su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, su función es diferente, por un lado AT₁ produce vasoconstricción, estimula la proliferación celular de miocitos e induce la apoptosis celular, mientras que AT₂ antagoniza las acciones del receptor AT₁.
2. Sistema calicreína-cinina, uno de sus mediadores la bradicinina cuyos receptores son B₁ y B₂, ambos acoplados a proteína G y comparten el 36% de su identidad en la secuencia de aminoácidos.

El conocimiento de ambos sistemas es de gran importancia, ya que constituye un avance importante en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue determinar la expresión del mRNA del receptor AT₁ y AT₂ de angiotensina y los receptores B₁ y B₂ de bradicinina así como, las enzimas ECA y ECA2, en un curso temporal de infarto al miocardio en ratas Wistar macho, mediante PCR tiempo real, con el fin de entender los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades cardiovasculares.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 Infarto de miocardio

2.1.1 Definición

Desde el punto de vista patológico, el infarto de miocardio (IM) es la necrosis de miocitos secundaria a una obstrucción completa y sostenida del flujo sanguíneo en una de las arterias coronarias.

Sin embargo, en 2012 se presenta la definición universal de IM, que destaca dos aspectos fundamentales: la importancia de la troponina en el diagnóstico y por otro define cinco tipos de infarto: 1) Infarto agudo de miocardio (IAM) espontáneo relacionado a un evento coronario primario; 2) IAM secundario a un aumento de la demanda de oxígeno por el miocardio o a un déficit de oferta, no relacionados a un accidente de placa; 3) muerte súbita vinculada a isquemia miocárdica; 4) IAM en el contexto de una intervención coronaria percutánea y 5) IAM en el escenario de una cirugía de revascularización miocárdica [39].

2.1.2 Clasificación

El IM puede clasificarse con base en:

A) Extensión.

Infarto transmural, también denominado infarto con onda Q, es cuando la necrosis abarca todo o casi todo el grosor del músculo cardíaco. Mientras que el infarto subendocárdico o infarto sin onda Q es aquel en el que la necrosis abarca solamente la pared interna del miocardio

B) Localización.

Se afectan los territorios con mayor riesgo de que la irrigación se haga insuficiente, de tal manera que el infarto sea casi exclusivo del ventrículo izquierdo que dentro de éste se ubique de preferencia en el tercio distal en cuanto al espesor, se afecte preferentemente el territorio subendocárdico

El infarto exclusivo del ventrículo derecho es excepcional sin embargo, puede ocurrir como extensión de un infarto del ventrículo izquierdo. Cerca del 50% de los infartos son anteroseptales, alrededor de un 30% son posteroseptales y aproximadamente

un 15% son laterales. El infarto septal puro es raro, lo mismo, el llamado circunferencial, que compromete todos los territorios del ventrículo izquierdo

C) Tiempo

Infarto agudo o en evolución (6 horas a 7 días). Después de una obstrucción del 100% del flujo coronario por 15 minutos se inicia la necrosis celular, caracterizada por coagulación la cual se establece a las 4 ó 6 horas, dependiendo de la presencia de circulación colateral, oclusión coronaria intermitente, miocardio preacondicionado y sensibilidad de miocitos.

Infarto reciente o en cicatrización (7 a 28 días). Se establece por la presencia de monocitos y fibroblastos, sin leucocitos polimorfonucleares.

Infarto antiguo o cicatrizado (>28 días). Se identifica por la presencia de tejido fibroso sin infiltración celular [15]

2.1.3 Fisiopatología del infarto

El infarto al miocardio tiene su base fisiológica en la fragmentación de un trombo inicial de gran tamaño, lo que conlleva a una obstrucción total y sostenida de las arterias coronarias, finalizando en la muerte de miocitos. La onda de muerte celular comienza en el subendocardio y progresa hacia el subpericardio.

La necrosis aguda miocárdica después del infarto conlleva a una pérdida abrupta de tejido, lo que produce un incremento en la sobrecarga ventricular, con lo cual comienza el proceso de remodelación [2].

- Remodelación temprana

La remodelación temprana ocurre en las primeras 72 horas y es producto de la degradación de colágena entre los miocitos por proteasas séricas y de la activación de metaloproteasas liberadas por los neutrófilos. Ocurre dentro de las primeras horas después del infarto, produce adelgazamiento y dilatación ventricular, lo cual causa elevación del estrés parietal sistólico y diastólico.

La expansión del infarto se caracteriza por la alteración en la topografía ventricular, consecuencia del adelgazamiento y dilatación del segmento infartado, lo cual incrementa el área de superficie ventricular del miocardio necrótico, además la expansión del infarto causa deformación de los bordes infartados y del miocardio cercano, lo cual altera la relación Frank-Starling con lo que disminuye el acortamiento.

Estas alteraciones hemodinámicas se caracterizan por caída del gasto cardíaco, disminución de la presión arterial sistémica, que activan el sistema adrenérgico, estimulan la producción de catecolaminas en la médula suprarrenal y las terminaciones simpáticas activando de manera directa el sistema renina-angiotensina-aldosterona, así como, la producción de péptidos natriuréticos auricular y cerebral [2].

- Remodelación tardía

Ocurre posterior a las 72 horas, comprende la hipertrofia ventricular y las alteraciones en la arquitectura ventricular para distribuir el incremento del estrés parietal hasta que la matriz extracelular forme la cicatriz de colágena para estabilizar la fuerza y prevenir deformaciones futuras. Este proceso se inicia después de los primeros tres días del infarto y puede durar hasta meses [2].

2.1.3.1 Regulación de la contractilidad

Cuando la función de bomba del corazón se haya deprimida se ponen en marcha una serie de mecanismos compensadores para tratar de mantener el gasto cardíaco y asegurar el riego de los órganos jerárquicamente superiores, la vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático desempeña una función importante.

- A) Ley de Frank-Starling establece que cuando más se estira el músculo mayor será la fuerza contráctil esto permite igualar la eyección de los ventrículos derecho e izquierdo y mantener el mismo volumen de sangre fluyendo en ambas circulaciones: la sistémica y la pulmonar. Si el lado izquierdo del corazón bombea más sangre que el lado derecho, el volumen de sangre que retorna al ventrículo derecho (retorno venoso) aumenta. El incremento del volumen final de diástole causa una contracción del ventrículo derecho más

intensa en el latido siguiente, retornando nuevamente al equilibrio ambos ventrículos

- B) La frecuencia cardiaca: cuando aumenta se incrementa la fuerza contráctil, mientras que la disminución produce efecto inverso, es el llamado Fenómeno de la Escalera. Probablemente se deba a una mayor entrada de Na^+ y Ca^{2+} en las células que al rebasar la capacidad de la bomba $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPasa}$, incentivan el intercambio reverso $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ provocando mayor cantidad de Ca^{2+} intracelular y mayor contractilidad

Los agentes inotrópicos positivos son los que promueven la entrada de Ca^{2+} a la fibra muscular cardíaca durante los potenciales de acción, lo cual aumenta la fuerza en la próxima contracción. Por lo tanto, para una precarga constante, el volumen sistólico aumenta cuando una sustancia inotrópica positiva está presente [10]

- C) Propiedades intrínsecas del músculo cardíaco, que además está bajo control neurohumoral (incluyendo SNS, Ang II y endotelina).

La primera respuesta a la caída de la tensión arterial es la activación del sistema nervioso simpático, que produce un aumento de las catecolaminas circulantes (fundamentalmente de la noradrenalina, que aumenta la contractilidad, la frecuencia cardíaca y la vasoconstricción), disminuyendo sin embargo los depósitos intramiocárdicos de las mismas y los receptores betaadrenérgicos, lo que origina menor respuesta a las catecolaminas exógenas.

Por tanto, la activación crónica del SNS probablemente por exposición excesiva y continuada a cantidades crecientes de noradrenalina agota las reservas miocárdicas de la misma y da lugar a una regulación a la baja de la densidad de los receptores beta, con disminución de la respuesta cardiaca al sistema adrenérgico y a los agonistas exógenos que tienen efecto inotrópico y lusitrópico. [10]

Posteriormente actúa el sistema renina-angiotensina-aldosterona, debido a que se produce un aumento de renina por:

- La actividad del sistema nervioso simpático que incrementa su producción por la acción de las catecolaminas.
- Menor perfusión renal.
- La disminución del sodio sérico (por la restricción y los diuréticos)

2.1.4 Epidemiología

2.1.4.1 Prevalencia en México

La cardiopatía coronaria en el país es la patología cardiovascular dominante, siendo la principal causa de la muerte en los ancianos y segundo en la población general. En 2011, la enfermedad isquémica del corazón fue responsable de 71,072 muertes, lo que representa aproximadamente el 11% de todas las muertes en el registro de México [17].

De acuerdo con información de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) en México la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (ECV) es de 292 por 100 000 habitantes, aún menor que el promedio de la OCDE de 299 (Figura 1), lo que sugiere que las ECV ha disminuido más lentamente que en muchos países de la OCDE [47].

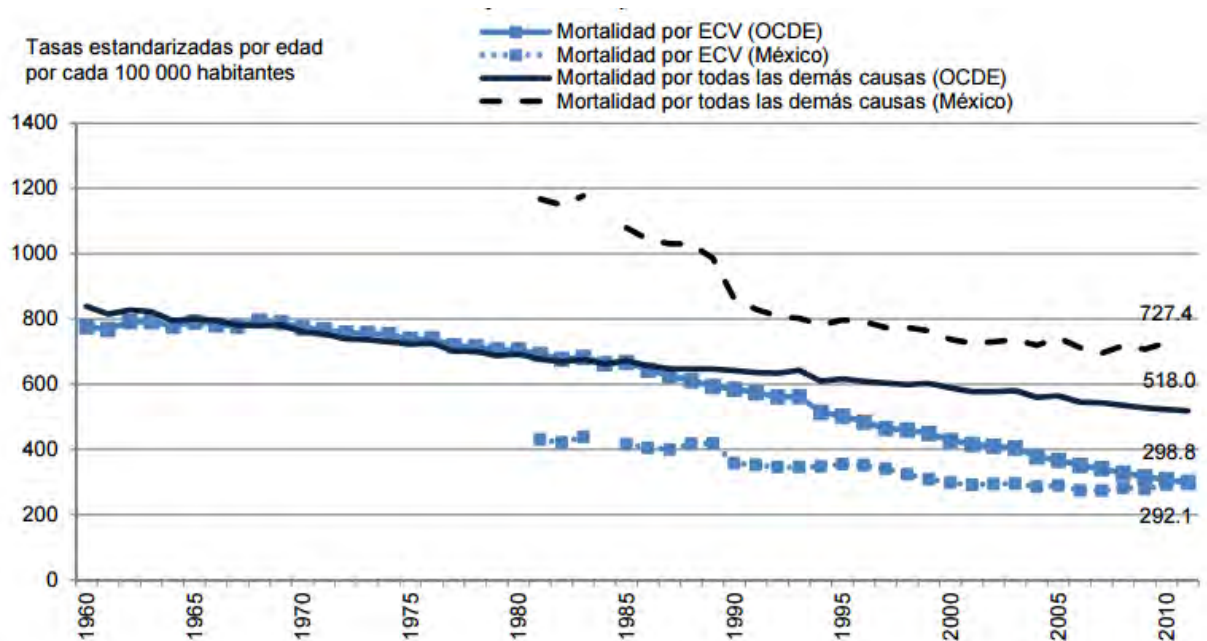


Figura 1. Tasas de mortalidad por enfermedades México y los países de la OCDE

Del mismo modo, OCDE reporta que la tasa de mortalidad dentro de los 30 días siguientes a la hospitalización por IAM es la más alta, de 27.2%, más de tres veces mayor que el promedio de la OCDE (7.9%). Las tasas reportadas de mortalidad por casos de infarto isquémico se han deteriorado en años recientes y, si bien se han logrado algunos avances en el IAM y el infarto hemorrágico, la mejora es más lenta que en muchos países de la OCDE [47].

La incidencia y prevalencia de IM, incrementa con la edad, especialmente después de los 45 años. La mujer que debuta con infarto agudo como presentación inicial generalmente es mayor que el hombre entre 6 a 10 años y tiene mayor comorbilidad (Diabetes, Hipertensión, Hipercolesterolemia e insuficiencia Cardíaca). La edad promedio para la ocurrencia del primer infarto es de 70.4 años [33]. Los datos combinados de mortalidad y morbilidad, general y hospitalaria, indican que la letalidad hospitalaria llega a ser de 25% por IAM [7].

Se estimaba que la Cardiopatía isquémica afectaba a la población con relación 3:1 hombre-mujer. Sin embargo, actualmente existe un ascenso progresivo de la mortalidad en las mujeres, con una tasa de mortalidad de 43.1% en el 2006, se estima incrementará al 59.8% en el 2025. Por lo tanto constituye la principal causa de defunción en las mujeres, aun por arriba de la cifra que ocupan todos los tipos de cáncer juntos; representa, en consecuencia, un gran problema de salud pública [41]. La edad avanzada y el cúmulo de factores de riesgo, explica las tasas de fatalidad por IAM en la mujer (32% vs 27% en hombres) [33].

2.1.4.2 Prevalencia en el mundo

Las enfermedades cardiovasculares han incrementado progresivamente su presencia en el mundo, de tal modo que han llegado a ser la primera causa de mortalidad entre los países de altos ingresos y los de medianos y bajos ingresos de acuerdo a los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud. Según las estimaciones de la OMS, más de 17.5 millones de personas murieron en 2012 de infarto de miocardio o de accidente vascular cerebral (AVC) y prevé que en el 2020, la enfermedad isquémica del corazón (EIC) será responsable de 11,1 millones de

muerdes, por lo que su prevención constituye un reto para las autoridades sanitarias de todos los países del mundo.

Recientemente, la oficina de estadística oficial de la *American Heart Association* ha estimado que aproximadamente 15,4 millones de personas mayores de 20 años en Estados Unidos padecen cardiopatía isquémica, ello corresponde a una prevalencia total de ECV entre los mayores de 20 años del 6,4% (el 7,9% de los varones y el 5,1% de las mujeres). En lo que se refiere al infarto de miocardio, la tasa de prevalencia se estima en el 2,9% (el 4,2% de los varones y el 2,1% de las mujeres) [14.]

Aunque la prevalencia de ECV se incrementa con la edad tanto en varones como en mujeres, un estudio estadounidense, también basado en encuestas, mostró cierta variación en las últimas décadas en la relación de prevalencias varones:mujeres de mediana edad (35-54 años). Así, aunque la prevalencia fue más alta en los varones que en las mujeres tanto en 1994-1998 como en 1999-2004, en este periodo se observó una tendencia a una disminución de prevalencia entre los varones y un incremento entre las mujeres (2,5 frente a 0,7 en 1998-1994 y 2,2 frente a 1,0 en 1999-2004) [14].

2.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

El SRA es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, en el que la Ang II es el producto principal y sus efectos biológicos son mediados a través de la activación de diferentes receptores a nivel celular, de los cuales los más estudiados son el AT₁ y AT₂.

El SRA es un sistema que en condiciones fisiológicas, interviene en la regulación de la presión arterial y la homeostasis de líquidos corporales, este sistema tiene diversas acciones en el sistema cardiovascular, incluyendo un potente efecto vasoconstrictor, síntesis y secreción de aldosterona en las glándulas suprarrenales con lo que aumenta la reabsorción tubular de sodio, el volumen plasmático circulante efectivo y por ende la presión arterial.

Este sistema comienza con la renina que es una aspartil proteasa, sintetizada y almacenada en el aparato yuxtaglomerular, que cataliza de manera específica la

liberación hidrolítica del decapeptido Ang I a partir del angiotensinógeno de 452 aminoácidos, sintetizado principalmente en el hígado. Posteriormente, la Ang I es convertida al octapéptido Ang II por la ECA [34].

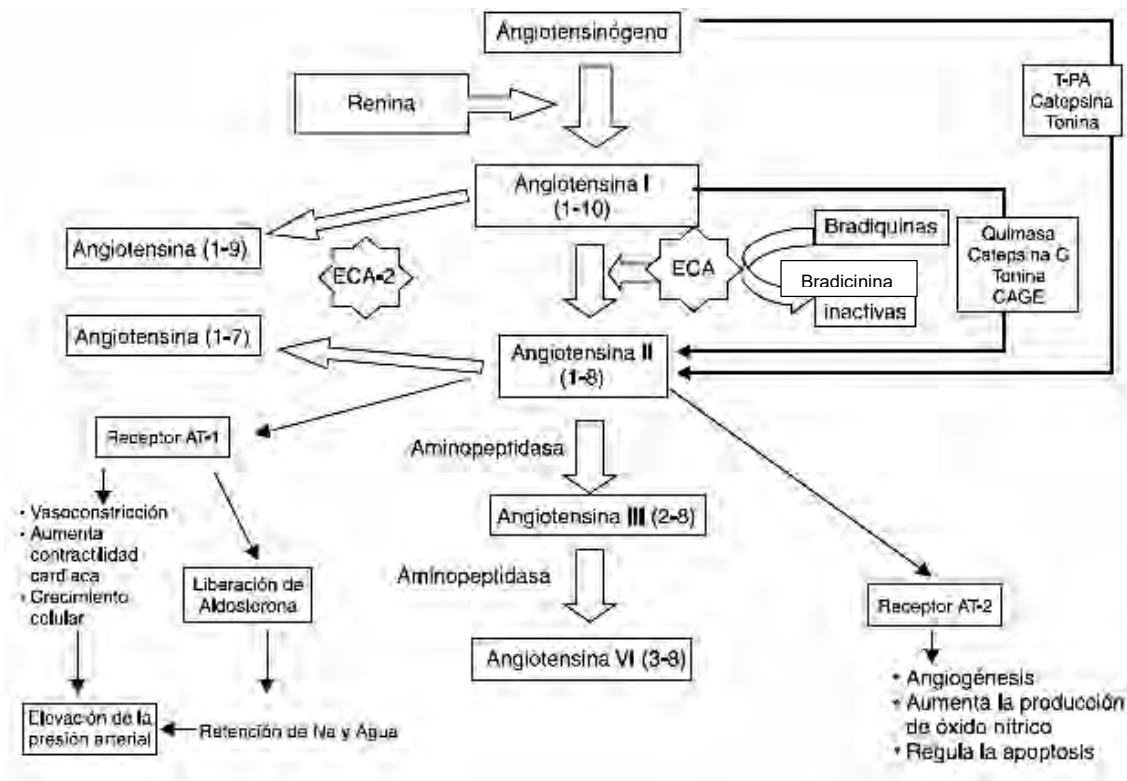


Figura 2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona [34].

Los componentes principales que forman este sistema son: la renina, el angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la Ang II y los receptores de siete dominios transmembranales AT₁ y AT₂.

2.2.1 Renina

Es una proteasa aspártica sintetizada como un zimógeno inactivo en las células granulares del aparato yuxttaglomerular renal a partir de un precursor, la prorenina. Actúa sobre el enlace existente entre Leu y Val de su sustrato, el angiotensinógeno y lo transforma en el decapeptido denominado Ang I [10].

El riñón es la fuente de síntesis más importante de renina, aunque otros tejidos tienen esa capacidad, entre los que se incluyen las glándulas salivales, paredes vasculares, tracto genital, glándulas suprarrenales, tejido tumoral y cerebro.

Sintetizada como prezimógeno (pre-prorenina) en células yuxtaglomerulares renales. El producto primario de la traducción del mRNA (pre-prorenina) contiene un péptido señal, que es eliminado rápidamente en el retículo endoplásmico, dando lugar al zimógeno (prorenina), este, puede ser empaquetado en gránulos de almacenamiento donde se lleva a cabo la maduración postraducciona, que incluye la activación de la pro-renina a renina mediante rotura proteolítica y glicosilación, procesos todavía poco conocidos. La renina, es posteriormente eliminada de los gránulos secretorios o transportada a través de la membrana hacia la sangre.

La renina circulante puede ser captada por la pared vascular, donde es capaz de actuar localmente sobre el angiotensinógeno para producir angiotensina, ya que las células del endotelio vascular no solo muestran un sistema enzimático de membrana capaz de activar la renina circulante inactiva, sino que también, las células vasculares son capaces de sintetizar renina parietal vascular que puede mostrar importantes funciones fisiológicas. Posteriormente se observó que no sólo sintetizan la forma activa, sino también la inactiva y dado que las células contenían tanto angiotensinógeno como Ang I es probable que la Ang II sea generada por completo a nivel intercelular, esta vía, es la constitutiva para la secreción de prorenina o renina inactiva [25].

2.2.2 Angiotensinógeno

El angiotensinógeno es una $\alpha - 2 - globulina$ con 452 aminoácidos que da origen a todas las angiotensinas. Esta proteína se forma como preangiotensinógeno y pierde el péptido señal cuando la célula lo secreta como angiotensinógeno. El angiotensinógeno se presenta en el plasma en dos formas, una molécula predominante más pequeña (52 a 60 kD) y una molécula más grande (450 a 500 kD).

El hígado es el órgano donde se produce la síntesis primaria de angiotensinógeno, pero este no se almacena, sino que se secreta en forma directa después de su producción. El mRNA del angiotensinógeno se distribuye en forma amplia en diversos tejidos regulados por los sistemas locales de renina angiotensina, por ejemplo el sistema nervioso central, el riñón, la glándula suprarrenal, el corazón y los leucocitos. Varias hormonas estimulan la síntesis de angiotensinógeno en el hígado, como los estrógenos y los glucocorticoides. Los estímulos estresantes como

la infección y la lesión tisular también aumentan las concentraciones plasmáticas de angiotensinógeno. Además existe un control por retroalimentación a través del SRA, dado que Ang II aumenta las concentraciones plasmáticas de angiotensinógeno y la renina los disminuye [43].

2.2.3 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La ECA es una enzima glucoprotéica de cadena única que contiene zinc. También se le denomina cinasa II y es una dipeptidilcoboxipeptidasa que separa dos aminoácidos del extremo carboxiterminal de la Ang I, para formar Ang II y de manera simultánea participa en el sistema calicreína-cinina a través de la desactivación de la bradicinina [43].

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

1. ECA somática: 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 con un sitio catalítico activo cada uno (Sitio activo N-terminal y sitio activo C terminal), 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.
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.
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 [34].

Algunos lechos endoteliales como los del corazón y el riñón pueden expresar una enzima convertidora (ECA2), la cual tiene un 40% de homología en la secuencia de aminoácidos con ECA, pero diferente especificidad de sustrato [8]. Hoy en día se sabe que la ECA2 se expresa predominantemente en testículo, riñón y corazón, en células de músculo liso de vasos intra miocárdicos y en cardiomiocitos.

ECA2 es un regulador negativo del SRA, cataliza la conversión de angiotensina I a Ang (1-9), que a su vez, se puede convertir en Ang (1-7) por ECA. ECA2 también hidroliza directamente Ang II de la Ang (1-7) con alta afinidad catalítica [35].

Estudios recientes han mostrado evidencia de que la sobreexpresión de la ECA2 a nivel del miocardio se asocia a prevención de la hipertrofia y fibrosis hipertensiva inducida por Ang II, disminución en la producción de colágeno II y III inducido por hipoxia en cultivo primario de fibroblastos y protección de la función cardíaca y endotelial en isquemia coronaria permanente [32].

2.2.4 Angiotensina II

Es un octapéptido sintetizado a partir de angiotensina I mediante la ECA vía cascada renina-angiotensina-aldosterona aunque esta potente neurohormona puede ser producida localmente, vía paracrina y autocrina, en los tejidos [25].

Existen dos vías alternativas que pueden suceder en algunos tejidos como el cardíaco, el renal y el nervioso, ya que se han encontrado los componentes para generar Ang II (angiotensinógeno, renina, ECA): la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, (teniendo como sustrato la angiotensina I) y a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato el angiotensinógeno). A este sistema de generación tisular de Ang II se le conoce como Sistema Local Generador de Angiotensina II (SLGAI). El estímulo de estas vías alternativas puede ser consecuencia de dilataciones, sobrecargas y turbulencias a nivel vascular [29].

Ang II activa varias funciones de las células y las vías de señalización moleculares relacionados con daño tisular, inflamación y fibrosis, incluyendo la movilización del calcio, la generación de radicales libres, la activación de las proteínas quinasas y factores de transcripción nucleares, reclutamiento de células inflamatorias, la

adhesión de monocitos y neutrófilos a células endoteliales y mesenquimales, regulación de las moléculas de adhesión y la estimulación de la expresión, la síntesis y liberación de citocinas y quimiocinas [36].

La degradación de la Ang II por aminopeptidasas lleva a la formación de la angiotensina III y angiotensina IV cuya actividad biológica es poco conocida.

2.3 Receptores de Angiotensina II

Los efectos biológicos de la Ang II tanto a nivel circulatorio (SRA) como a nivel de los tejidos (SLGAII), son mediadas por dos subtipos principales de receptores: el receptor AT₁ y el receptor AT₂. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranales y comparten aproximadamente el 34% de su secuencia de aminoácidos, de tal manera que se une a ambos con similar afinidad [18]. Sin embargo, la acción funcional dependerá por lo tanto de qué receptor se encuentre con más expresión en el organismo

Sitio	AT ₁	AT ₂
Arterias	<ul style="list-style-type: none"> • Vasoconstricción • Hipertrofia • Induce apoptosis • Angiogénesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatación • Promueve la apoptosis del musculo liso vascular • Producción de ON por estimulación de la ENOs • Disminuye la expresión de los receptores 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 receptores AT₁

Tabla 1. Efectos de estimulación de los receptores de Ang II [34].

2.3.1 Receptor AT₁

Es un péptido que contiene 360 aminoácidos con 7 dominios transmembranales (Imagen 2 B) y una masa molecular de 41 KDa [29]. Perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteína G, se caracteriza por acoplarse a proteínas G_{αq/11},

aunque también se puede acoplar a $G_{\alpha i/0}$, $G_{\alpha 12/13}$ debido a un fenómeno conocido como selectividad funcional o de señalización sesgada [6].

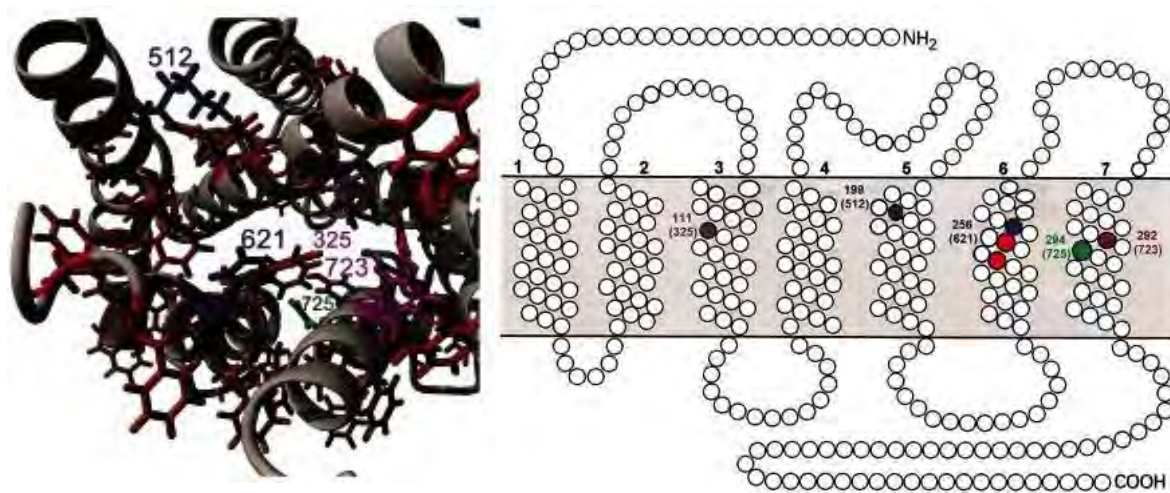


Figura 3. Modelo del receptor AT₁ [31].

Recientemente se propone un nuevo modelo en el cual Ang II se une a AT₁ mediante tres aminoácidos: 111 (consenso 325) que interactúa con Tyr (4) de Ang II, 199 y 256 (consenso 512 y 621) que interactúan Phe (8) de Ang II [31]. Dichos aminoácidos implicados en la activación de AT₁ se observan de color magenta y azul en la imagen 2A.

En los humanos, el receptor AT₁ es codificado por un solo gen ubicado en el cromosoma 3q21-25, mientras que en los ratones se conocen 2 genes localizados en los cromosomas 17 y 2 que dan origen a dos formas del receptor AT₁ conocidas como: receptor AT_{1a} que se localiza a nivel vascular y el receptor AT_{1b} a nivel de la suprarrenal, respectivamente, con más de 95% de similitud en su secuencia de aminoácidos.

Se localiza primariamente en las glándulas suprarrenales, músculo liso vascular, riñón, corazón, hígado y útero. En el cerebro se localiza en áreas específicas implicadas con la acción de la Ang II, la liberación de vasopresina y el control neurogénico de la presión arterial como son las regiones circunventriculares, el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático y el núcleo del conducto solitario. Sin embargo, encontramos que las proporciones AT₁ - AT₂ son diferentes. Así en hígado y riñón el 90% son AT₁, el corazón contiene similares cantidades de ambos tipos,

mientras que en la médula adrenal hay un descenso proporcional del subtipo AT₁ [25].

2.3.1.1 Función

Una vez estimulado el receptor AT₁ por la Ang II, se inician varias vías de señalización que conllevan a una serie de efectos sistémicos, actuando de dos formas: 1) como hormona circulante: produciendo vasoconstricción, estimulación de la síntesis de aldosterona y vasopresina y por otro lado, 2) un efecto autocrino y paracrino: estimulando la proliferación celular de miocitos y de músculo liso vascular, formación de colágeno e induciendo la apoptosis celular.

A) Vasoconstricción.

El receptor AT₁ se acopla a proteínas G_{αq/11}, que es un complejo proteico compuesto por 3 subunidades: α, β y γ. Cuando Ang II se une a AT₁, se modifica la afinidad de la subunidad α por GTP. Al intercambiar GDP por GTP, la subunidad α se activa, se desensambla tanto de AT₁ como del complejo βγ y viaja por la membrana hasta activar fosfolipasa C, la cual hidroliza a fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y genera: inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) que migra al retículo sarcoplasmático y abre canales de calcio, y diacilglicerol (DAG) que permanece en la membrana y activa a la proteína cinasa C (PKC) y calmodulina que catalizan la fosforilación de proteínas como fosfolambana que participan en la contracción de músculo liso. La fosforilación de la y sarcolipin regulan la actividad de bomba de la SERCA2a, la cual desempeña un rol central en el control de la contractilidad regulando la cantidad de Ca²⁺ en el retículo sarcoplasmático y en citosol, y de esta forma la contracción y la relajación miocárdicas. El 70-80% del Ca²⁺ es retirado por la SERCA2a, mientras que el resto es enviado al espacio extracelular principalmente por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y accesoriamente por sistemas lentos de transporte de Ca²⁺ [10].

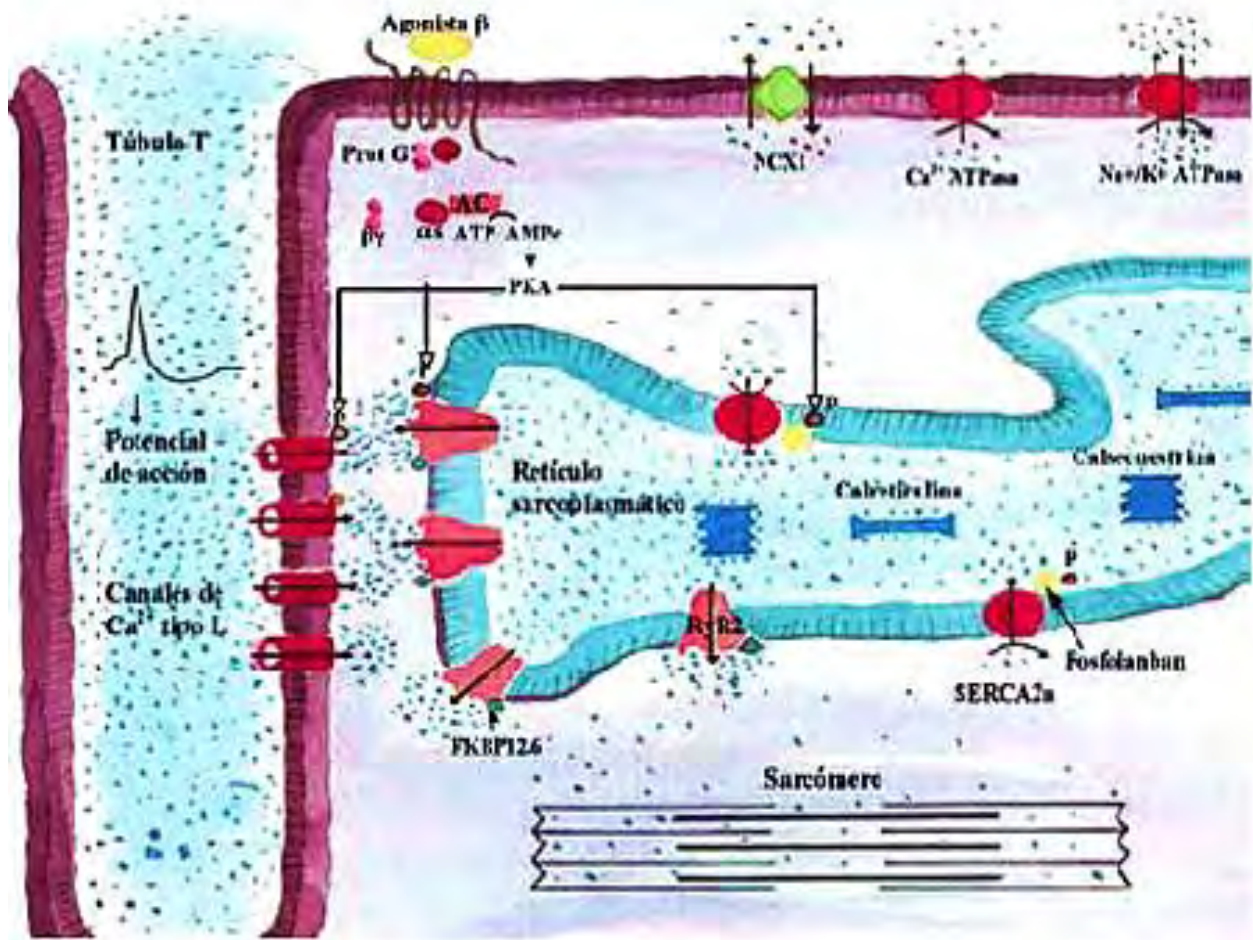


Figura 4. Estructuras celulares involucradas en el mecanismo excitación-contracción de los miocitos cardíacos [40].

La unión de Ang II a AT₁ también permite activar fosfolipasa A, la cual fosforila los RyR2 para su apertura. Estos son receptores rianodínicos que se encuentran en el retículo endoplasmático y permiten la entrada de Ca²⁺ a través de los canales L. El Ca²⁺ que ha penetrado en el citosol se une a la troponina C activándose y alterando su forma, esto resulta a su vez en un desplazamiento de la tropomiosina, dejando expuestos los sitios activos de la actina para que la cabeza de miosina se una formando el complejo actomiosina. Una vez formado dicho complejo, el ADP y el Pi se liberan con rapidez de la cabeza de la miosina, se produce un cambio conformacional de la propia cabeza de miosina y ésta se dobla formando un ángulo de 45° con la actina. Después del desplazamiento, la unión entre las dos moléculas es fuerte y ambos filamentos permanecen unidos. Para su separación se ha de producir la incorporación de ATP a la cabeza de la miosina y la hidrólisis del ATP. La energía liberada por la hidrólisis rápida del ATP lleva a la cabeza de la miosina a su posición original.

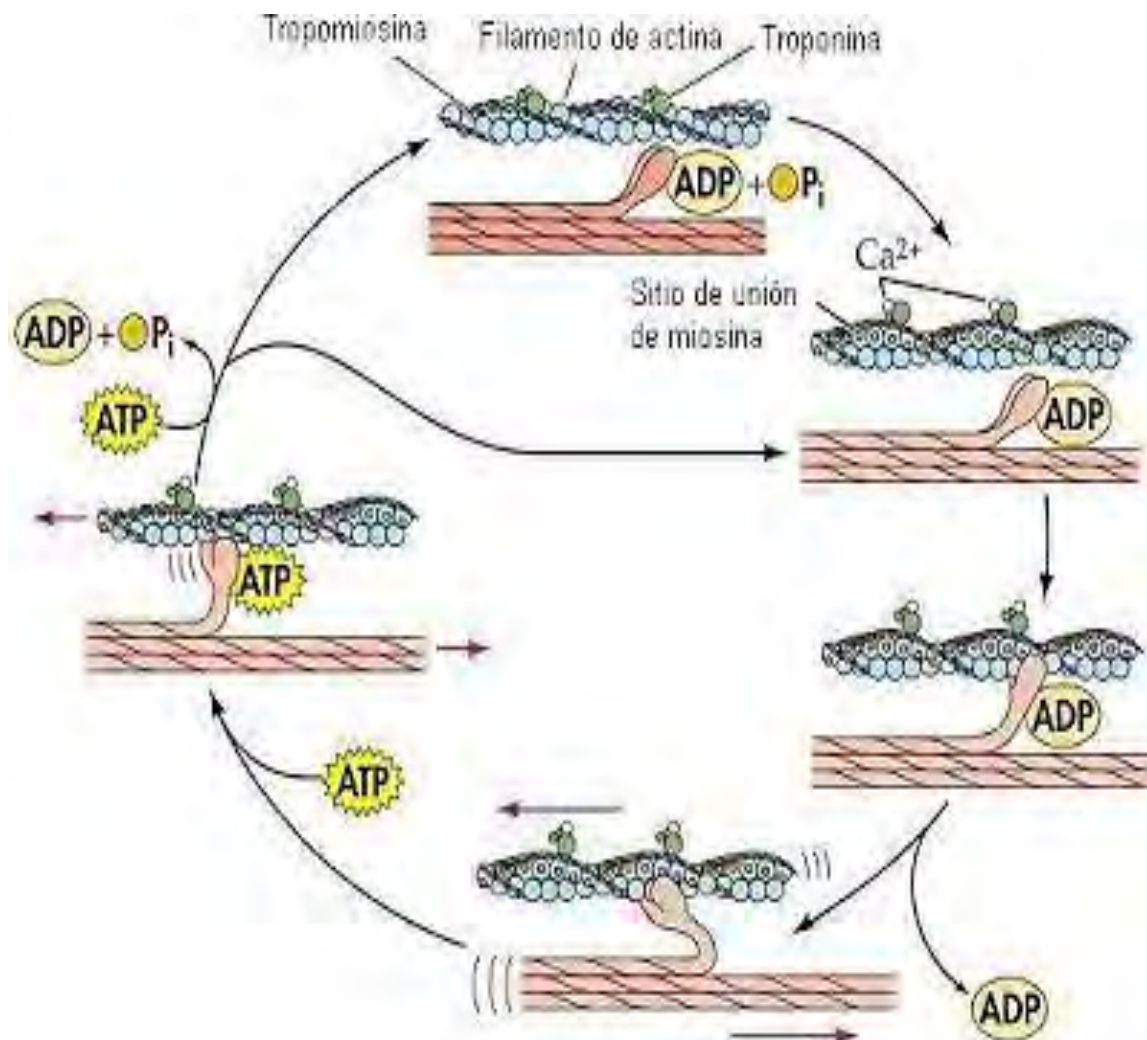


Figura 5. Mecanismo de contracción muscular.

B) Apoptosis celular

La estimulación del receptor AT_1 induce la muerte celular al inhibir la regulación transcripcional de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a través de dos vías: 1) aumenta la regulación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) ocasionando una inactivación extracelular de las señales reguladoras, 2) mediante la elevación de la síntesis de radicales libres de oxígeno por la actividad de la oxidasa de NADH/NADPH.

C) Induce y activa la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y ésta a su vez cataliza la formación de prostaglandinas y de tromboxano A₂. En situaciones de hipoxia tisular la

estimulación del AT₁ induce además la activación del factor-1 inducido por hipoxia, el cual aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando así la angiogénesis y la remodelación vascular.

2.3.2 Receptor AT₂

El AT₂ al igual que el AT₁ cuenta con 7 dominios transmembranales y una masa molecular de 41 KDa [29]. Los aminoácidos implicados en su activación son los mismos de AT₁: 325 que interactúa con Tyr (4) de Ang II, 512 y 621 que interactúan Phe (8) de Ang II [31], como se observa en la imagen 6.

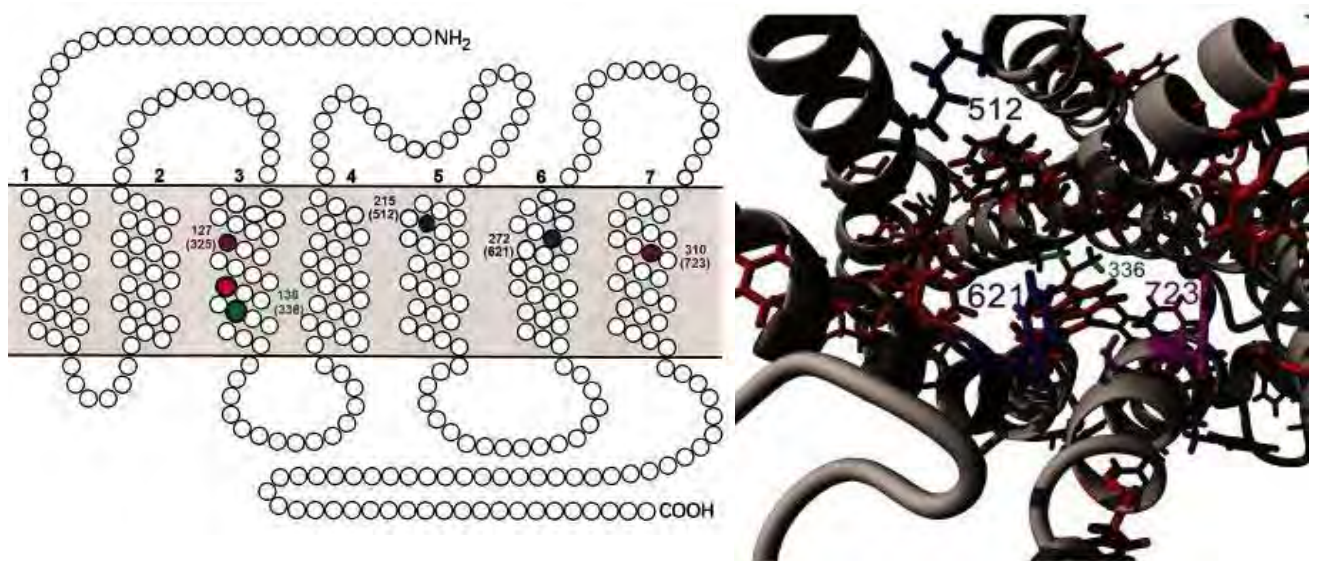


Figura 6. Modelo del receptor AT₂ [31].

El gen que codifica al receptor AT₂ se encuentra en el cromosoma X, tanto en humanos como en ratones y se compone de 3 exones y la secuencia codificadora se encuentra en el tercer exón.

Se expresa de manera predominante durante la etapa fetal, y ésta disminuye con la edad. Sin embargo, permanece expresado en niveles bajos en varios tejidos, por

ejemplo: la aorta y arterias coronarias y con una densidad mucho menor en la médula suprarrenal. Cabe mencionar que en la etapa adulta los niveles de expresión de este receptor incrementan bajo condiciones de estrés o de daño tisular.

2.3.2.1 Función

El receptor AT₂ se acopla a proteínas G inhibitoras: G_{ai/2} G_{ai/3} lo cual provoca la activación de fosfatasa tanto de serina-treonina como la PP2A, así como de tirosina como la proteína tirosina fosfatasa SHP-1. Este acoplamiento provoca la defosforilación de proteínas activadas por el acoplamiento del receptor AT₁-G_{αq}, siendo éste un mecanismo por la cual el receptor AT₂, antagoniza las acciones del receptor AT₁. [29]. Recientemente se ha postulado que ceramida la cual se asocia a la activación de fosfatasa podría ser el segundo mensajero del receptor AT₂ los efectos más visibles de la estimulación del receptor AT₂ son vasodilatación, antiproliferación y disminuye la apoptosis de miocitos (Tabla 1), mediante al menos tres diferentes vías de señalización: el / GMPc óxido nítrico, fosfatasas de proteínas, la fosfolipasa A2.

a) Vasodilatación

Al estimularse el 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 (aumenta 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 (ON), de esta forma se fomenta la relajación vascular al estimular a guanosín monofosfato cíclico (GMPc) [34].

b) Regulación de apoptosis

Una de las mayores funciones del receptor AT₂ es la supresión del crecimiento, ya que provoca activación de la fosfatasa (PP2A), fosfatasa de tirosina (SHP-1), fosfatasa MAP quinasa 1, la proteína (MKP-1) e inactivar quinasa regulada por

señales extracelular (ERK), dando como resultado la defosforilación de la Bcl-2 y la regulación positiva de los efectos de la proteína pro-apoptótica Bax [26].

Además se ha reportado que la homo-oligomerización de los receptores AT₂ induce la apoptosis, sin embargo los efectos de la estimulación de estos receptores no se conocen completamente.

2.4 Sistema Calicreína-Cininas

El SCC es un sistema de proteínas sanguíneas de importancia en las inflamaciones, el control de la presión sanguínea, la coagulación y el dolor. Sus importantes mediadores, la bradicinina y la calidina son vasodilatadores y actúan sobre muchos tipos de células. Está conformado por moléculas peptídicas generadas a partir de proteínas plasmáticas denominadas cininógenos mediante la participación de serín-proteasas específicas denominadas calicreínas. La cascada inicia por la activación del Factor XII de la vía intrínseca de la coagulación mediante su contacto con superficies moleculares cargadas negativamente como colágeno, lipopolisacárido bacteriano, productos plaquetarios entre otros. El Factor XII activado convierte a la precalicreína en una forma proteolítica activa, la enzima calicreína. Esta enzima fragmenta una glucoproteína plasmática, el cininógeno de elevado peso molecular produciendo bradicinina. El cininógeno de bajo peso molecular es fragmentado por la calicreína tisular produciendo calidina [20].

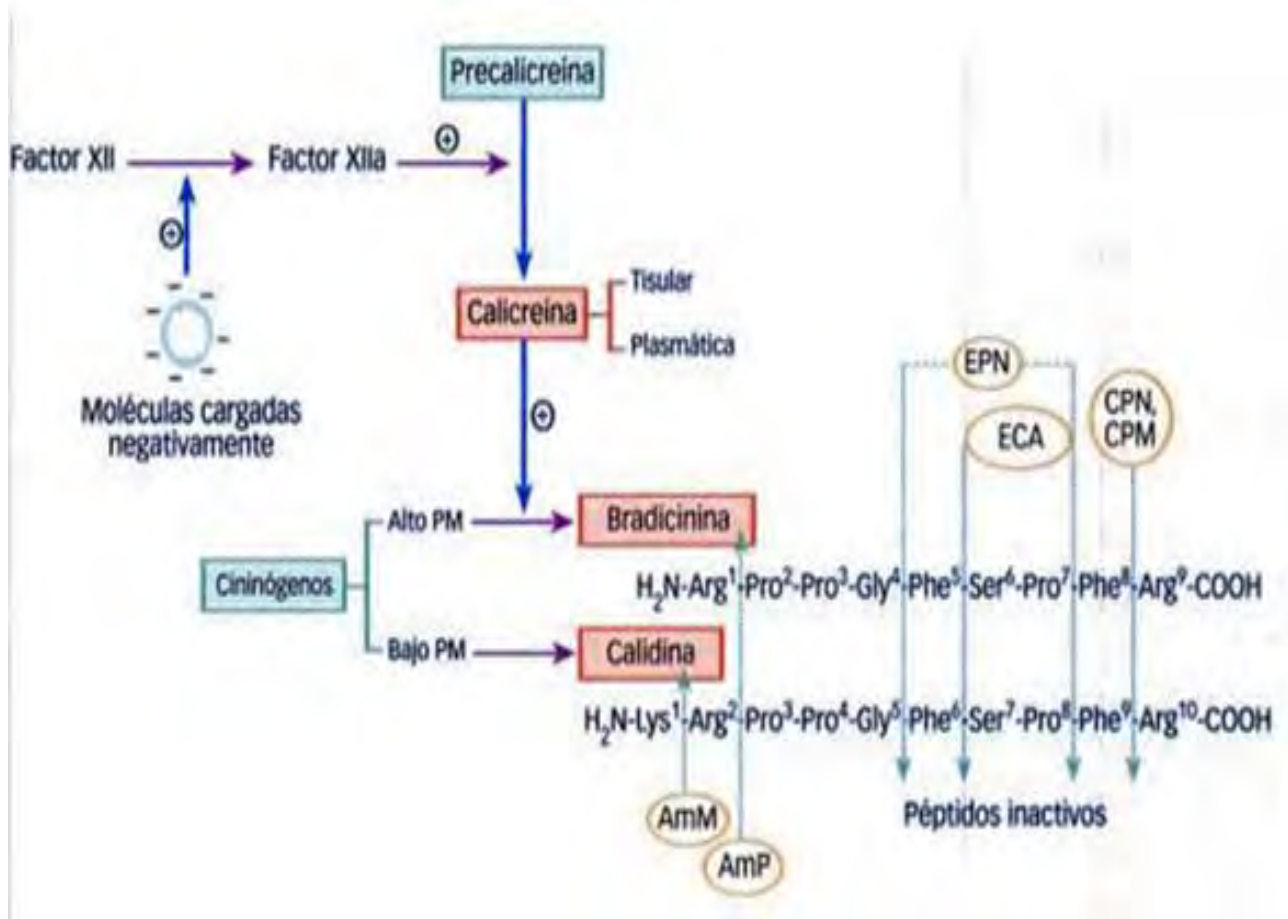


Figura 7. Sistema Calicerina-Cininas [20].

2.4.1 Cininógenos

El cininógeno de elevado peso molecular (CEPM) y el cininógeno de bajo peso molecular (CBPM) son precursores de los polipéptidos. Presentan actividad en sí mismos.

- El CEPM es un producto del hígado, actúa principalmente como cofactor de la coagulación y la inflamación
- El CBPM se produce de forma local en numerosos tejidos y se secreta junto con la calicerina tisular [20]

2.4.2 Calicreínas

Las calicreínas son glucoproteínas pertenecientes a la familia de las serín-proteasas se clasifican de acuerdo a su origen plasmático o tisular.

- a) La calicreína tisular es una glucoproteína de 29 KD que está presente en el riñón, el páncreas, las glándulas salivales, cerebro, tejido cardiovascular, músculo esquelético y leucocitos, actúa sobre el cininógeno de bajo peso molecular generando el decapeptido calidina.
- b) La calicreína plasmática de 36 KD genera el nonapeptido bradisinina [20].

2.4.3 Cininas

Las cininas son polipéptidos activos que se liberan en los tejidos y fluidos biológicos como resultado de la acción enzimática de las calicreínas sobre los cininógenos. Los principales miembros de esta familia son la bradisinina y la calidina y sus efectos fisiológicos son mediados por los receptores B₁ y B₂ [16].

- a) Bradisinina: Es un péptido fisiológico y farmacológicamente activo que está formado por nueve aminoácidos, la secuencia de aminoácidos es la siguiente: arg-pro-pro-gly-phe-ser-pro-phe-arg. La bradisinina causa vasodilatación por medio de la secreción de prostaciclina, óxido nítrico y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. Se produce por desdoblamiento proteolítico de su precursor, el CEPMP.
- b) Calidina: La calidina o lisilbradisinina es un decapeptido, de estructura similar a la bradisinina con un residuo extra del aminoácido lisina. Sus efectos son análogos a los de las otras cininas [16].

Las cininas son vasodilatadoras con una potencia 10 veces superior a la histamina. La vasodilatación arteriolar es mediada por receptores B₂ en la circulación muscular esquelética, renal cutánea, esplénica coronaria y cerebral. Sin embargo en las grandes arterias de conducción y en las grandes venas las cininas producen contracción mediada por receptores B₁, además presentan grandes semejanzas de actuación con los factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), ya que son capaces de incrementar la permeabilidad microvascular, inducir vasodilatación y estimular la liberación de óxido nítrico y

prostanoides. Las cininas desempeñan un papel muy importante en la inflamación, existen numerosos datos experimentales que señalan la sobreexpresión de receptores B₁ como un factor determinante en la respuesta inflamatoria. La bradicinina es uno de los pocos mediadores de la inflamación que estimula directamente las terminaciones sensoriales a través de receptores B₂ en procesos inflamatorios de tipo agudo, sin embargo en procesos inflamatorios de tipo crónico la participación de receptores B₁ tiene más trascendencia [20].

Las cininas tienen una semivida muy corta (15-30 segundos) debido a la eficiencia del sistema degradativo de las cininasas, existen dos tipos de cininasas. Las cininasas de tipo I son la carbopeptidasa N (CPN) y la carbopeptidasa M (CPM), ambas enzimas retiran la arginina terminal de las moléculas de cininas originando los derivados des-Arg⁹ Bradicinina y des-Arg¹⁰ Calidina, los cuales son agonistas de los receptores B₁. Las cininasas de tipo II comprenden la endopeptidasa neutra (EPN) y la ECA que liberan el dipéptido carboxi-terminal Phe-Arg de la bradicinina o la calidina, mientras que la ECA hidroliza el dipéptido Ser-Pro del residuo terminal anterior [20].

2.5 Receptores de cininas

Se conocen dos receptores diferentes de cininas que han sido llamados B₁ y B₂, ambos tipos de receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y poseen 7 dominios transmembrana y comparten el 36% de su identidad en la secuencia de aminoácidos

El receptor B₂ liga selectivamente bradicinina y calidina, es constitutivo de casi todos los tejidos normales. El receptor B₁ normalmente se expresa en pocos tipos de células, liga de modo selectivo a los metabolitos des-Arg de bradicinina y calidina.

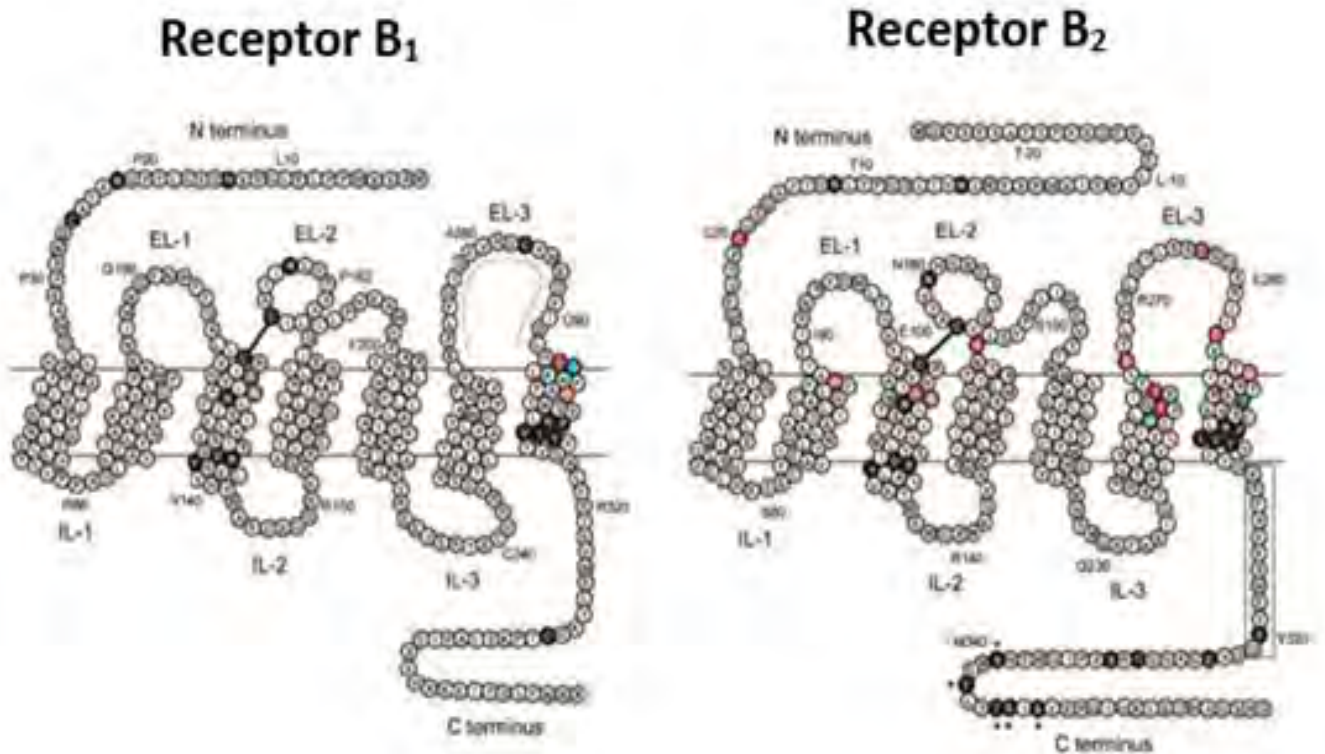


Figura 8. Representación de la secuencia de aminoácidos de los receptores B₁ y B₂ en humano [19].

2.5.1 Receptor B₁

El receptor B₁ normalmente se expresa en pocos tipos de células pero en condiciones tales como isquemia, lesión tisular o exposición a citocinas inflamatorias y factores de crecimiento a través de la activación del factor de transcripción nuclear NF-κB rápidamente se induce su expresión, este receptor liga de modo selectivo a los metabolitos des-Arg de bradicinina y calidina. Está constituido por 353 aminoácidos y el gen que lo codifica en los humanos es BDKRB1 que se localiza en el cromosoma 14.

Los receptores B₁ se acoplan a través de proteína G_q y G_i para activar gran parte de las mismas vías de señalización que el receptor B₂, tras su estimulación activa la PLC que conduce a un incremento del metabolismo y recambio de los fosfoinosítidos. Los productos resultantes de la hidrólisis de estos sustratos de membrana son el IP₃ que incrementa la concentración de calcio intracelular y DAG

que activa la proteincinasa C. Por otra parte la estimulación de la PLA₂ de tipo citosólico incrementa la liberación de ácido araquidónico, sustrato de una gran variedad de mediadores inflamatorios. Sin embargo, el receptor B₁ estimula la producción de óxido nítrico al activar la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y no eNOS [5].

2.5.2 Receptor B₂

La estructura de la proteína del receptor B₂ es típica de la de un receptor acoplado a proteína G que consiste en una única cadena polipeptídica que abarca la membrana siete veces, con el extremo amino-terminal que es extracelular y el carboxi-terminal intracelular y con tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares. Este receptor está compuesto por 364 aminoácidos y se encuentra altamente glucosilado, se expresa de forma constitutiva y participa en la mayoría de los efectos de la bradicinina y la calidina por las que presenta una gran afinidad, el gen que lo codifica es el BDKRB2 y se localiza en el cromosoma 14 sitio q32.1-q32.2.

El receptor B₂ activa PLA₂ y PLC a través de la interacción con proteínas G diferentes. La activación de PLC inducida por cinina a través de G_q activa la vía de IP₃-Ca²⁺ estimulando la activación de PKC y también la síntesis de óxido nítrico por parte de eNOS o NOS3. La bradicinina activa el factor de transcripción NF-κB por medio de las subunidades Gα_q y βγ y también activa la vía de la MAP cinasa.

El acoplamiento de los receptores B₂ a proteína G_i hace que se active la PLA₂ y se libere ácido araquidónico de los fosfolípidos propios de la membrana y es transformado en diversos derivados incluidos mediadores de inflamación y los ácidos epoxieicosatrienoicos y prostaciclina [5].

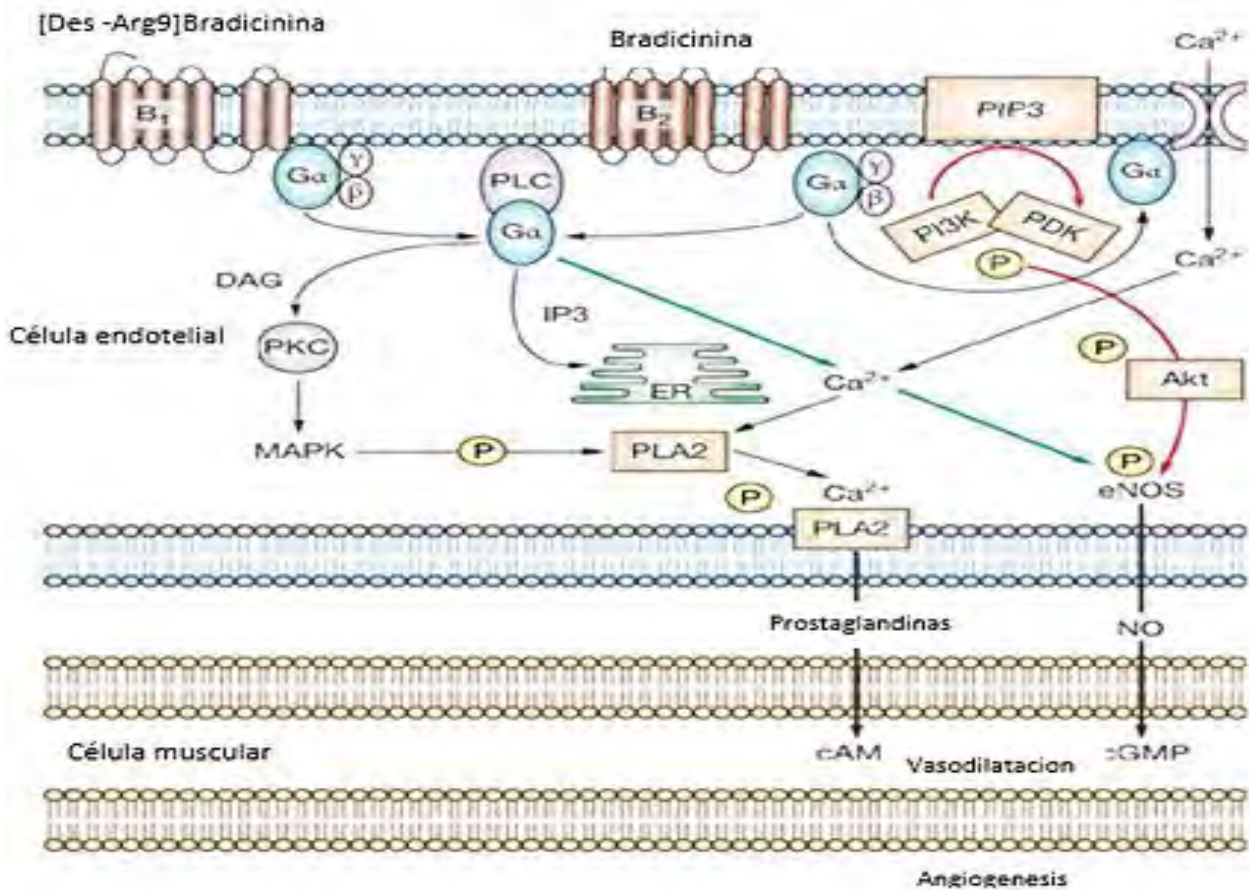


Figura 9.Receptores de cininas y vías de transducción implicadas en sus efectos fisiológicos [37].

2.6 Angiotensina y el Sistema Calicreína Cinina.

El conocimiento del sistema renina angiotensina y el sistema calicreína cinina es de gran importancia, ya que constituye un avance importante en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, por esta razón se deben estudiar y analizar las interacciones entre ambos sistemas, debido a que los cambios en un sistema se acompañan obligatoriamente por cambios en el otro sistema. Tomando estas interacciones en cuenta se pueden comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades cardiovasculares permitiéndonos desarrollar nuevos fármacos que actúen en ambas vías.

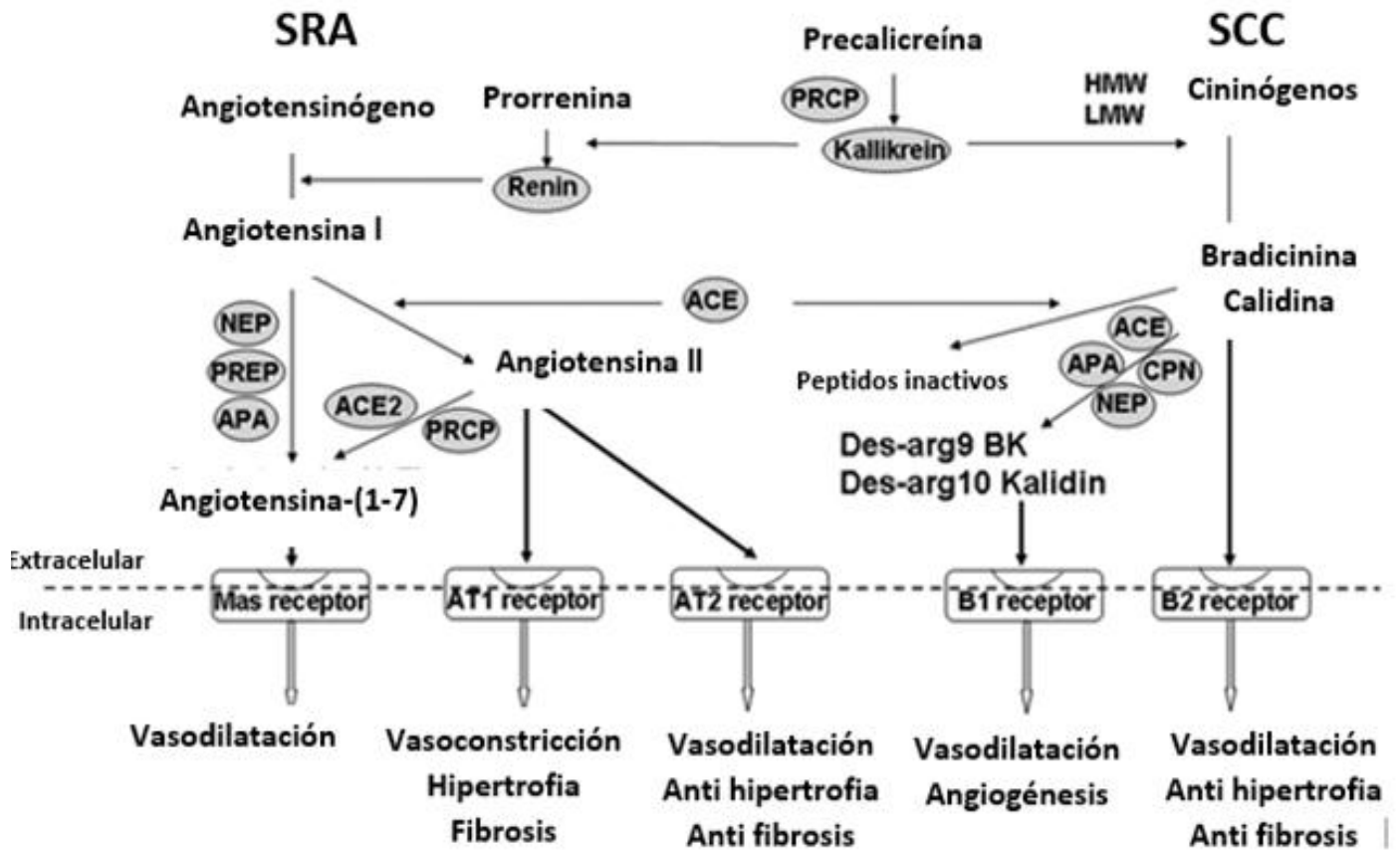


Figura 10. Interacciones entre el sistema renina-angiotensina y el sistema calicreína-cinina [4].

2.6.1 Prolilcarboxipeptidasa

La enzima prolilcarboxipeptidasa (PRCP) ha demostrado ser una enzima degradadora de Ang II, pero también es un activador de precalicerina, la concentración de PRCP puede aumentar en respuesta a la estimulación de los receptores AT₂ o sobreexpresión de receptores AT₂ y contribuye a la liberación de bradicinina en las células endoteliales de arteria coronaria de ratón [4].

2.6.2 Calicreína

La renina es una enzima clave para la formación de Ang II se produce a partir de su forma inactiva la prorenina, que circula en el plasma. La acidificación del plasma humano a 4°C inicia un proceso por el cual prorenina se convierte en renina activa. Este proceso implica la activación de precalicerina por el Factor XII y la conversión

de prorenina en renina por la acción de la calicreína. Así la calicreína está involucrada en la generación de una sustancia tanto presora y depresora, lo cual podría explicar por qué ambos sistemas son activados después de la lesión tisular [4].

2.6.3 ECA

Está bien establecido que la ECA no solo convierte la Ang I a Ang II, sino que también degrada la bradicinina por la eliminación de dos aminoácidos carboxilo-terminal. Esto ha sido apoyado por estudios experimentales in vivo que demuestran que los inhibidores de la ECA no solo disminuyen la concentración de Ang II en la sangre, sino que también aumenta la concentración de bradicinina, además los estudios celulares demostraron que la ECA tiene una afinidad más fuerte hacia bradicinina que hacia Ang I [4].

2.6.4 Angiotensina (1-7)

La angiotensina (1-7) es un miembro de la familia de la angiotensina que puede ser generado a partir de la Ang I bajo la acción de la EPN, la proilendopeptidasa, aminopeptidasa A y neprilisa. También puede ser producida a partir de Ang II bajo la acción de PRCP y ECA2.

Este péptido ejerce un efecto vasodilatador a través de receptores MAS y a través de la potenciación de bradicinina, en este sentido Ang (1-7) actúa como un inhibidor de la ECA. El efecto de la Ang (1-7) en la bradicinina parece también implicar a los receptores AT₂, por lo tanto la interacción entre Ang (1-7) y ECA afecta tanto al sistema renina angiotensina como al sistema calicreína cinina [4].

2.6.5 Receptores de angiotensina AT₁/AT₂ y receptores de bradicinina B₂

Se ha reportado que los receptores AT₁ y los receptores B₂ forman heterodímeros constitutivos, lo que sugiere que ambos receptores también se comunican directamente entre sí, estos heterodímeros muestran aumento de la sensibilidad hacia la Ang II y se encuentran en las plaquetas y los vasos de mujeres preeclámicas y son más abundantes en las células mesangiales renales aisladas

de ratas espontáneamente hipertensas en comparación con los controles normotensos, por lo tanto los heterodímeros AT₁/B₂ pueden ser una diana farmacológica para tratar la hipertensión

La interacción entre ambos sistemas también implica a los receptores AT₂ y B₂, la activación del receptor B₂ participa en los efectos del receptor AT₂, efectos observados después del bloqueo del receptor AT₁, donde la densidad de los receptores AT₂ y la expresión génica de ECA2 se incrementó, sin embargo la interacción entre ambos receptores no se entiende completamente [4].

2.6.6 Interacciones a nivel transcripcional

La Ang II estimula la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y el conjunto de p-CREB en el promotor de B₂ e induce la hiperacetilación del promotor B₂ asociado a histonas H4. La Ang (1-7) en dosis medias y altas aumenta el mRNA del receptor B₂ y la expresión de su proteína, mientras que solo a altas dosis de Ang (1-7) aumenta la expresión del receptor B₁ en el cerebro. Además ECA exógena añadida a cultivo de células de músculo liso vascular regula altamente la expresión génica de receptores B₁ y B₂.

Una intercomunicación entre AT₁ y B₁ también puede ocurrir, ya que al bloquear los receptores AT₁ aumenta el nivel de mRNA y proteína de B₁, mientras que la sobreexpresión de AT₁ reduce la expresión del receptor B₁ en ratas con infarto de miocardio [4].

3.0 Justificación

En el amplio espectro de severidad de la presentación de la enfermedad coronaria, el infarto agudo de miocardio representa la forma más extrema asociándose a un elevado riesgo de muerte. Sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos no existen estudios publicados sobre el seguimiento temporal de los genes del SRA y el SCC en el infarto de miocardio, siendo así que, este trabajo constituye el primer reporte de la expresión temporal del mRNA de dichos genes in vivo.

El análisis de la expresión génica permitirá entender los mecanismos de remodelación cardíaca, así como, ampliar el panorama sobre los posibles biomarcadores de la insuficiencia cardíaca.

4.0 Hipótesis

Al inducir un infarto al miocardio en ratas Wistar macho se espera aumente la expresión del mRNA de los receptores AT₁, AT₂, B₁, B₂ y de ECA, ECA₂.

5.0 Objetivos

5.1 Objetivo general:

Determinar la expresión del mRNA del receptor AT₁ y AT₂ de angiotensina y receptores B₁ y B₂ de bradicinina y enzimas ECA y ECA₂, en un curso temporal de infarto al miocardio en ratas Wistar macho, mediante PCR tiempo real, para conocer si existe modificación en su expresión.

5.2 Objetivos específicos:

- Extraer por el método en columna mRNA de muestras de miocardio infartado de rata Wistar macho
- Realizar la técnica de RT-PCR para la obtención de cDNA.
- Evaluar los cambios temporales de la expresión del mRNA de los receptores de Angiotensina II y bradicinina, así como las enzimas ECA y ECA₂ en el infarto al miocardio

6.0 Material y métodos

6.1 Material

6.1.1 Reactivos biológicos

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 a 10 semanas de edad y un peso de 250 g a 400 g, aleatorizadas en 6 grupos con n= 3, las cuales se dividieron en los siguientes lotes: a) control, sin oclusión coronaria; b) con oclusión coronaria de 48 horas; c) con oclusión coronarias de una semana; d) con oclusión coronaria de dos semanas; e) con oclusión coronaria de tres semanas y f) con oclusión coronaria de cuatro semanas.

6.1.2 Material de laboratorio y consumibles

Micropipetas Eppendorf de 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L

Puntas de 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L

Tubos Eppendorf de 1.5mL con tapa adherida y de rosca

Hielo seco y húmedo

Servitoallas

PureLink RNA Mini Kit

Buffer de lisis

Etanol al 70%

Wash buffer 1

Buffer II

Agua libre de RNA

Kit RT- PCR System de Promega

Tr 10x

MgCl₂

dNTP's Mix

AMV RT

Oligo dT

Kit Roche Master SYBR Green 10x

SYBR Green I

Equipos

Centrífuga

Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient

Espectrofotómetro para Microplacas Epoch

Campana de PCR

7.0 Metodología

7.1 Selección de primers

1. Los oligonucleótidos seleccionados para este protocolo se obtuvieron del artículo: Li, N., y colaboradores. (2004). The Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 in the generation of Angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. American Journal of Physiology, Renal Physiology, 288, 352-362.

Tabla 2. Secuencia y tamaño de producto de los primers de GAPDH, ECA, ECA2, AT₁, AT₂, B₁ y B₂.

Oligo	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Producto
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	207 bp
ECA	GCCACATCCAGTATTCATGCAGT	AACTGGAAGTGGATGATGAAGCTGA	442 bp
ECA2	GGAGAATGCCCAAAGATGA	CGTCCAATCCTGGTTCAAGT	281 bp
AT ₁	GGAAACAGCTTGGTGGTG	TTGAATTCATAAGCCTTCTT	445 bp
AT ₂	CTGACCCTGAACATGTTTGCA	GGTGTCCATTTCTCTAAGAGA	711 bp
B ₁	AAGACAGCAGTCACCATC	GACAAACACCAGATCGGA	391 bp
B ₂	GAACATCTTTGTCCTCAGC	CCGTCTGGACCTCCTTGAAC	572

2. Se realizó el análisis *in silico* de los oligonucleótidos mediante el software Primer BLAST® para corroborar su afinidad.

GAPDH:

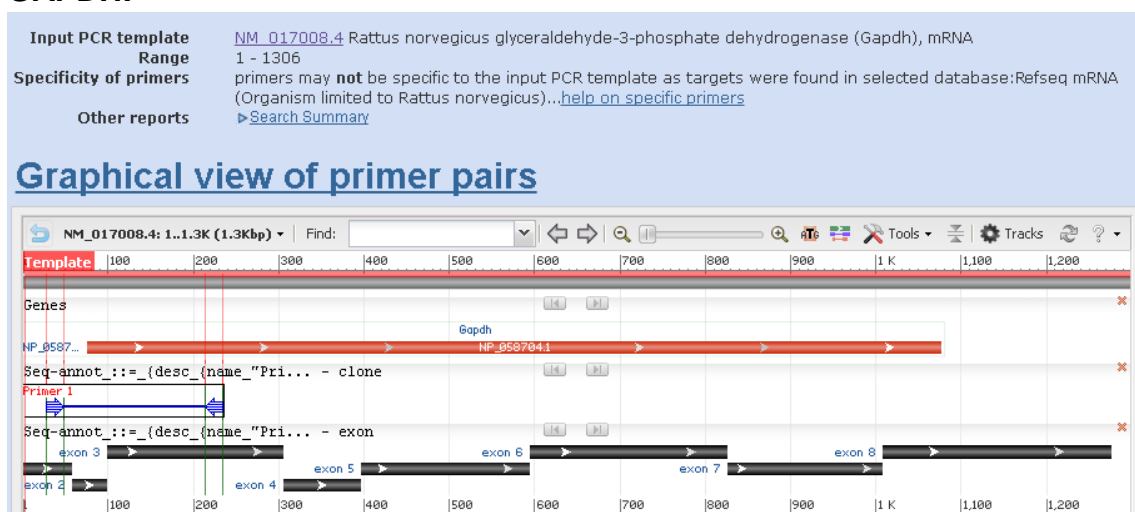


Figura 11. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de GAPDH

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	Plus	20	28	47	59.68	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	Minus	20	234	215	59.46	55.00	3.00	2.00

Product length 207

Products on intended target

>[NM_017008.4](#) Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA

product length = 207

```

Forward primer 1 AGACAGCCGCATCTTCTTGT 20
Template      28 ..... 47

Reverse primer 1 CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT 20
Template      234 ..... 215
    
```

Figura 12. Especificaciones de primers para GAPDH

ECA:

Input PCR template [NM_012544.1](#) Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme (Ace), mRNA
Range 1 - 4142
Specificity of primers Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
Other reports [Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Figura 13. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCACATCCAGTATTTTCATGCAGT	Plus	24	3013	3036	61.70	45.83	4.00	4.00
Reverse primer	AACTGGAAGCTGGATGATGAAGCTGA	Minus	25	3454	3430	62.27	44.00	4.00	1.00

Product length 442

Products on intended target

>[NM_012544.1](#) Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme (Ace), mRNA

product length = 442

```

Forward primer 1 GCCACATCCAGTATTTTCATGCAGT 24
Template      3013 ..... 3036

Reverse primer 1 AACTGGAAGCTGGATGATGAAGCTGA 25
Template      3454 ..... 3430
    
```

Figura 14. Especificaciones de primers para ECA

ECA2:

Input PCR template [NM_001012006.1](#) Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme 2 (Ace2), mRNA
Range 1 - 2418
Specificity of primers primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database:Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)...[help on specific primers](#)
Other reports [Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Figura 15. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de ECA2

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAGAATGCCCAAAAGATGA	Plus	20	168	187	55.69	45.00	2.00	1.00
Reverse primer	CGTCCAATCCTGGTTCAAGT	Minus	20	448	429	57.81	50.00	3.00	1.00
Product length	281								

Products on intended target

>[NM_001012006.1](#) Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme 2 (Ace2), mRNA

```
product length = 281
Forward primer 1 GGAGAATGCCCAAAAGATGA 20
Template       168 ..... 187

Reverse primer 1 CGTCCAATCCTGGTTCAAGT 20
Template       448 ..... 429
```

Figura 16. Especificaciones de primers para ECA2

AT₁:

Input PCR template [NM_030985.4](#) Rattus norvegicus angiotensin II receptor, type 1a (Agr1a), mRNA
Range 1 - 2208
Specificity of primers primers may **not** be specific to the input PCR template as targets were found in selected database:Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)...[help on specific primers](#)
Other reports [Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Figura 17. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de AT₁

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAAACAGCTTGGTGGTG	Plus	18	397	414	56.21	55.56	4.00	0.00
Reverse primer	TTGAATTCATAAGCCTTCTT	Minus	21	951	931	51.28	28.57	7.00	3.00
Product length	555								

Products on intended target

>[NM_030985.4](#) Rattus norvegicus angiotensin II receptor, type 1a (Agtr1a), mRNA

```

product length = 555
Forward primer 1  GGAAACAGCTTGGTGGTG  18
Template        397  ..... 414
Reverse primer 1  TTGAATTCATAAGCCTTCTT  21
Template        951  ..... 931
    
```

Figura 18. Especificaciones de primers para AT₁

AT₂:

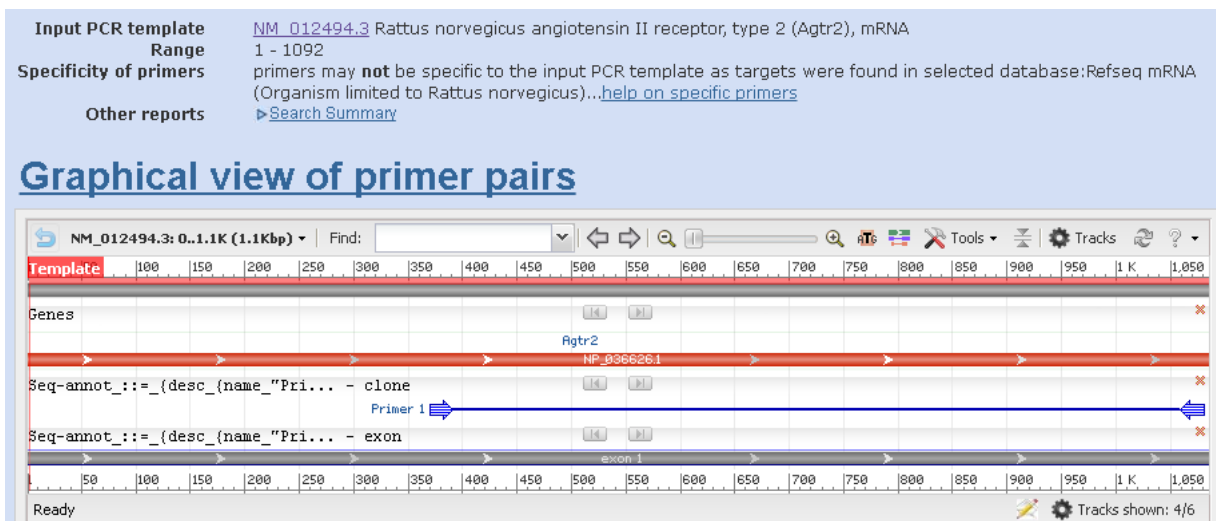


Figura 19. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de AT₂

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGACCCTGAACATGTTTGCA	Plus	21	370	390	59.04	47.62	8.00	4.00
Reverse primer	GGTGTCCATTTCTCTAAGAGA	Minus	21	1080	1060	54.39	42.86	9.00	9.00
Product length	711								

Products on intended target

>[NM_012494.3](#) Rattus norvegicus angiotensin II receptor, type 2 (Agtr2), mRNA

```

product length = 711
Forward primer 1  CTGACCCTGAACATGTTTGCA  21
Template        370  ..... 390
Reverse primer 1  GGTGTCCATTTCTCTAAGAGA  21
Template        1080 ..... 1060
    
```

Figura 20. Especificaciones de primers para AT₂

B1:

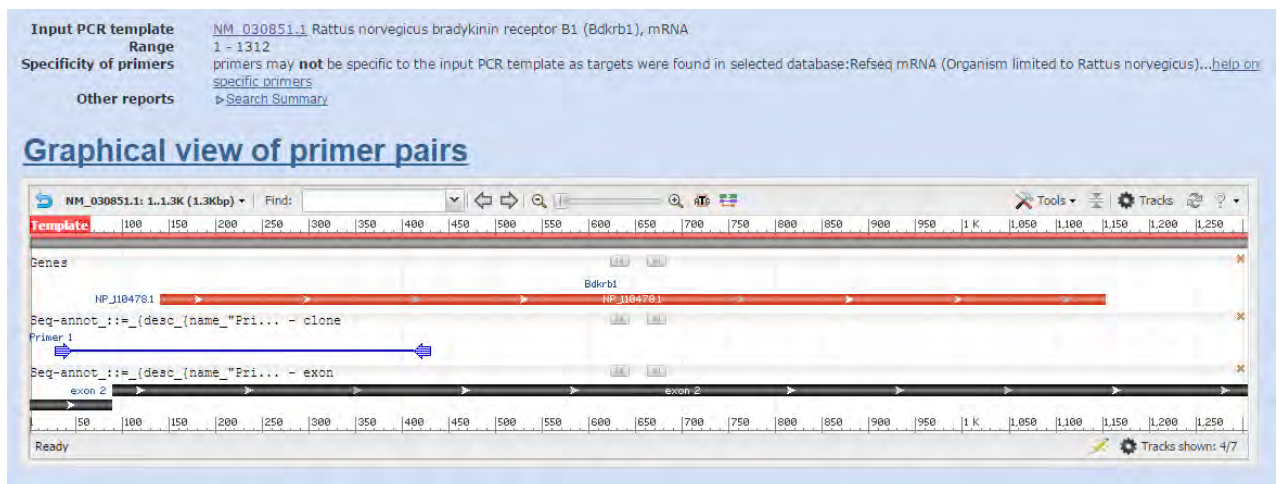


Figura 21. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de B₁

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGACAGCAGTCACCATC	Plus	18	28	45	54.18	50.00	6.00	0.00
Reverse primer	GACAAACACCAGATCGGA	Minus	18	430	413	54.22	50.00	4.00	3.00
Product length	403								

Products on intended target

>[NM_030851.1](#) Rattus norvegicus bradykinin receptor B1 (Bdkrb1), mRNA

```
product length = 403
Forward primer 1 AAGACAGCAGTCACCATC 18
Template       28 ..... 45

Reverse primer 1 GACAAACACCAGATCGGA 18
Template       430 ..... 413
```

Figura 22. Especificaciones de primers para B₁

B2:

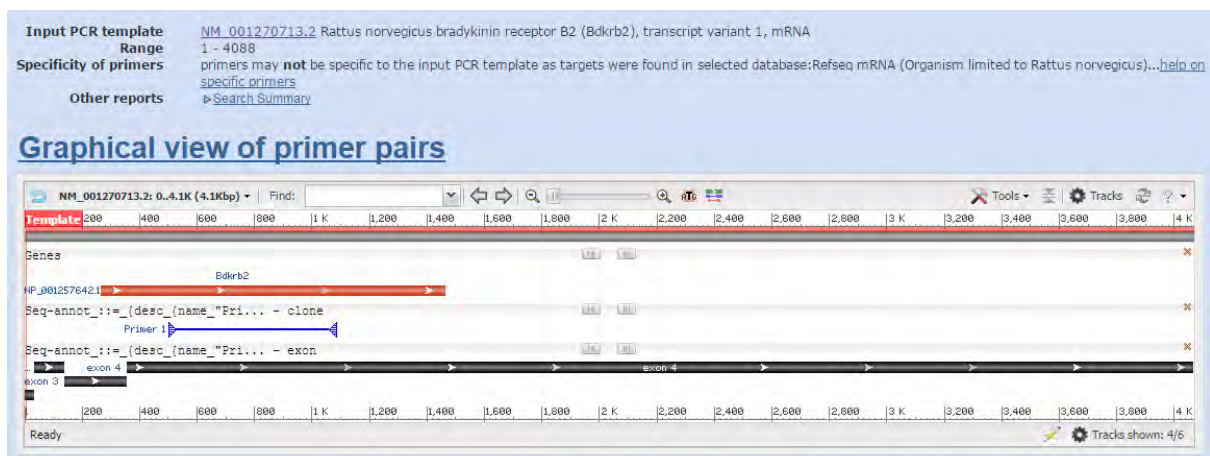


Figura 23. Sitio de alineamiento dentro del gen para los primers de B₂

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAACATCTTTGTCCTCAGC	Plus	19	509	527	53.71	47.37	4.00	2.00
Reverse primer	CCGTCTGGACCTCCTTGAAC	Minus	20	1080	1061	60.04	60.00	4.00	1.00
Product length	572								

Products on intended target

>[NM_001270713.2](#) Rattus norvegicus bradykinin receptor B2 (Bdkrb2), transcript variant 1, mRNA

```
product length = 572
Forward primer 1 GAACATCTTTGTCCTCAGC 19
Template       509 ..... 527

Reverse primer 1 CCGTCTGGACCTCCTTGAAC 20
Template       1080 ..... 1061
```

Figura 24. Especificaciones de primers para B₂

7.2 Inducción del Infarto Miocárdico.

1. Realizar una toracotomía entre el 4^o y el 5^o espacio intercostal.
2. Exteriorizar el corazón y localizar la arteria coronaria anterior izquierda.
3. Realizar una ligadura en la misma mediante el uso de una aguja atraumática e hilo seda 5/0 (*Atramat*).
4. Regresar el corazón a la cavidad torácica.
5. Suturar las capas de músculo y piel
6. Simultáneamente administrar a la rata respiración mediante una bombilla de hule.
7. Permitir la recuperación del animal.

7.3 Extracción de mRNA

La extracción del mRNA de los genes de interés y el control endógeno GAPDH se realiza con base al PureLink RNA Mini Kit [30].

1. Se homogeniza el tejido en 400 µL de buffer de lisis en un tubo Eppendorf
2. Centrifugar a 12000 g por 2 min
3. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo
4. Se añaden 400 µL de etanol al 70% del homogenado y se mezclan en vortex.
5. Se transfieren 500µL de la muestra a un cartucho nuevo

6. Se centrifuga a 1200 g por 15 segundos y se descarta el líquido sobrante, reinsertar otro cartucho y repetir hasta que pase toda la muestra.
7. Se añaden 600 μL de buffer de lavado 1 y se centrifugan a 12000 g por 15 segundos y se descarta el sobrante.
8. Se coloca el cartucho colector y se añaden 500 μL de buffer II
9. Se centrifuga a 12000 g por 1 min
10. El cartucho se coloca en el mismo tubo colector y se repite solo una vez.
11. Se centrifuga a 12000 g por 1min y se coloca el cartucho en un tubo colector
12. Se añaden 60 μL de agua libre de RNA al centro del cartucho y se incuba por 1 min
13. Por último se centrifuga a 12000 g por 2 min a temperatura ambiente.
14. El RNA se mantiene a -80°C hasta su cuantificación

7.4 Cuantificación de las muestras

Se realizó la cuantificación de RNAm de cada muestra en el equipo EPOCH, con el fin de conocer su pureza con base a la relación 260/280, lo que permite descartar aquellas muestras con un índice alto de contaminación.

Posteriormente se realizar los cálculos para obtener diluciones de cada muestra con una concentración de 50 ng/ μL .

7.5 RT-PCR

La obtención de cDNA de los genes de interés y el control endógeno GAPDH se realizó con base al Kit RT-PCR System de (Promega) [1].

1. En un tubo Eppendorff de 200 μL se colocaron los siguientes reactivos:

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
Tr 10 x	2
MgCl ₂	4
dNTP's	2
AMV RT	1
Oligo dT	1
RNAm	0.5
Total	10.5

Tabla 3. Reactivos y volumen utilizados en RT-PCR

2. Se homogeniza la muestra y se centrifuga durante unos segundos.
3. Incubar a 70°C durante 10 min.
4. Reposar a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Colocar en el termociclador con el programa siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
4.2	15
95	5
4	5

Tabla 4. Condiciones a utilizar en el termociclador para RT-PCR

6. Se cuantifica el cDNA y se conserva en refrigeración hasta la realización de la PCR tiempo real

7.6 Amplificación

Se utilizó el Kit Roche Master SYBR Green 10x [12]. La metodología es la misma para cada gen de interés, a excepción de los primers y las temperaturas de alineamiento que son específicos para cada proteína evaluada.

Preparación de Master Mix

1. Descongelar las soluciones a temperatura ambiente.
2. Mezclar cuidadosamente cada solución con la pipeta antes de tomar el volumen final.
3. Se preparan soluciones de los primers forward y reverse.
4. Dependiendo del número de reacciones, se realizaron los cálculos necesarios de cada reactivo, considerando que cada reacción debe contener lo siguiente:

Reactivos	Volumen	Concentración Final
SYBR Green I	2	1 x
Forward Primer	2	10 pM
Reverse Primer	2	10 pM

Tabla 5. Reactivos a utilizar y cantidades en la amplificación. *Dependiendo del gen a evaluar en cada amplificación se utilizaron los primers para AT₁, AT₂, B₁, B₂ y de ECA, ECA2

5. En un tubo de microcentrífuga se prepara el master mix, mediante la adición de los componentes anteriores en el orden indicado.
6. Se colocan 6 µL de master mix y 2 µL de cDNA en cada pozo de la microplaca de acuerdo al número de muestras.
7. La microplaca se sella perfectamente para evitar burbujas de aire. Se centrifuga para homogenizar la mezcla
8. Por último se coloca la microplaca en el termociclador y se programa la PCR con los siguientes parámetros:

Temperatura (°C)	Tiempo
95	5 min
95	10 s
Tm de cada proteína	10 s
72	10 s
95	5 s
65	1 min
98	10 s
44 Ciclos	

Tabla 6. Condiciones utilizadas en el termociclador para la amplificación

Nota. Las condiciones y los parámetros del programa de RT-PCR fueron iguales con excepción de la temperatura de alineamiento, para cada gen de interés fueron las siguientes:

Proteína	Temperatura de alineamiento (°C)
AT ₁	57
AT ₂	57
B ₁	56
B ₂	56
ECA	56
ECA2	56

Tabla 7. Temperaturas de alineamiento para cada proteína

9. La microplaca se desecha en el contenedor de residuos biológicos

7.7 Análisis estadístico

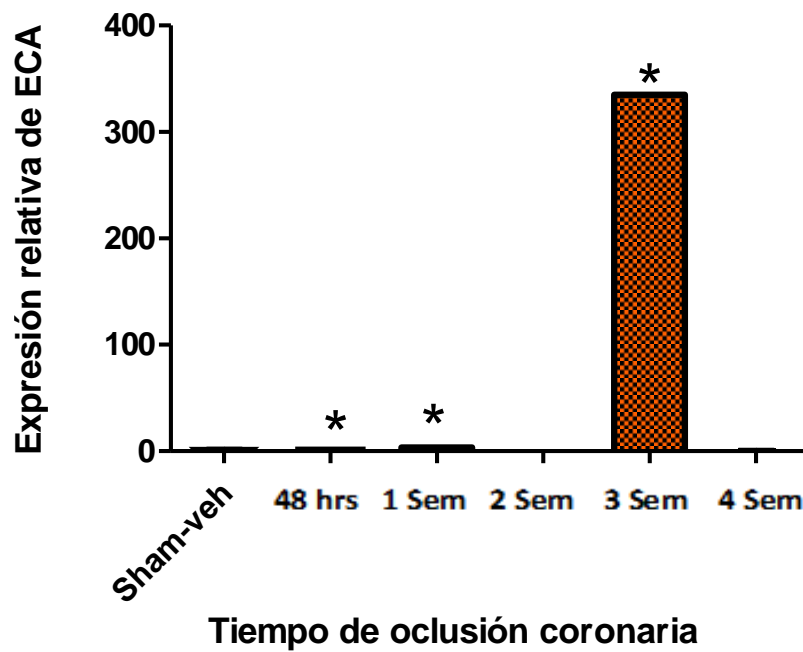
Mediante la prueba de Student-Newman-Keuls se tomaron diferencias estadísticamente significativas con una $*P < 0.05$. Los softwares utilizados para la elaboración de gráficas y estadística fueron Graph Pad Prism 5 y Excel 2010, respectivamente.

8.0 Resultados

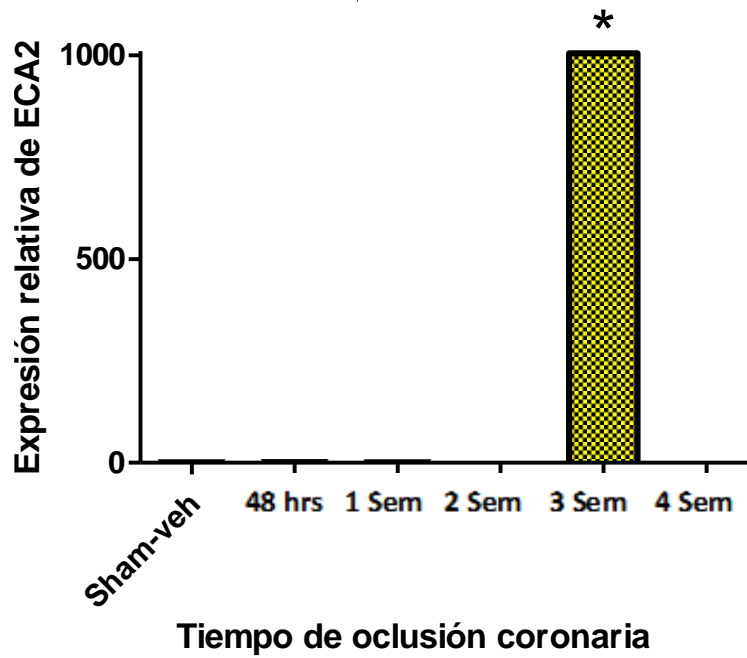
En las siguientes tablas se muestra la expresión relativa del mRNA de interés en los diferentes lotes comparado con el gen constitutivo (GAPDH).

Grupo	ECA	ECA2
Sham-Veh	1	1
48 h	1.37	2.02
1 semana	3.387	0.9873
2 semanas	0.2517	0.7535
3 semanas	335.0657	1005.223
4 semanas	0.73	0.0163

Tabla 8. Expresión relativa del mRNA de ECA y ECA2



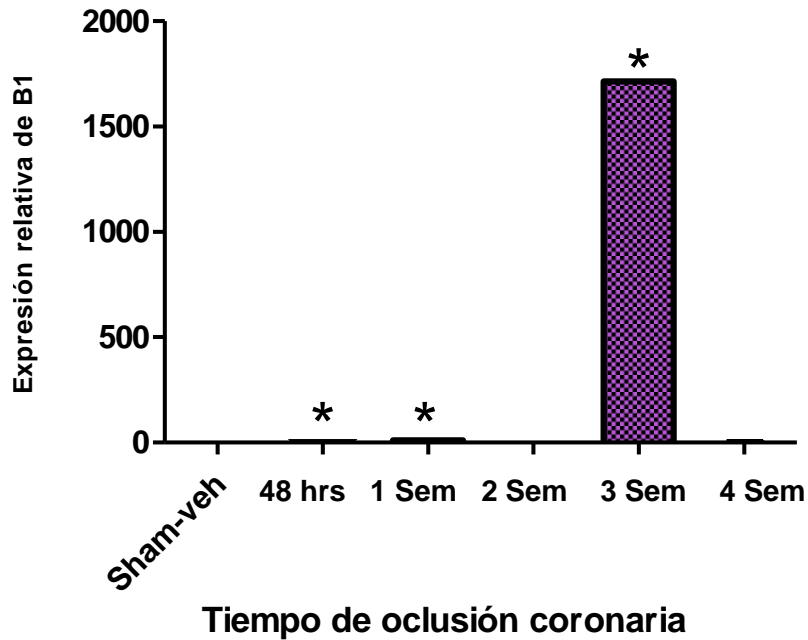
Gráfica 1. Expresión del mRNA de ECA en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. Prueba de Turkey. * P < 0.05 vs Sham-Veh.



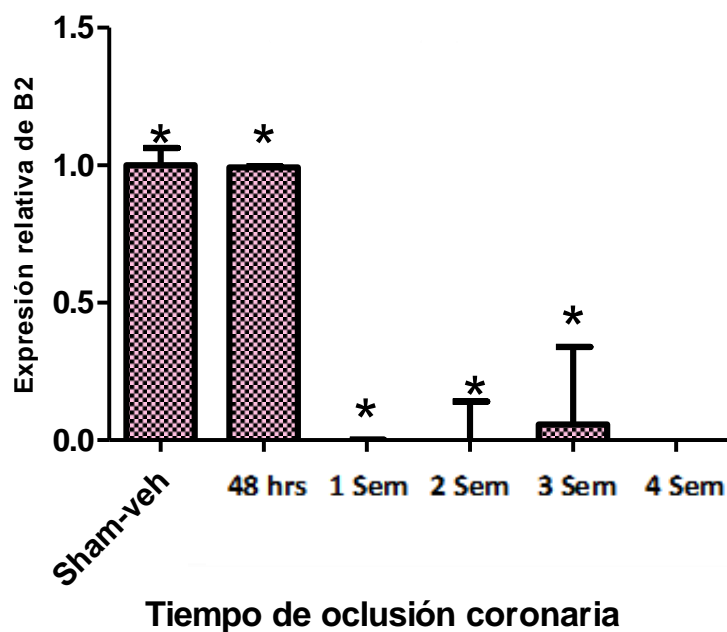
Gráfica 2. Expresión relativa del mRNA de ECA2 en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. Prueba de Tukey. * P < 0.05 vs Sham-Veh.

Grupo	B ₁	B ₂
Sham-Veh	1	1
48 h	2.3822	0.9916
1 semana	10.9275	0.00002
2 semanas	1.2923	0.00003
3 semanas	1714.177	0.0565
4 semanas	0.0017	0.00001

Tabla 9. Expresión relativa del mRNA de B₁ y B₂



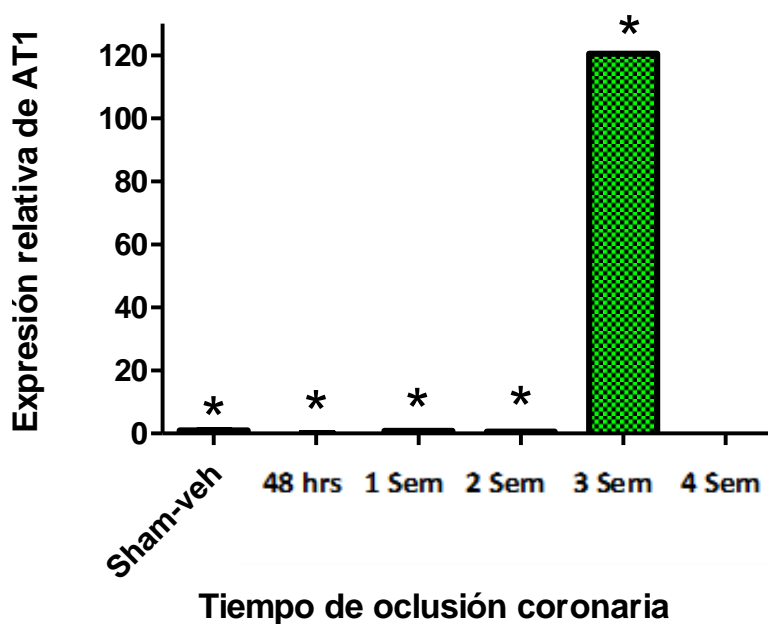
Gráfica 3. Expresión relativa del mRNA de B1 en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. Prueba de Tukey. * P < 0.05 vs Sham-Veh.



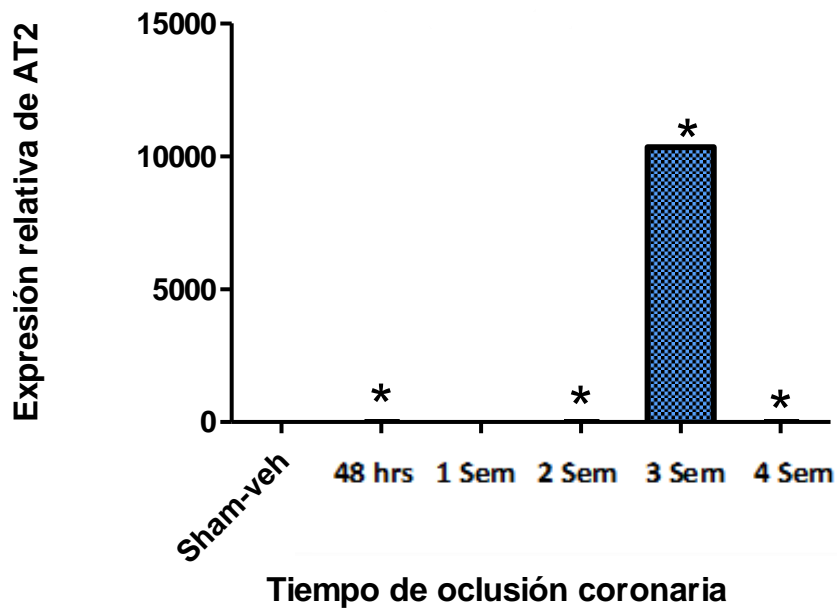
Gráfica 4. Expresión relativa del mRNA de B2 en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. Prueba de Tukey. * P < 0.05 VS Sham-VeValores del promedio < 0.05 vs Sham-Veh.

Grupo	AT ₁	AT ₂
Sham-Veh	1	1
48 h	0.095	0.0035
1 semana	0.8418	0.0263
2 semanas	0.5844	0.0001
3 semanas	120.5343	10338.94
4 semanas	0.0131	0.00001

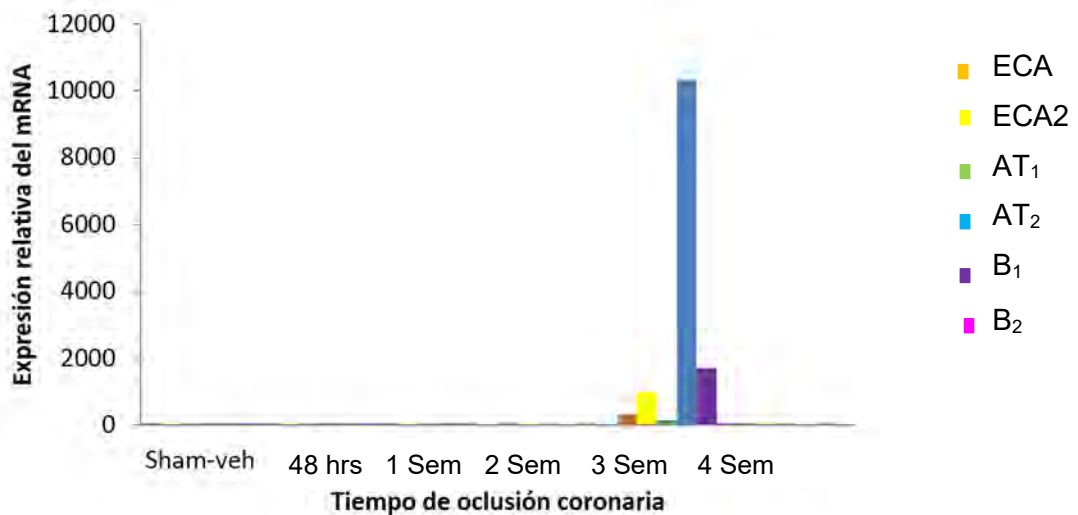
Tabla 10. Expresión relativa del mRNA AT₁ y AT₂



Gráfica 5. Expresión relativa del mRNA de AT₁ en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. * P < 0.05 vs Sham-Veh.



Gráfica 6. Expresión relativa del mRNA de AT₂ en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. * P < 0.05 vs Sham-Veh.



Gráfica 7. Comparación de la expresión relativa del mRNA de las proteínas del SRA y SCC en ventrículo izquierdo infartado. Estos valores son la media \pm el error estándar con una n=3 por duplicado. Prueba de Tukey. * P < 0.05 vs Sham-Veh.

9.0 Análisis de resultados

El SRA es un sistema hormonal en el cual Ang II representa el metabolito final y sus efectos biológicos son mediados a través de la activación de diferentes receptores, entre ellos AT₁ y el AT₂, de tal manera que su estudio constituye un mayor avance en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, no es el único sistema que participa en el desarrollo del infarto al miocardio, ya que evidencia indica que existen múltiples vías de señalización entre el SRA y el SCC [4].

De esta manera, el vínculo más estudiado entre ambos sistemas es la ECA, porque no sólo remueve el dipéptido carboxílico terminal de la Ang I para generar la Ang II sino que también degrada la bradisinina que es un vasodilatador, todo lo que produce aumento de la presión arterial, mientras que la ECA2 se identificó como homólogo de ECA, catalizando la conversión de Ang II a Ang (1-7), con lo que se contrarresta la actividad de ECA [35]. De aquí la importancia de conocer su expresión durante el infarto de miocardio.

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron ratas Wistar macho debido a las siguientes razones: 1) el IM inducido por la oclusión de una arteria coronaria reproduce de forma fiel las características estructurales y funcionales de la patología humana 2) permite el estudio del IM sin interferencias asociadas a la presencia de otras enfermedades o estados fisiológicos 3) son baratos, homogéneos y fáciles de criar [46].

El estudio del seguimiento temporal del mRNA comenzó a las 48 horas posteriores a la oclusión coronaria, donde se observó que la expresión de ECA2 es mayor que ECA, esto podría indicar que ECA2 favorece la producción de Ang (1-7) y con ello la disminución de la presión arterial, un mecanismo característico en la muerte del miocito que posteriormente desencadenan mecanismos compensatorios que tienden a disminuir la poscarga y aumentar la precarga, la contractilidad y la frecuencia cardíaca [2]. Como se observa en la gráfica 2 la expresión de ECA2 tiende a disminuir en la primera y segunda semana posterior al infarto, lo cual ya ha sido reportado y se relaciona con dicho mecanismo compensador, esto debido a

que menores niveles de ECA2 propician mayor cantidad de Ang II con ello se desencadena el aumento de presión arterial. Sin embargo, en la tercer semana posterior al infarto se observa un aumento abrupto en la expresión relativa del mRNA de ECA2, esto podría estar relacionado con estudios recientes, los cuales han mostrado que la sobreexpresión de ECA2 a nivel del miocardio se asocia a la prevención de la hipertrofia y fibrosis hipertensiva inducida por Ang II [32], debido a un aumento en la concentración de Ang (1-7), la cual se une a su receptor MAS ejerciendo su efecto antihipertrófico por la producción de NO y la activación de eNOS [44], así como una disminución en la producción de colágeno II y III inducido por hipoxia y protección de la función cardíaca y endotelial en isquemia coronaria permanente [32].

Por otro lado la expresión de ECA es variable durante las cuatro semanas posteriores al infarto. Durante la semana tres se observa un aumento importante en la expresión del mRNA de ECA (menor que la expresión de ECA2) de tal manera que favorece la producción de Ang II. Esto es apoyado por estudios, los cuales indican que en presencia de Ang II la acción vasodilatadora de la Ang (1-7) sólo puede comprobarse cuando se bloquea el receptor AT₁, lo que implica que el efecto de la Ang (1-7) es de menor potencia que el vasoconstrictor de la angiotensina II [3].

Los efectos de Ang II son mediados principalmente por dos receptores AT₁ y AT₂, los cuales comparten el 34% de su secuencia de aminoácidos, de tal manera que la Ang II se une a ambos receptores con similar afinidad [18]. Sin embargo, la acción funcional depende de qué receptor se encuentre con más expresión en el organismo. Considerando lo anterior, se infiere que la Ang II generada por ECA en la primera y segunda semana se une al receptor AT₁ cuyos niveles de expresión tienden a aumentar desde las 48 horas (tabla 10), aunado a los resultados obtenidos por Ramírez donde se observa un incremento en la PS y PD a las 48 horas posteriores al infarto [45]. La formación de este complejo Ang II-AT₁ activa varias vías de señalización que conllevan a una serie de efectos sistémicos que se relacionan con necrosis miocárdica y remodelación ventricular la cual podría estar potenciada por el nivel de expresión de AT₁ que se encuentran por encima de los niveles de AT₂ hasta la semana tres (gráfica 5).

La necrosis aguda miocárdica después del infarto conlleva a una pérdida abrupta de tejido, lo que produce un incremento en la sobrecarga ventricular, con lo cual comienza el proceso de remodelación temprana. La expansión del infarto produce adelgazamiento y dilatación ventricular, el estímulo más importante de la hipertrofia mediado por Ang II.

La estimulación del receptor AT_1 activa la fosfolipasa C y moviliza el calcio, produciendo su principal efecto, vasoconstricción. También estimula la proliferación celular de miocitos y formación de colágeno. Es así como la remodelación tardía comprende la hipertrofia ventricular y las alteraciones en la arquitectura ventricular para distribuir el incremento del estrés parietal, hasta que la matriz extracelular forme la cicatriz de colágena, con el objeto de estabilizar la fuerza de contracción y prevenir deformaciones futuras [2].

Por otro lado, como se observa en la tabla 10, la expresión de AT_2 aumenta considerablemente en la semana tres, encontrándose por encima de la expresión de AT_1 , de tal manera que en esta semana Ang II puede unirse al receptor AT_2 que se encuentra expresado primordialmente en tejidos fetales, pero se expresa o aumenta su regulación después de una lesión vascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, cardiomiopatía dilatada [34].

Los efectos más visibles de la estimulación del receptor AT_2 son vasodilatación a través del GMPc y óxido nítrico, disminuye la apoptosis de miocitos ya que provoca activación PLA2, SHP-1, MKP-1 y defosforilación de la Bcl-2. De tal manera que el nivel de sobreexpresión del mRNA de AT_2 en la tercera semana potencializa dichos efectos, lo cual nos permite postular que este gen podría estar involucrado en la prevención de la hipertrofia.

Está demostrado que durante el infarto al miocardio ocurre también la activación del SCC, esto ha encontrado dos aplicaciones generales; el papel generalmente protector de las cininas contra el daño tisular que sigue a la isquemia y la reperfusión y la angiogénesis impulsada por isquemia [19].

Durante las primeras 48 horas postinfarto los niveles de expresión de B₁ son mayores que los de B₂, sin embargo en las semanas posteriores la expresión de B₂ comienza a disminuir hasta casi desaparecer, mientras que B₁ tiene un aumento drástico en la semana tres. La isquemia induce la expresión del receptor B₁ en células endoteliales, esto se debe a que la respuesta del organismo ante la isquemia sostenida es la angiogénesis y las cininas son importantes en este proceso. Esto se demuestra ya que la expresión del mRNA del receptor B₁ aumenta de acuerdo al tiempo de oclusión coronaria, llegando a su pico máximo a la tercera semana después del infarto y posteriormente comienza a disminuir (gráfica 3).

El receptor B₁ no suele expresarse de manera significativa en los tejidos normales, si no que su expresión es inducida por una lesión tisular o isquemia, esta sobreexpresión está regulada por citocinas como IL-1 β e IL-2 y TNF- α que activan al factor nuclear NF-KB que es un factor de transcripción que inicia la síntesis de mRNA [19].

El proceso de angiogénesis puede explicarse ya que los receptores B₁ activan a la PLC que genera la hidrólisis de fosfoinosítidos produciendo IP3 y DAG como segundos mensajeros, el DAG activa la PKC, esto activa la vía de MAPK. Las MAPK fosforiladas migran al núcleo donde regulan la actividad de una variedad de factores nucleares, los cuales finalmente controlan la expresión de genes esenciales para la proliferación y la diferenciación [23]

Los receptores B₂ se expresan constitutivamente en muchos tejidos, este receptor participa en la mayoría de los efectos de las cininas por las que presenta una gran afinidad, su principal función es generar vasodilatación, además media efectos proinflamatorios tales como edema, dolor y migración de leucocitos y actúa en procesos de antiproliferación y antifibrosis.

Como se observa en la gráfica 4 el mRNA de B₂ se mantiene constante durante la primera semana posterior a la oclusión coronaria, sin embargo hay un drástico descenso a partir de la segunda semana hasta casi desaparecer. Este descenso puede ocurrir para disminuir los efectos antiproliferativos y antifibróticos de B₂,

permitiendo que se lleve a cabo la remodelación cardiaca mediada por la unión de la bradicinina al receptor B₁. El proceso de esta regulación negativa se desconoce pero estudios demuestran que la exposición prolongada a bradicinina disminuye la expresión de estos receptores, también se ha propuesto un mecanismo que implica la represión transcripcional combinada y la degradación acelerada del receptor y se ha demostrado que varias proteasas extracelulares, incluyendo la calicreína tisular y las proteasas secretadas por neutrófilos activados escinden el receptor B₂ [19].

En la semana cuatro se observa un descenso abrupto en la expresión de los receptores de Ang II, bradicinina y las enzimas ECA, ECA2, esto puede sugerir que el proceso de remodelación iniciado como una respuesta compensatoria al daño y al estrés mecánico, se convierte lentamente en un proceso que conduce a la hipertrofia ventricular, lo cual corresponde con lo reportado donde se indica que existe un aumento en el índice de hipertrofia a partir de las primeras 48 horas posteriores al infarto miocárdico [45]. Siendo un mecanismo común en el desarrollo de insuficiencia cardiaca.

10.0 Conclusiones

El trabajo llevado a cabo en esta tesis nos permitió concluir lo siguiente:

- Se determinó que la tercera semana postinfarto tiene gran relevancia debido al aumento de expresión del mRNA de los receptores de Ang II, bradicinina y las enzimas ECA y ECA2, los cuales pueden ser biomarcadores de la inducción de insuficiencia cardíaca.
- Se logró identificar que la sobreexpresión del mRNA del receptor AT_2 y ECA2 en la tercera semana podría estar involucrada en la disminución de la hipertrofia cardíaca y fibrosis.
- El seguimiento temporal de genes del SRA y SCC durante un infarto miocárdico permitirá el conocimiento detallado de los mecanismos que determinan la remodelación cardíaca y permitirá el diseño de tratamientos farmacológicos que frenen el proceso o bien lo reviertan.

11.0 Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta investigación, abren un panorama de la expresión de los genes del Sistema Renina Angiotensina y Sistema Calicreína-Cinina en el Infarto Miocárdico. Así mismo, permite examinar la posibilidad de utilizar dichos receptores y enzimas como biomarcadores moleculares en el diagnóstico de muestras de miocardio infartado, se propone la siguiente estrategia:

1. Corroborar la presencia de los receptores de Ang II, bradicinina y las enzimas ECA y ECA2 en el tejido de miocardio infartado mediante Western Blot.
2. Analizar así mismo su presencia topográfica mediante inmunohistoquímica en los tejidos de miocardio infartado y compararlos con muestras de miocardio normal.
3. Analizar la correlación de la expresión de AT₂ y ECA2 con la respuesta a tratamientos farmacológicos y la evolución del mismo mediante un análisis prospectivo.

12.0 Referencias

1. Access RT-PCR System Promega [en línea] Consultada el 20 Agosto de 2016
goo.gl/MgxZvj
2. Altamirano, A., Martínez, C. (2014). Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. *Infarto Agudo de Miocardio. Documento de postura*. México: 9-20.
3. Bazzino, O. (2013). Tercera definición universal de infarto de miocardio. Implicancias en la práctica clínica. *Revista Uruguaya de Cardiología*. 28(3): 403-411
4. Bo, J. (2013) Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 0(0):1-10
5. Brunton, L., Lazo, J. (2007). *Bases farmacológicas de la terapéutica*. Colombia: Mc Graw-Hill.
6. Cabana Jérôme et al., (2015). Identification of Distinct Conformations of the Angiotensin-II Type 1 Receptor Associated with the Gq/11 Protein Pathway and the β -Arrestin Pathway Using Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Biological Chemistry*;290(25)
7. Chávez, R., Ramírez, J., & Casanova, J. (2003). La cardiopatía coronaria en México y su importancia. *Archivos de cardiología de México*. 105-114.
8. Chamsi-Pasha; et al. (2014) Angiotensin-Converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for Heart Failure. *Author manuscript*; 11(1): 58–63.
9. Chuaqui Benedicto. Capítulo 1. Anatomía Patológica del Aparato Cardiovascular. Recuperado de <http://escuela.med.puc.cl>

10. De la Serna Fernando (2010). Insuficiencia Cardíaca Crónica. 3ra.ed. Federación Argentina de Cardiología
11. Dvorkin, M., Cardinali, D., & Iermoli, R. (2010). *Bases fisiológicas de la práctica médica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
12. FastStart Universal SYBR Green Master (Rox). [en línea] goo.gl/s9nJv9
Consultada el 22 de octubre de 2016
13. Feldstein Carlos y Romero Carlos (2007). El sistema renina angiotensina en la hipertensión esencial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 2(2): 49-58
14. Ferreira González Ignacio. (2014). Epidemiología de la enfermedad coronaria. *Revista Española de Cardiología*, 67(02):44 -139
15. García Castillo A; et.al. (2006). Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento. *Archivos de cardiología de México*. 12-120
16. Hernando, L. (2008) *Nefrología clínica*. 3ra ed. Madrid, España. Médica Panamericana.
17. Jerjes, C.; et.al. (2015). Third national registry of acute coronary syndromes (RENASICA III). *Archivos de Cardiología de México*, 207-214
18. Khurajam D. Singh and Sadashiva S Karnik. (2016) Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. *Journal of Cell Signaling*; 1(2): 111.
19. Leeb-Lundberg. (2005). Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacological Reviews*, 57(1): 27-77.

20. Lorenzo, P. y otros (2008). *Farmacología básica y clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
21. Lyle Alicia N. & Griending Kathy K. (2006) Modulation of Vascular Smooth Muscle Signaling by Reactive Oxygen Species *Physiology* ;21(4)
22. Martín, L., Coma, I. G., & López, J. (1988). *Cardiopatía Isquémica. Angina de pecho, infarto de miocardio*. Madrid: EDICIONES NORMA.
23. Matus, C. (2003) *Bradicinina 1-5 activa el receptor B₁ de cininas e induce la fosforilación de MAPK en células epidérmicas humanas en cultivo*. Valdivia, Universidad Austral de Chile.
24. Mendoza, N. (2008). *Farmacología médica*. México: Médica Panamericana.
25. Muñoz Morán Encarnación (2003). Asociación de los polimorfismos genéticos del sistema renina angiotensina y metilentetrahidrofolato reductasa con el infarto de miocardio. Tesis de doctorado. Universidad de Málaga
26. Namsolleck; et al. (2014) AT₂ Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications, *Current Hypertension Reports*; 16(2): 416.
27. Nolly Mariela B. (2012) Hipertrofia cardiaca patológica: estudios experimentales de su modificación con el ejercicio-vías de señalización intracelular involucrados. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de La Plata.
28. Olivares y otros (2012) Ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas. Técnica quirúrgica. *Revista chilena de cirugía* 64(1): 15-18
29. Pérez Díaz I.;et.al. (2006) Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT₁, AT₂: características y su papel en el funcionamiento celular. *Revista de educación bioquímica*. 25(2): 55-60.

30. PureLink RNA Mini Kit [en línea] goo.gl/iHMmsv. Consultada el 20 octubre de 2016
31. Prokop JW, Santos RA, Milsted A (2013). Differential mechanisms of activation of the Ang peptide receptors AT1, AT2, and MAS: using in silico techniques to differentiate the three receptors. *PLOS one*; 8(6)
32. Ramos, E.; et al. (2010). La sobreexpresión del gen de Enzima Convertidora de Angiotensina homóloga (ECA2) revierte la hipertensión arterial y el remodelado cardiaco experimental. *Revista Chilena de Cardiología*, 29(3), 334-341.
33. Ruíz, E. (2015) Enfermedad Cardiovascular en la mujer
34. Santeliz Contra H.; et al. (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
35. Sato Teruki, et al., (2013). Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(12):5203-5211.
36. Silva, et al. (2013) ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *British Journal of Pharmacology*. 169(3)477-492
37. Smolic, C. (2008). *Activación del receptor B1 de bradicininas en miofibroblastos cardiacos por captopril: reducción de la síntesis de colágeno*. Santiago, Chile: Universidad de Chile.
38. Takano H.; et. Al (2003). Implication of cardiac remodeling in Heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med*; 42: 465-469.
39. Thygesen K, Alpert JS, White HD. (2012) Universal definition of myocardial infarction. *Global Heart*, 28(20):2525-38.

40. Ulate Montero Guido, Ulate Campos Adriana (2006). El calcio en los miocitos cardíacos y su papel en las miocardiopatías. *Revista Costarricense de Cardiología*; 8(1)
41. Vallejo, G., Ledesma, J., & Arriaga, R. (2001). Infarto agudo de miocardio, incidencia y mortalidad a 30 días posterior a trombolisis con estreptocinasa. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 78-82.
42. Vergnes Alberto et al. (2015). Estudio epidemiológico de infarto agudo de miocardio en la ciudad de Pigüé. *Revista Argentina de Cardiología*. 83:339-342
43. Wein, A. (2008). *Urología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
44. Villalobos, L. (2013) *Impacto del eje angiotensina (1-7)/ receptor Mas en la inflamación y senescencia vasculares*. Madrid. Universidad Autónoma de Madrid
45. Ramírez, D. (2016) *Participación temporal del receptor AT₁ en la respuesta contráctil de angiotensina II en anillos de aorta con oclusión coronaria en ratas Wistar macho*. México. Universidad Nacional Autónoma de México
46. Modelos animales de cardiopatía isquémica. [en línea] <http://www.cardio-research.com> Consultada el 16 de mayo de 2017
47. Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care (2015). Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo