



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUÁUTITLAN**

**Análisis de la expresión relativa del mRNA de IL2 en la zona de la penumbra del ventrículo derecho a través del seguimiento temporal del infarto miocárdico en ratas Wistar macho.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

**P R E S E N T A :**

**Juan José Granados Quiroz**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Jazmín Flores Monroy**

**COASESOR  
Dra. Luisa Martínez Aguilar**

**CUATITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2019**



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.

## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas .....	3
Índice de Figuras.....	7
Índice de tablas.....	7
Índice de gráficas.....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1    INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO .....	10
1.1.1    ETIOLOGÍA .....	10
1.1.2    FISIOPATOLOGÍA .....	10
1.1.3    FACTORES DE RIESGO.....	11
1.1.4    EPIDEMIOLOGÍA .....	11
1.2    RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO ...	12
1.2.1    LA INTERLEUCINA 2 (IL-2) Y SU PAPEL EN EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.....	16
1.3    OTROS BIOMARCADORES EN EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO ...	17
1.4    SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	19
1.5    TÉCNICAS MOLECULARES: PCR y RT-PCR.....	23
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1    OBJETIVO GENERAL.....	28
2.2    OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
<b>3 HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>4 METODOLOGÍA.....</b>	<b>29</b>
4.1    EXTRACCIÓN DE RNA DEL VENTRICULO DERECHO A PARTIR DE CORAZÓN DE RATTUSNOVERGICUS (RATA WISTAR) .....	29
4.2    PREAPRACIÓN Y OBTENCIÓN DE cDNA .....	30

4.3	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE IL-2 PARA TRES KIT DIFERENTES.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>50</b>

## Abreviaturas

<b>ACE</b>	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
<b>ANG II</b>	Angiotensina II
<b>ANG III</b>	Angiotensina III
<b>ARA</b>	Antagonistas del receptor de angiotensina II
<b>AT1</b>	Receptor Tipo 1 de Angiotensina I
<b>AT2</b>	Receptor Tipo 2 de Angiotensina II
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BNP</b>	Peptido natriuretico de Tipo B
<b>CCL7</b>	Quimiocina (motivos C-C) ligando 7
<b>CD</b>	Cúmulo de diferenciación
<b>cDNA</b>	Ácido desoxorribonucleico complementario
<b>CpG</b>	Islas CpG

<b>cTn1</b>	Troponina cardiaca de Rata 1
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotidos trifosfato
<b>dsRNA</b>	Ácido ribonucleico de doble hebra
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>HGMB1</b>	Caja 1 del grupo de alta movilidad
<b>HSP</b>	Proteínas de choque térmico
<b>HsTN</b>	Troponina humana
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-R</b>	Receptores de interleucinas
<b>IM</b>	Infarto miocárdico
<b>IP-10</b>	Proteína inductora de interferon gamma 10
<b>JAK</b>	Janus Cinasas

<b>LAK</b>	Células asesinas activadas por interleucinas
<b>M2</b>	Macrófagos alternativamente activados
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>NK</b>	Asesinas naturales
<b>NLRP3</b>	Proteínas con dominios NACHT, LRR y PYD
<b>P2X</b>	Receptores purinérgicos
<b>P2Y</b>	Receptores purinérgicos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>RAS</b>	Sistema renina angiotensina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido

<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>TLR</b>	Receptores de tipo Toll
<b>TN</b>	Troponina
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>VCAM-1</b>	Moléculas de adhesión vascular a la célula 1

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fases de cicatrización o inflamación del infarto agudo al miocardio.. ...	13
<b>Figura 2.</b> Lesión cardíaca y detección de tejido.....	14
<b>Figura 3.</b> Respuesta inmune en infarto al miocardio según sus fases y tiempo transcurrido.. .....	15
<b>Figura 4.</b> Vista ampliada del Sistema Renina-Angiotensina.. .....	20
<b>Figura 5.</b> Síntesis canónica y alternativa de Ang II.....	21
<b>Figura 6.</b> Inhibidores actuales del sistema renina-angiotensina.. .....	22
<b>Figura 7.</b> Efectos intracelulares de Ang II en patología a nivel cardiovascular como blanco de ARBs y IECAS.. .....	23
<b>Figura 8.</b> Reacción de replicación de DNA natural a nivel celular. ....	24
<b>Figura 9.</b> Amplificación de DNA mediante PCR. ....	25
<b>Figura 10.</b> Pasos en un ciclo de RT- PCR.....	26

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cantidades de reactivos utilizados para la amplificación de cDNA por PCR punto.....	30
---	----

<b>Tabla 2.</b> Condiciones de amplificación para cDNA por PCR punto final .....	30
<b>Tabla 3.</b> Características de los primers utilizados para IL-2.....	31
<b>Tabla 4.</b> Kit Quantas estandarización para IL-2.....	32
<b>Tabla 5.</b> Condiciones Kit Quantas para IL-2 .....	32
<b>Tabla 6.</b> Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10x estandarización para IL-2.....	33
<b>Tabla 7.</b> Condiciones Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10x estandarización para IL-2.....	34
<b>Tabla 8.</b> Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x estandarización para IL-2 .....	35
<b>Tabla 9.</b> Condiciones para Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x estandarización de IL-2 .....	35
<b>Tabla 10.</b> Kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) estandarización de IL2 .....	36
<b>Tabla 11.</b> Condiciones para Kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) para estandarización de IL-2 .....	36
<b>Tabla 12.</b> Cuantificación y pureza de cDNA por espectrofotómetro de microplacas .....	37
<b>Tabla 13.</b> Kit Quantas (Inserto).....	50

<b>Tabla 14.</b> Condiciones Kit Quantas (inserto).....	50
<b>Tabla 15.</b> Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x.....	51
<b>Tabla 16.</b> Condiciones Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 1x (inserto).....	51
<b>Tabla 17.</b> Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x (inserto). ....	52
<b>Tabla 18.</b> Condiciones para Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x (inserto).....	52
<b>Tabla 19.</b> FastStart Universal SYBR Green Master (ROX).....	53
<b>Tabla 20.</b> Condiciones para Kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Inserto).....	54

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Programa que contiene las fases de una PCR. ....	25
<b>Gráfica 2.</b> Curva de amplificación de IL-2 a 62 °C con kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x.....	38
<b>Gráfica 3.</b> Curva de Disociación para IL-2 a 62 °C con kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x.....	39
<b>Gráfica 4.</b> Cuantificación de la expresión relativa de IL-2 en rata Wistar macho a diferentes tiempos de IAM.....	39

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO**

El infarto agudo al miocardio es principalmente una lesión miocárdica irreversible que resulta de una necrosis en el corazón a nivel miocárdico. Este infarto puede no tener repercusión sanguínea esto quiere decir que la obstrucción sanguínea es permanente o con repercusión, en el cual la obstrucción o falta de flujo sanguíneo es lo suficientemente largo en duración, pero se elimina o se restauran después de que ocurra la muerte celular miocárdica. [33]

#### **1.1.1 ETIOLOGÍA**

La principal causa es la falta de suministro sanguíneo que se produce cuando una arteria pericárdica es bloqueada por un arteroma o trombo, u alguna otra obstrucción. Las autopsias de pacientes hospitalizados que mueren por infarto agudo al miocardio regional revelan un trombo agudo que recubre la placa aterosclerótica en más del 95 % de los casos. Las causas poco comunes de infarto miocárdico incluyen sin causa aparente, embolia coronaria, disecciones arteriales coronarias espontaneas, anomalías congénitas de orígenes coronarios y trombosis en arterias coronarias normales no ateroscleróticas. [33]

#### **1.1.2 FISIOPATOLOGÍA**

La oclusión súbita arterial coronaria cambia el metabolismo aeróbico o anaeróbico mitocondrial de la glucólisis en segundos. La formación de ATP aeróbico reducido estimula la glucólisis y hay un aumento de la absorción de glucosa miocárdica y la degradación del glucógeno. La disminución de ATP inhibe a la bomba sodio potasio ATPasa y esto provoca un aumento intracelular de sodio y cloro. De igual manera existen alteraciones sarcoplásmicas con un aumento del transporte de calcio y esto induce la activación de proteasas y alteraciones en las proteínas contráctiles. La producción de piruvato por la glucólisis, se oxida en la mitocondria, lo que lleva a la producción de lactato, una caída en el pH intracelular, una

reducción de la función contráctil y una mayor demanda de ATP para mantener el calcio en homeostasis. Los miocitos se ven afectados de manera edematosa y presentan inflamación por la sobrecarga osmótica. El tamaño aumenta por una disminución de glucógeno. [26]

Los miocitos lesionados irreversiblemente contienen núcleos contraídos con cromatina marginal marcada. La lesión isquémica irreversible se caracteriza por varios procesos que incluyen el sarcolema, su eventual interrupción y la muerte celular. El aumento de calcio citosólico y la activación de la fosfolipasa promueve la liberación de fosfolípidos en ácidos grasos deteriorando la célula y promoviendo la acumulación de radicales libres en la mitocondria. [26]

### **1.1.3 FACTORES DE RIESGO**

Los factores de riesgo para un infarto miocárdico se dividen en tres categorías: factores no modificables de riesgo (edad, sexo, y antecedentes familiares), los factores modificables de riesgo (tabaquismo, consumo de alcohol, la inactividad física, la mala alimentación, hipertensión, diabetes, dislipidemias y síndrome metabólico), y factores de riesgo emergentes (proteína C reactiva, fibrinógeno, calcificación de las arterias coronarias, homocisteína, lipoproteínas). [5]

### **1.1.4 EPIDEMIOLOGÍA**

En contraste con la carga de enfermedades del corazón, no hay un enfoque de vigilancia representativa a nivel nacional para la enfermedad cardíaca. Los centros para el Control y Prevención de Enfermedades conducen encuestas nacionales de altas hospitalarias, atención médica, ambulatoria, factores de riesgo y características de la población, y la Agencia para la Investigación y Calidad recoge sobre los gastos médicos y muestras de pacientes hospitalizados.

La medición de la incidencia de infarto al miocardio en diversas poblaciones y la configuración requiere que se cumplan varias condiciones. Estas incluyen la disponibilidad de una población definida, que es indispensable para generar tasas

de incidencia, y la dependencia de una definición válida que en realidad mide el evento deseado.

Existe un estimado de cinco millones de visitas al servicio de urgencias cada año en Estados Unidos para el dolor torácico; en México la tasa de mortalidad por infarto agudo al miocardio es de 27.2 % con mayor incidencia en hombres con un promedio de edad de 60 años, demostrando que este padecimiento ha aumentado el 50 % en los últimos 14 años.

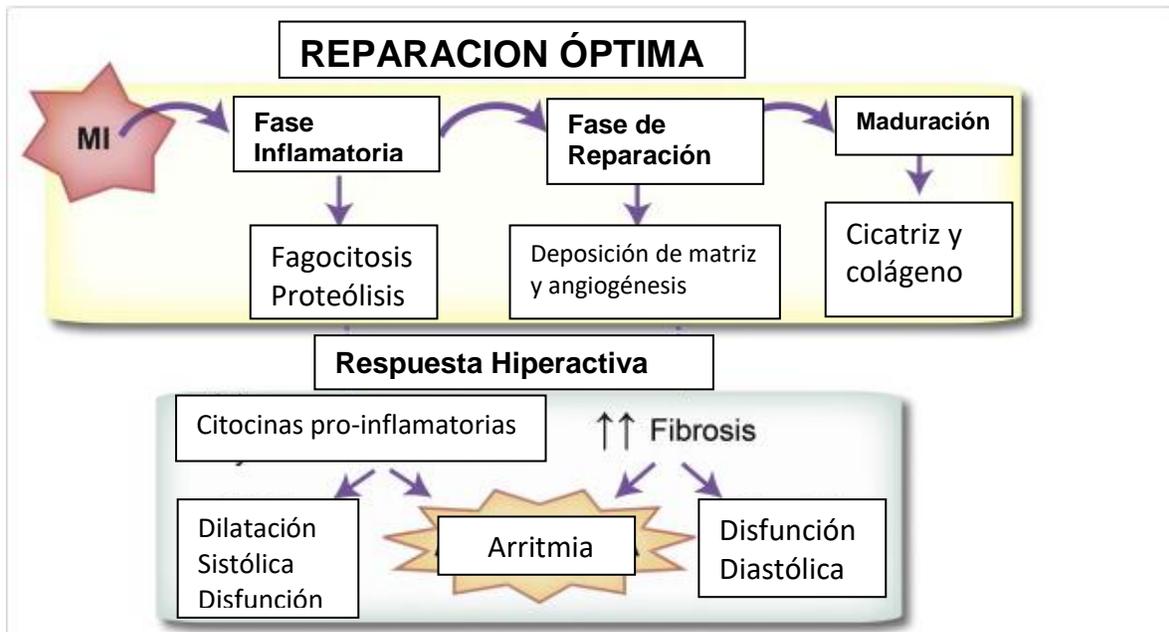
Hoy en día con una intervención coronaria percutánea y la colocación de marcapasos, tratamientos antitrombosis, y el uso rutinario de un tratamiento médico complementario, la mortalidad hospitalaria ha alcanzado un valor mínimo de 6 -7 %. [5]

## **1.2 RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO**

La inflamación juega un papel muy importante en el infarto agudo al miocardio y por lo tanto involucra al sistema inmunológico, de tal manera que como en la mayoría de los tejidos, se encuentran células inmunes primarias que residen en el músculo cardíaco, tales como los macrófagos, que se observan típicamente cerca de las células endoteliales o dentro del espacio intersticial, mientras que se pueden observar muy pocos monocitos. De igual manera existen poblaciones dispersas de células dendríticas en válvulas cardíacas y los mastocitos en tejido cardíaco en reposo, linfocitos B y linfocitos T reguladores. [16]

Esta fase inmunológica de infarto agudo al miocardio se puede describir en 3 supuestas fases: inflamatoria, fase proliferativa y la fase de maduración. Durante la fase inflamatoria, se producen señales de peligro (alarminas), para activar la vía de la inmunidad innata que induce la síntesis de quimiocinas y citocinas junto con la expresión de moléculas de adhesión a células endoteliales vasculares. Ocasionando la liberación HGMB1, proteínas de choque térmico, adenosina, RNA

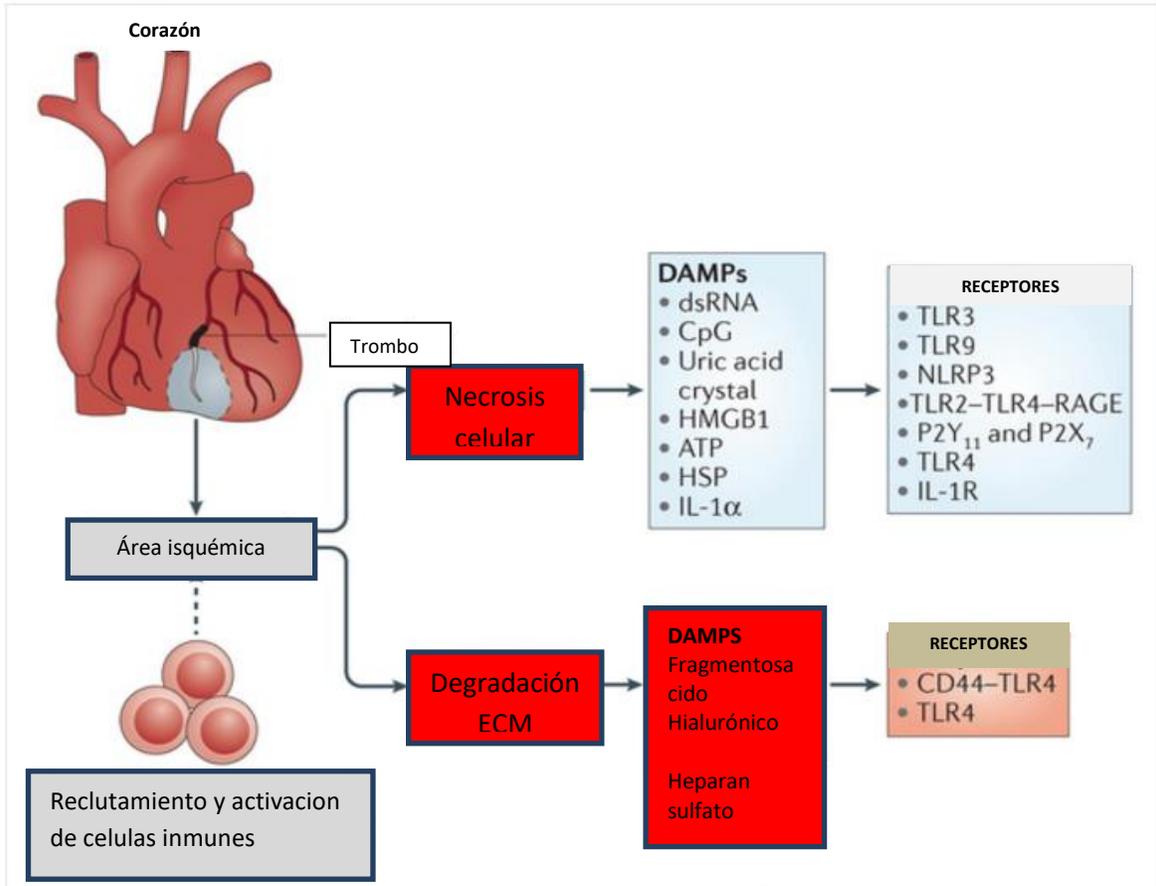
extracelular, fragmentos de matriz y la interleucina 1 $\alpha$ , estimulando así la cascada inflamatoria postinfarto.



**Figura 1.** Fases de cicatrización o inflamación del infarto agudo al miocardio. (Modificada de Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016).

Las alarminas liberadas por las células necróticas activan los receptores de tipo Toll 1, 2 y 4 para inducir la síntesis de quimiocinas y citocinas. Las citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  y la IL6 promueven el reclutamiento de linfocitos en la zona infartada. [14]

En la fase proliferativa juegan un papel importante los macrófagos alternativamente activados (M2), miofibroblastos y células endoteliales dominan esta fase reparadora. Los macrófagos alternativamente activados secretan IL10 y los factores de crecimiento y TGF, aumentando la producción de fibronectina y colágeno para poder reemplazar el tejido ventricular perdido, convirtiéndole así en una cicatriz. [18]



**Figura 2.** Lesión cardiaca y detección de tejido. (Modificada de Translational Research, 2016).

Aparte de este acontecimiento la supresión de la señalización y de la resolución del efecto inflamatorio dependen del infiltrado de los diferentes subconjuntos de linfocitos T, esto está dado por la liberación de IL 2 que tiene una importante regulación sobre los Linfocitos T reguladores, así como subpoblaciones de monocitos antiinflamatorios. De igual manera sistema renina-angiotensina-aldosterona, TGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas, y proteasas como tripsina y quimasa juega un papel importante en la activación de los fibroblastos en el infarto al momento de la resolución o reparación. [14]

Durante la fase de maduración, la actividad proliferativa de los fibroblastos se suprime y se inhibe la deposición de las nuevas proteínas de la matriz. Poco se sabe acerca de las rutas y señales inhibitorias que terminan la respuesta fibrótica



### **1.2.1 LA INTERLEUCINA 2 (IL-2) Y SU PAPEL EN EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO**

Las interleucinas pertenecen a una categoría de proteínas biológicamente activas, denominadas citocinas. Estas fueron clasificadas de acuerdo al orden del descubrimiento y esto ha traído la clasificación en subgrupos o familias basada en la estructura y/o subunidades de receptores compartidos o localizaciones cromosómicas. [13]

Tal es el caso de la IL-2 que actúa como un factor de crecimiento y potente estimulador de la proliferación de linfocitos T. Esta se produce por los Linfocitos T estimulados ya sea con antígeno o lectinas mitogénicas tales como fitohemaglutinina en asociación con IL-2. Esta compuesta por 133 aminoácidos cuya secuencia primaria muestra poca homología con los de otras interleucinas, ya que tiene puentes disulfuro y forma un monómero hidrófobo glicoprotéico de aproximadamente 15.5 KDa. La unión de IL 2 a sus receptores de alta afinidad activa la señalización intracelular vía Janus tirosina cinas (JAK) y la Señal activadora de la transcripción y transducción (STAT). Puede inducir la producción de interferón (IFN), IL 4 y TNF. También estimula a las células NK y LAK, de igual manera promueve la actividad citolítica de monocitos y la proliferación de linfocitos B activados así como la secreción de inmunoglobulinas. [13]

Dado estas características y funciones se han investigado el papel de IL-2 en un modelo evaluado en rata con infarto de miocardio. Estos estudios muestran que la producción de IL-2 ejerce efectos positivos sobre la función del corazón. Esto es porque los efectos benéficos son mediados por linfocitos T reguladores. [11]

De igual manera se demostró que las células NK activadas con IL-2 promueven la angiogénesis cardiaca. Las células NK activadas con IL-2 se unen integrinas y VCAM-1 en endotelio y perturban asociaciones de N-cadherina vía KLRG1. Este proceso transloca las cateninas – b desde el citoplasma al núcleo y elimina la

inhibición por contacto de células de la proliferación. IL-2 es una citocina de tipo 1, producida de 4- 6 días después de un infarto al miocardio. Está bien establecido que la IL-2 se une a sus receptores expresados por los linfocitos y las células NK para inducir su activación y la migración al sitio de la lesión. [6]

### **1.3 OTROS BIOMARCADORES EN EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO**

En Mexico los Síndromes isquémicos Coronarios Agudos, son una de las principales causas de muerte según los estudios del RENASICA. Dentro de los cuales se encuentra asociado el infarto agudo al miocardio, el cual tiene una tasa de mortalidad, dentro de los 30 días siguientes a la detección y tratamiento. [31]

Debido a estos reportes y a que se requiere un diagnostico inmediato, se ha encontrado el uso de biomarcadores biológicos que se encuentran durante todo el proceso fisiopatológico del IAM, los cuales son de gran de utilidad para dar un seguimiento a nivel neurohormonal, hemodinámico, cardiorenal e inflamatorio. [30]

Los institutos nacionales de la salud y administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos en 2001 definieron como biomarcador, una característica que se puede medir de manera objetiva y ser evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una terapia de intervención. Estas características pueden ser medibles en fluidos corporales como sangre, orina o en algunas ocasiones en biopsias de tejidos con referencia a un fenotipo clínico. [17]

En cuanto a la evaluación del corazón, ya sea en una situación de riesgo donde se encuentre el órgano estructuralmente normal, donde presente lesiones, una disfunción ventricular o una progresión de falla cardiaca sintomática, se sabe que dentro de estos procesos de remodelación junto con el control de la activación neurohormonal puede estar involucrado algún biomarcador para tener un control biológico. De hecho, a lo largo de la ruta del desarrollo de una falla cardiaca hay un número creciente de lesiones, proteínas de remodelación y de activación

neurohormonal cuyas mediciones podrían emitir información importante sobre la falla cardíaca. Algunas de ellas son el péptido natriurético tipo B (BNP) y el N-terminal pro BNP (NT-pro BNP). [10]

Estos péptidos son un estándar de oro en la falla cardíaca ya que son secretados principalmente por aurículas cardíacas y ventrículos cardíacos. El estiramiento de las fibras miocárdicas, tales como los que se dan en situaciones de sobrecarga de volumen y la isquemia miocárdica son los más importantes estímulos para su secreción. Estos están involucrados en procesos de homeostasis cardiovascular, su efecto diurético, natriurético y propiedades vasodilatadoras representan efectos relevantes en los riñones, en el SNC y sistema vascular, así como la participación en la regulación de la presión arterial. [3]

Un biomarcador con efectos pluripotentes in vivo es el ST2, el cual se cree que tiene la función inmunomoduladora como marcador de superficie celular de linfocitos T cooperadores y también de linfocitos Th2, esto fue descrito inicialmente en el contexto de la proliferación celular, estados inflamatorios y procesos autoinmunes. Pero es importante destacar que este sistema de ST2 también es inducido en la tensión mecánica de los fibroblastos cardíacos o cardiomiocitos y parece estar íntimamente relacionado con la remodelación cardíaca y la fibrosis en la insuficiencia cardíaca. Este biomarcador al parecer tiene ventajas ya que su concentración no se ve afectada por la edad, función renal o índice de masa corporal. [10]

En las lesiones a miocitos las 2 troponinas cardíacas específicas son la cTnI y cTnT, que son un constituyente integral de las proteínas miofibrilares y se liberan lentamente durante varios días después de la muerte celular, la segunda y más pequeña fuente de estas troponinas reside en reservas cercanas al citoplasma y de este se libera relativamente rápido, dentro de 1 a 2 horas después de la lesión de los miocitos. [7]

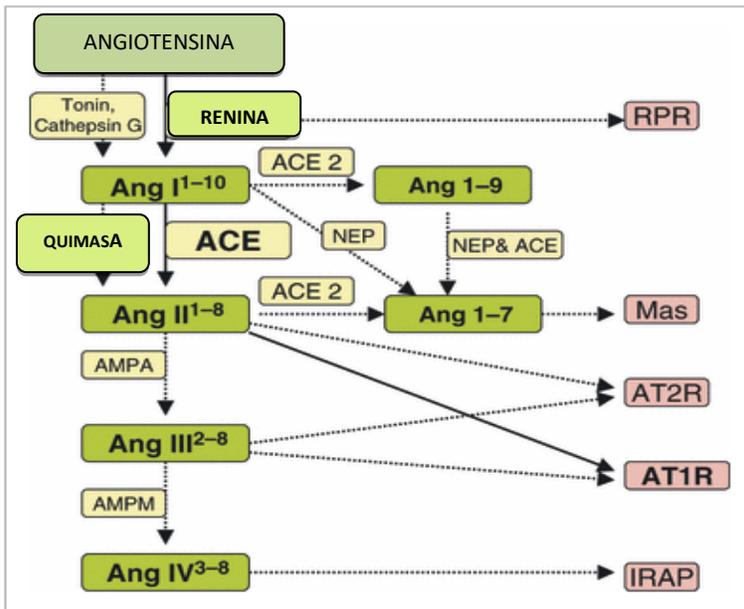
Estas troponinas cardiacas se han utilizado para el diagnóstico y evaluación del IAM. Dichas proteínas sirven para tener un pronóstico en este tipo de etiología, teniendo como biomarcador de IAM a la troponina de alta sensibilidad (hsTN), donde la necrosis miocárdica es detectada en una gran mayoría de pacientes. [7]

Y por último ANG II también es una molécula proinflamatoria e induce la producción de ROS, citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. Además aumenta la expresión vascular de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Estos efectos están mediados por ANG II y la oposición de los receptores AT<sub>2</sub>, estos asociados a funciones pro apoptóticas y neuroprotectoras. En paciente con hipertensión e insuficiencia renal crónica, se ha observado un aumento significativo del ANG II es por ello que se le ha considerado como un posible biomarcador en estas patologías cardiovasculares. [17]

#### **1.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA**

Uno de los sistemas de gran importancia y que no se puede dejar a un lado en la aparte de funcionamiento cardiaco y de biomarcadores, del cual las primeras investigaciones sobre el sistema renina-angiotensina abrieron el camino para mejorar la comprensión de su fisiología y su fisiopatología con respecto a otros sistemas como el cardiaco.

En este sistema la angiotensina II (Ang II), juega un papel clave en la regulación en la homeostasis cardiovascular, actuando sobre la regulación del volumen sanguíneo y la resistencia vascular periférica. En los últimos años, sin embargo, varios estudios han demostrado que el RAS presenta una complejidad mucho mayor de lo que se pensaba. La angiotensina III (Ang III), que se forma a partir de Ang II por la acción de la aminopeptidasa A, induce la liberación de aldosterona. Por otra parte hay otra molécula como la angiotensina IV (Ang IV), formado a partir de Ang III por otra aminopeptidasa N, con un papel interesante a nivel sistema nervioso central. [4]

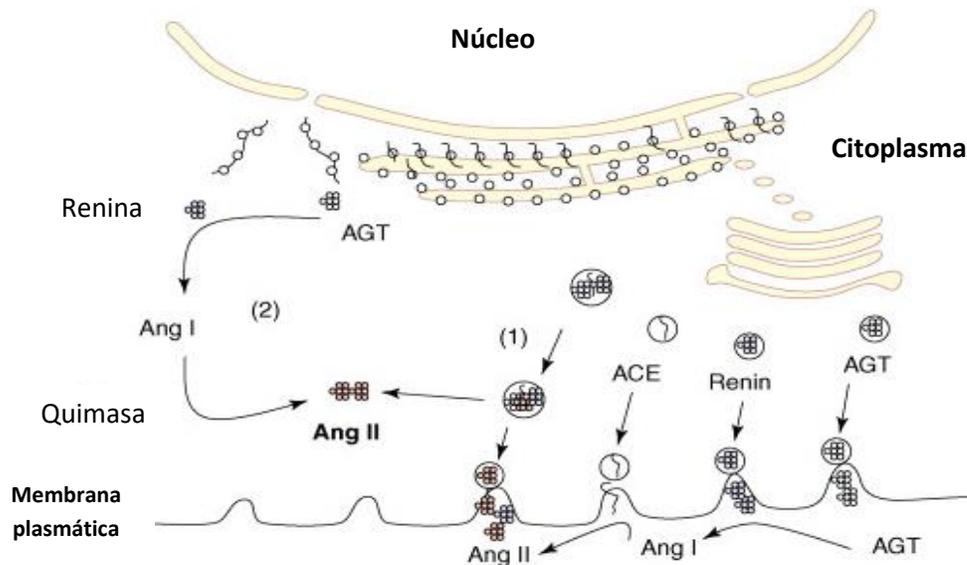


**Figura 4.** Vista ampliada del Sistema Renina-Angiotensina. (Modificado de Journal of internal medicine, 2008).

Otras carboxipeptidasas homologas a la enzima de conversión de angiotensina fueron descubiertas y nombradas ACE 2, esta se encarga de escindir a la Ang I y Ang II para generar Ang 1-9 y Ang 1-7, respectivamente. Los efectos de estos péptidos de angiotensina se ejercen a través de la activación de los receptores de la angiotensina como AT1, AT2 y AT4. [4]

La Ang II ejerce sus acciones a través de receptores AT1 y AT2 que por principio básico estos receptores median reacciones o funciones opuestas. Los receptores AT1 median acciones que pueden traer consecuencias potencialmente perjudiciales y los receptores AT2 tienen acciones protectoras con relevancia clínica. Esta angiotensina II es un importante regulador del equilibrio homeostático y de la hemodinámica, pero también del crecimiento celular y remodelación cardiovascular. Así, los receptores AT1 median la vasoconstricción, la liberación de vasopresina, aldosterona, fibrosis, crecimiento celular y migración; y más recientemente se ha demostrado que Ang II causa la generación de radicales libres de oxígeno a través de estos receptores AT1 están implicados en

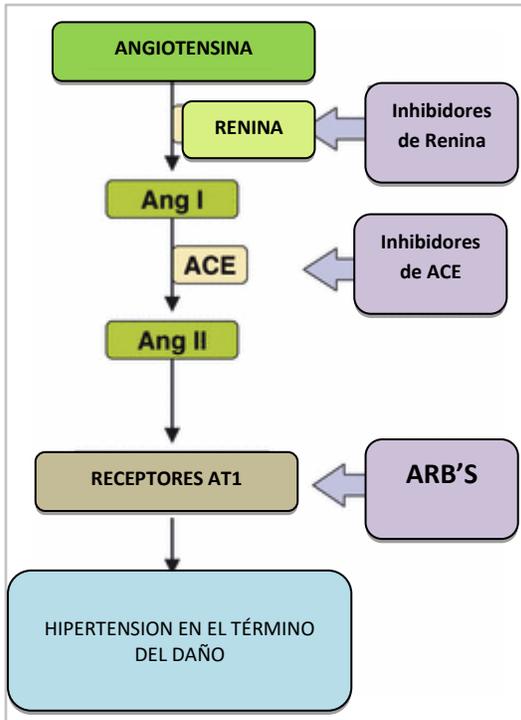
procesos inflamatorios, incluyendo aterosclerosis y el envejecimiento vascular; el receptor AT2 media la vasodilatación, la liberación de óxido nítrico y por lo general la inhibición del crecimiento celular. [9]



**Figura 5.** Síntesis canónica y alternativa de Ang II. (Modificado de Trends in endocrinology and metabolism, 2007).

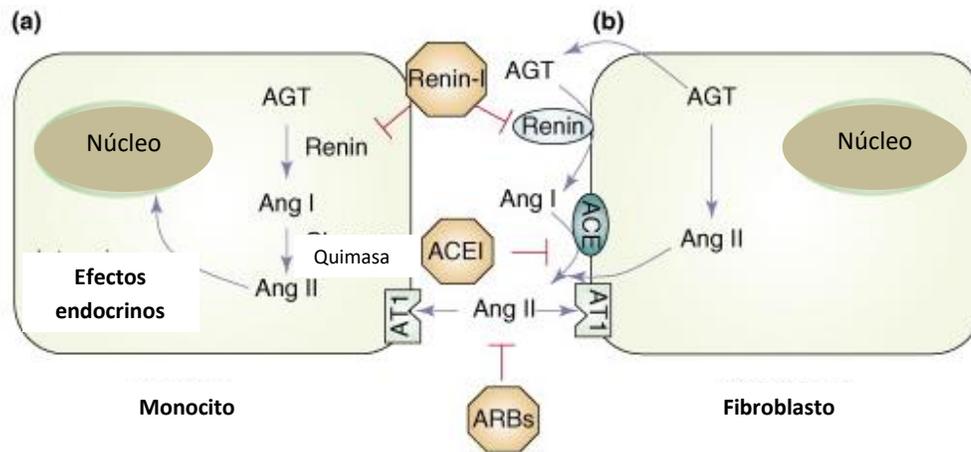
Existen otras moléculas de gran relevancia clínica a nivel de este sistema como las quimasas que se almacenan en un complejo macromolecular con proteoglicanos y heparina en los gránulos secretores de los mastocitos. Estas moléculas tienen una función enzimática y para que lleguen a presentar esta activación deben de ser liberados por los gránulos, por ejemplo por un daño vascular. Por lo tanto estas quimasas puede producir Ang II solo en las paredes arteriales dañadas o escleróticas.[9]

Por lo tanto el RAS tiene un potencial en las implicaciones terapéuticas. En este sistema, los efectos beneficiosos observados son los de fármacos de tipo ARB& IECA en condiciones patológicas al respecto de este sistema en condiciones de enfermedades cardiovasculares. [2]



**Figura 6.** Inhibidores actuales del sistema renina-angiotensina. (Modificado de Journal of internal medicine, 2008).

De igual manera se ha demostrado que el uso combinado de estos fármacos proporciona beneficios adicionales en comparación con el uso individual de cualquiera de estos. Pero la reciente introducción del primer fármaco inhibidor de la renina ha sido eficaz por vía oral, para el bloqueo casi completo de RAS, tal vez más eficaz que la terapia combinada. [2]



**Figura 7.** Efectos intracelulares de Ang II en patología a nivel cardiovascular como blanco de ARBs y IECAs. (Modificado de Trends in endocrinology and metabolism, 2007).

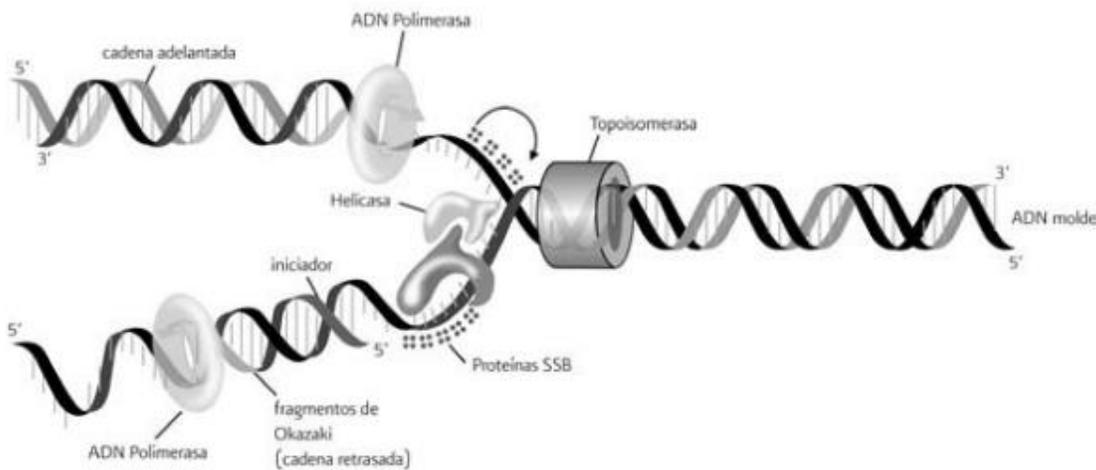
Por último está involucrado un sistema intracelular importante a nivel cardiovascular el cual no puede ser inhibido por los ARBs o IECAs, ya que los receptores AT1 no podrían estar directamente involucrados en la mediación de los estos efectos intracelulares y por la síntesis intracelular de Ang II por caminos alternativos como las quimasas en condiciones patológicas. [12]

## 1.5 TÉCNICAS MOLECULARES: PCR y RT-PCR

Con los nuevos avances en biología y genética se tuvieron que optimizar y crear técnicas que facilitarían el análisis de dichos estudios y disminuirían costos, de esta manera es como han aparecido diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del DNA y una de las más importantes desarrollada por Kary Mullis a la cual llamo PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) que revoluciono totalmente a la biología molecular y en cómo se estudiaba el DNA en ese momento. [19]

La PCR consiste en una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que

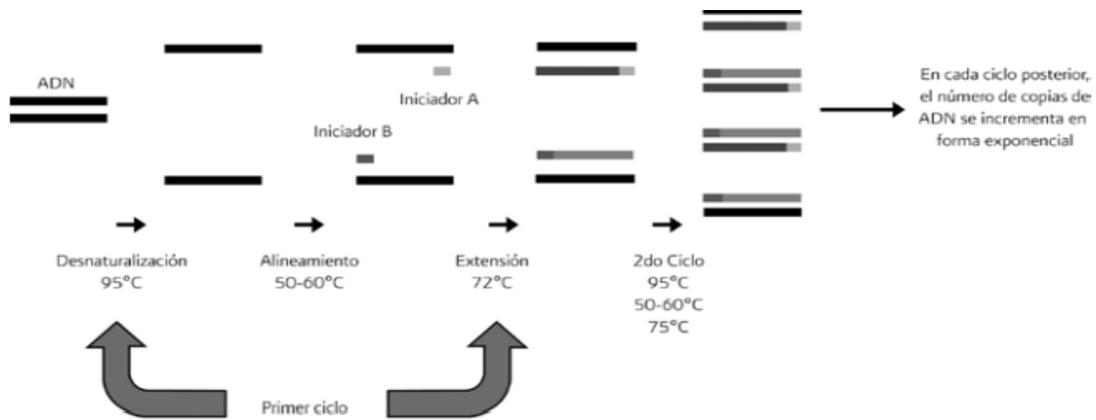
la secuencia blanco es copiada de manera precisa. Para todo esto la reacción hace uso de cierta enzima polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. Los elementos más importantes en la reacción son el templado o molde (DNA o cDNA), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg), una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos interactúan en tres principales etapas, las cuales son, desnaturalización, hibridación y extensión. Esta reacción se realiza en equipos especializados llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Para verificar los amplicones, los productos de la PCR, son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. [19]



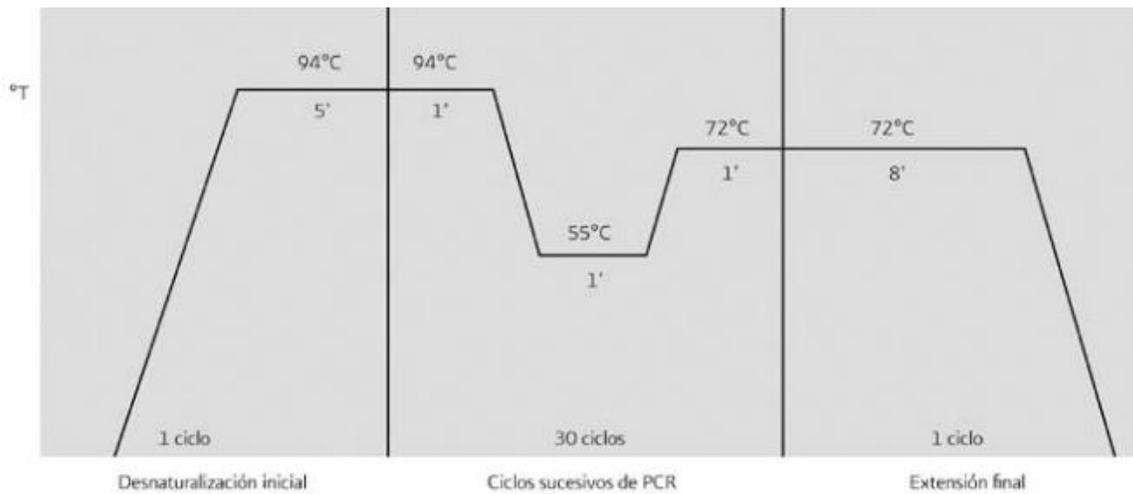
**Figura 8.** Reacción de replicación de DNA natural a nivel celular. [19]

Esta reacción se inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de DNA mediante el calentamiento de la muestra entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las une, de esta manera cada cadena queda como molde de la síntesis de una nueva cadena complementaria de DNA. Una vez separadas las cadenas del DNA, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va amplificar, para

que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5´ a 3´ para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la DNA polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. [15]



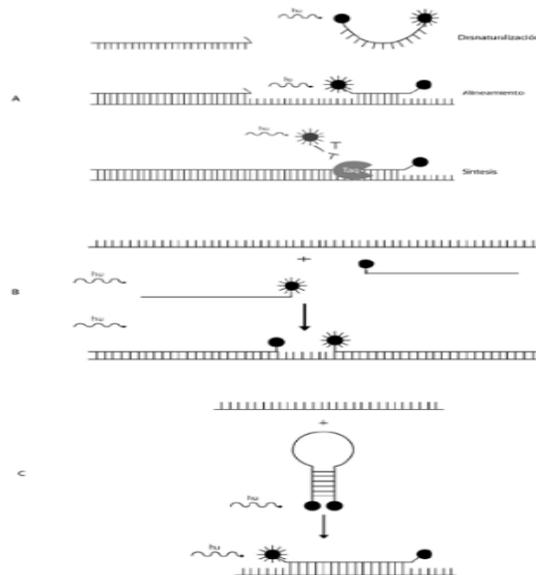
**Figura 9.** Amplificación de DNA mediante PCR. [15]



**Gráfica 1.** Programa que contiene las fases de una PCR. [15]

La Taq polimerasa es la enzima más utilizada en la PCR, aunque presenta la desventaja de que no tiene actividad correctora, pero es altamente termoestable. También se han encontrado enzimas más termoestables, termo activas y de alta fidelidad, provenientes de bacterias del dominio Archaea, como la DNA polimerasa Pfu. [19]

Existen métodos modificados de esta técnica como la PCR en tiempo real, cuyos desarrolladores fueron Higuchi y colaboradores en 1992, en el cual incorporaron bromuro de etidio al DNA durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV y por otro lado con sondas para su detección y amplificación con usos de reporteros fluorescentes en la reacción como se muestra en la Figura 11. [19]



**Figura 10.** Pasos en un ciclo de RT- PCR. [1]

El principio de la técnica se basa en la PCR de punto final, solo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación son diferentes. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, a diferencia de la de punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. [19]

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de material genético, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR punto final que necesita una mayor concentración. Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son los utilizados en la PCR punto final y generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente.

[1]

La determinación del nivel de expresión de los genes ha permitido asociar cambios de ciertas moléculas en una diversidad de procesos fisiológicos como en la inflamación o para predecir recurrencia del cáncer. Ayuda en la genotipificación de animales knock-out, knock in y modelos transgénicos, así como en la determinación de la eficacia del knockdown. En el genoma humano, el reconocimiento de polimorfismos de un solo nucleótido, SNPs (del inglés single nucleotide polymorphisms) intenta comprender la complejidad de la respuesta ante las enfermedades más comunes, el entender el papel de éstos ayudará a disminuir los efectos adversos que se presentan en ciertos individuos y permitirá diseñar regímenes de tratamientos con dosis personalizadas. [1,32]

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Analizar los cambios de la expresión relativa del mRNA de IL-2 en el ventrículo derecho a las 48 h, 1, 2, 3 y 4 semanas de infarto agudo al miocardio inducido en rata Wistar macho para analizar el efecto proinflamatorio durante su evolución.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Extraer el RNA del ventrículo derecho de las muestras experimentales.
- Sintetizar el cDNA a partir del RNA obtenido del ventrículo derecho.
- Estandarizar condiciones de trabajo para la amplificación del gen de la proteína IL-2.
- Amplificar los genes de GAPDH como gen constitutivo e IL-2 de todos los grupos experimentales, utilizando SYBR Green como sistema de detección.
- Medir expresión relativa de IL-2 durante los diferentes tiempos del IAM.

## **3 HIPÓTESIS**

Debido al proceso inflamatorio que se genera por la inducción del infarto al miocardio se encontraran diferencias significativas a los diferentes tiempos de oclusión coronaria, siendo los tiempos más largos de 3 y 4 semanas donde se encuentre una mayor expresión del gen de la interleucina proinflamatoria.

## **4 METODOLOGÍA**

### **4.1 EXTRACCIÓN DE RNA DEL VENTRÍCULO DERECHO A PARTIR DE CORAZÓN DE RATTUSNOVERGICUS (RATA WISTAR)**

La extracción de RNA por columnas fue realizada de acuerdo al kit Pure Link RNA Mini Kit de Ambion y según lo indicado en el inserto del kit, en el cual se pesaron 20 mg de tejido en este caso de corazón infartado de Rata Wistar que fue conservado a -4 °C, el cual se homogenizó con tijeras de corte pequeño en 400 uL de Buffer R-1 y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Posteriormente se le agregaron 150 uL de Buffer R –II y se agitó en vortex por 15 a 30 segundos. Se centrifugó a 12, 000 g por 5 min a 4° C, para descartar el pellet de DNA y proteína. Se transfirió el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregaron 250 uL de isopropanol para precipitar el RNA, mezclándolos en vortex. Esta mezcla fue transferida a un tubo de 2 mL el cual contiene una columna spin/vac y se centrifugó a 6000 g por 1 minuto a 4° C, para la unión de RNA a la membrana de la columna.

Se colocó el filtrado en un tubo de 2 mL y se insertó la columna dentro del tubo de microcentrífuga de 2 mL.

A este filtrado se le adicionaron 500 uL de Buffer W1A dentro de la columna y se centrifugaron a 12, 000 g por 1 min, para quitar remanentes proteicos y de DNA.

Se descartó el filtrado y se colocó la columna dentro de un tubo de 2 mL, a este se le adicionaron 700 uL de Buffer W2 y se centrifugaron a 12, 000 g por 1 min, para eluir el RNA ya purificado. Se descartó el filtrado a un tubo de 2 mL y se repitieron los lavados con 700 uL de Buffer W2. Finalmente se realizó la cuantificación en un espectrofotómetro de micro placas EPOCH.

## 4.2 PREAPRACI3N Y OBTENCI3N DE cDNA

La preparaci3n y obtenci3n de cDNA con el kit Promega, de acuerdo con las cantidades y condiciones que se muestran en la tabla 1 y 2. Realizando la preparaci3n de 4 muestras de acuerdo al volumen total obtenido, para su amplificaci3n por PCR punto final. Al finalizar la amplificaci3n estas muestras se cuantificaron mediante el espectrof3tometro de microplacas EPOCH.

**Tabla 1.** Cantidades de reactivos utilizados para la amplificaci3n de cDNA por PCR punto

REACTIVO *	VOLUMEN
MgCl <sub>2</sub>	20 µL
dNTP's	10 µL
RNAsina	2.5 µL
AMV	5 µL
OligodT	5 µL
TriOx	10 µL
<b>Volumen total</b>	52.5 µL

**Tabla 2.** Condiciones de amplificaci3n para cDNA por PCR punto final

Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalizaci3n	
42	15 min
Amplificaci3n	
45	5 min

Enfriamiento	
4	5 min
1 ciclo.	

#### 4.3 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE IL-2 PARA TRES KIT DIFERENTES

Para realizar la amplificación y estandarización se utilizaron los primers mostrados en la Tabla 3; los cuales se diluyeron en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

**Tabla 3.** Características de los primers utilizados para IL-2

Primer Forward	Propiedades Fisicoquímicas
5' GCCTGGAAAATGAACTCGG 3'	148.4 nmol
	870 $\mu$ g
	27.89 OD
	31.1 $\mu$ L / OD
	Tm 64.5 °C
Primer Reverse	Propiedades Fisicoquímicas
5' CTGGCTCATCATCGAATTGG 3'	292.9 nmol
	1789.3 $\mu$ g
	54.66 OD
	32.7 $\mu$ L / OD
	Tm 65.5 °C

Estos se cuantificaron (en ng/ $\mu$ L) por espectrofotómetro de microplacas EPOCH y se evalúa su calidad con base a la relación de absorbancias 260/280 y se llevaron a una dilución equivalente a 10 pmol/ $\mu$ L.

En la RT-PCR se utilizaron los siguientes Kit para la reacción, los cuales fueron el Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x, Quantas, Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x y FastStart Universal SYBR Green Master (ROX). La reacción para RT-PCR fue realizada de acuerdo al inserto de cada kit que se encuentran en los anexos, solo que se modificaron ciertas condiciones como T<sub>m</sub>, tiempo y volúmenes para realizar la estandarización de acuerdo a los primers utilizados, los cuales se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla 4.** Kit Quantas estandarización para IL-2

REACTIVO	VOLUMEN (20 µL de reacción)	CONCENTRACIÓN
Perfecta SYBR Green Fastmix for iQ (2x)	10µL	1x
Fwd Primer IL-2	2 µL	148.4 nM
Rvs Primer IL-2	2 µL	292.9 nM
H <sub>2</sub> O libre de nucleasa	3 µL	-----
cDNA	3 µL	2191 ng/µL
<b>Volumen final</b>	20 µL	-----

**Tabla 5.** Condiciones Kit Quantas para IL-2

Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	
95	5 min
Amplificación	
95	10 s
T <sub>m</sub> *	10s

Enfriamiento	
72	10 s
Curva de fusión	
95	1 s
60	1 s
95	2 s
45 ciclos.	

\*Las Tm utilizadas fueron 56°C, 59°C, 60°C, 61°C, 63°C y 65°C

**Tabla 6.** Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10x estandarización para IL-2

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
H <sub>2</sub> O grado PCR	12.8 µL	-----
MgCl <sub>2</sub>	1.2 µL	25 mM
Fwd Primer IL-2	1 µL	368.6 pmol/ µL
Rvs Primer IL-2	1 µL	391. 78 pmol/ µL
LightCycler DNA Master SYBR Green	2 µL	1x
cDNA	2 µL	2191 ng/µL
<b>Volumen total</b>	20 µL	-----

**Tabla 7.** Condiciones Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10x estandarización para IL-2

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización</b>	
95	10 min
95	10 s
<b>Amplificación</b>	
*T <sub>m</sub>	10 s
72	10 s
<b>Curva de fusión</b>	
95	1 s
65	1 s
95	1 s
<b>Enfriamiento</b>	
40	30 s
45 ciclos.	

\*Las T<sub>m</sub> utilizadas fueron 60°C, 62°C, 63°C y 64°C

**Tabla 8.** Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x estandarización para IL-2

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
H <sub>2</sub> O GRADO PCR	-----	-----
Fwd Primer	2 µL	
Rvs Primer	2 µL	
Master mix 2x	5 µL	2 x
cDNA	5 µL	2191 ng/µL
<b>Volumen final</b>	14 µL	-----

**Tabla 9.** Condiciones para Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x estandarización de IL-2

Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Desnaturalización</b>	
95	5 min
<b>Amplificación</b>	
95	10 s
T <sub>m</sub> *	10 s
72	10 s
<b>Curva de fusión</b>	
95	5 s
65	1 min
98	10 s
<b>Enfriamiento</b>	

40	10 s
45 ciclos.	

\*Las Tm utilizadas fueron de 58°C y 56°C

**Tabla 10.** Kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) estandarización de IL2

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	15 µL	1 x
Fwd Primer	2 µL	419.14 pmol/ µL
Rvs Primer	2 µL	406.8 pmol/ µL
H <sub>2</sub> O grado PCR	1 µL	-----
cDNA	2 µL	2348.9 ng/ µL
<b>Volumen final</b>	22 µL	-----

**Tabla 11.** Condiciones para Kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) para estandarización de IL-2

Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	
95	10 min
Amplificación	
95	10 seg
72	10 s
Tm*	30 s
Curva de fusión	

95	1 s
60	1 s
95	10 s
45 ciclos.	

\*Las Tm utilizadas fueron 56°C, 58°C y 60°C

## 5 RESULTADOS

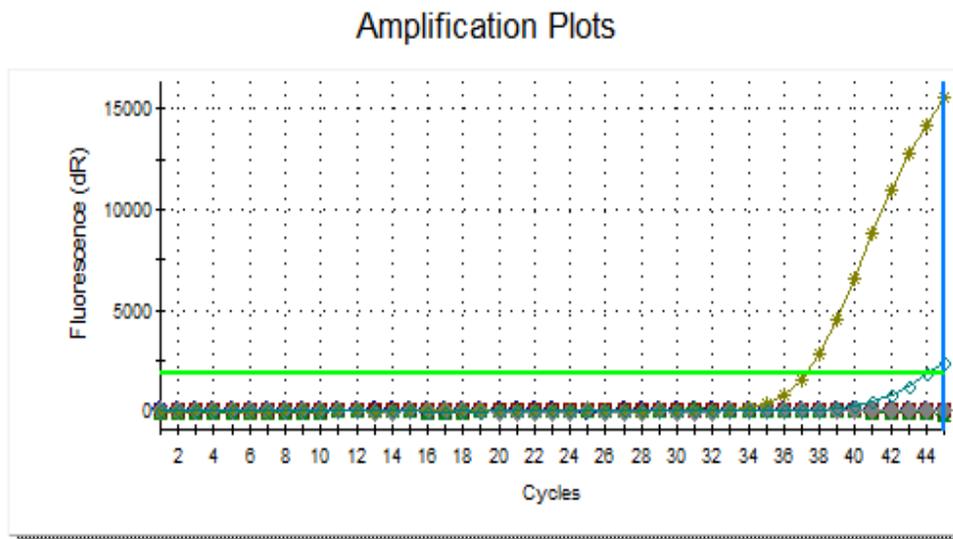
Para el cDNA amplificado se obtuvieron diferentes concentraciones e índices de pureza (coeficiente 260/280), correspondientes a cada una de las 4 muestras procesadas a partir del volumen total de la mezcla de reacción para la PCR punto final, las cuales se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 12.** Cuantificación y pureza de cDNA por espectrofotómetro de microplacas

<b>Muestras</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>Coeficiente 260/280</b>
A	1646.508	1.623
B	1561.481	1.604
C	1538	1.558
D	1592.089	1.569

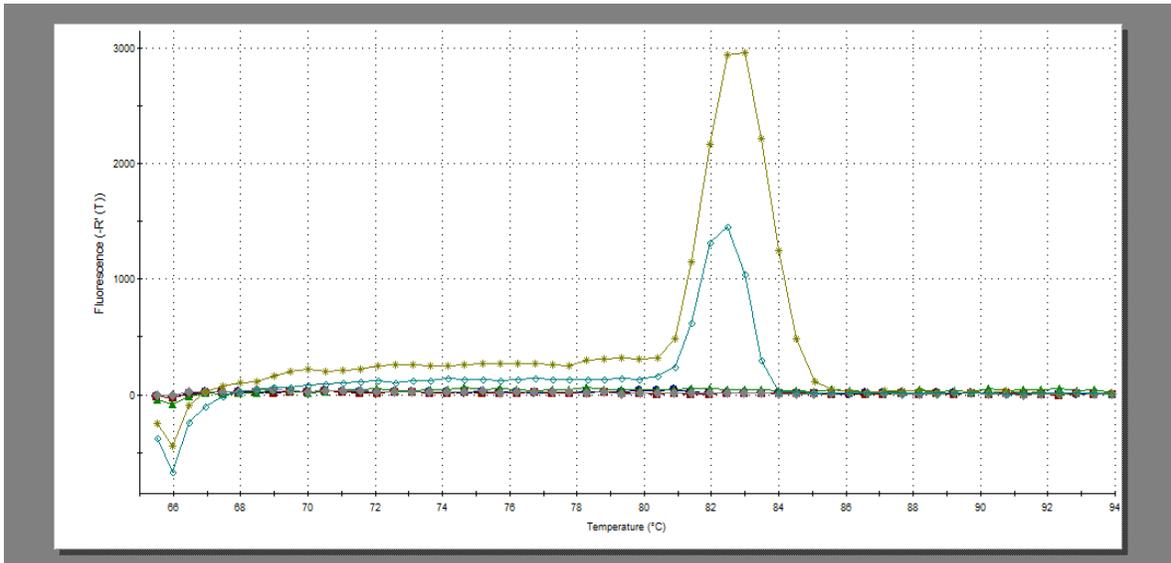
Por otra parte y de acuerdo a las condiciones elegidas en la estandarización, se eligió el kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x con el que se obtuvo una gráfica de amplificación, la cual se muestra en la Gráfica 2, con un grado de amplificación dado por la fluorescencia leída por el termociclador y los ciclos de la PCR establecidos y nos muestra una primera fase o fase inicial en la cual está por debajo del nivel de detección del termociclador, posteriormente comienza una

zona de umbral, surgiendo una intersección con la curva de amplificación, el cual nos indica el inicio de detección de la fluorescencia emitida por el fluoroforo con respecto al fragmento de material genético de estudio y por otro lado nos muestra el Ct que se encuentra aproximadamente a los 35 ciclos de amplificación.



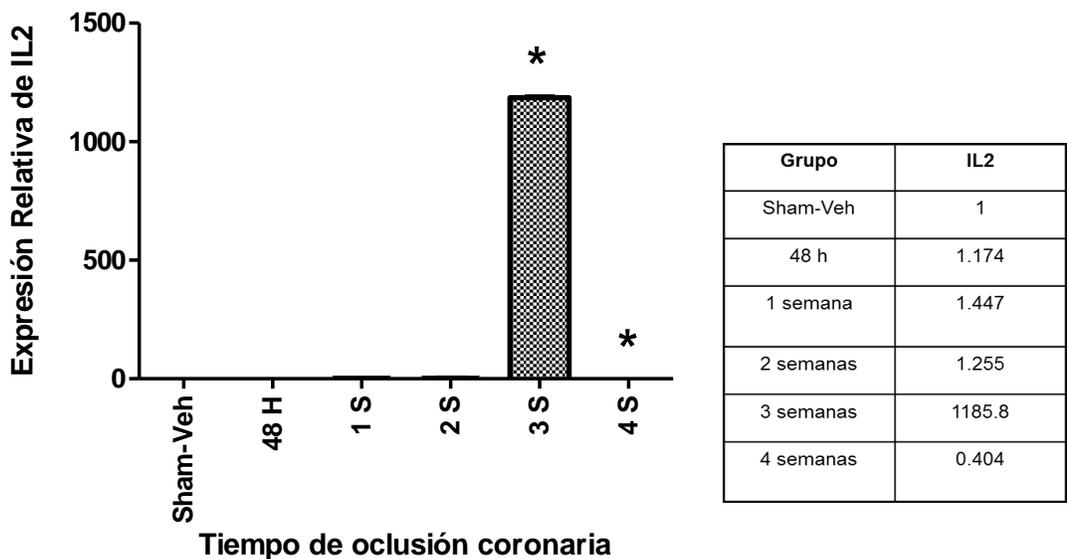
**Gráfica 2.** Curva de amplificación de IL-2 a 62 °C con kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x.

De igual manera se obtuvo una gráfica de disociación para corroborar la especificidad de amplificación con el kit y condiciones seleccionadas en la estandarización, la cual resulta de aumentar gradualmente la temperatura de la reacción en la que se consiguió la desnaturalización total del material genético, la cual nos permitió analizar la  $T_m$  de los fragmentos de material genético en función de su tamaño.



**Gráfica 3.** Curva de Disociación para IL-2 a 62 °C con kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x.

La cuantificación llevada a cabo fue relativa ya que no se utilizaron estándares con concentraciones determinadas y se midió la magnitud fisiológica de los niveles de expresión genética a través del tiempo de oclusión coronaria del gen en cuestión contra un control, en este caso fue el Sham-Veh, las cuales no necesitan de una unidad de medición específica para su interpretación de acuerdo a las ecuaciones establecidas para su obtención, como se muestra en la Grafica 4.



**Gráfica 4.** Cuantificación de la expresión relativa de IL-2 en rata Wistar macho a diferentes tiempos de IAM.

## 6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la actualidad se le comenzó a dar mayor seguimiento a la parte que involucra el sistema inmunológico con este padecimiento, con respecto al papel inflamatorio y antiinflamatorio, de los cuales han tenido bastante importancia ya que se ha demostrado que existe una cascada inflamatoria muy temprana y se está considerando como la piedra angular en este proceso, al igual que el proceso antiinflamatorio, ya que están involucrados proceso de cicatrización y regulación dentro del mismo, las cuales se pueden dividir en tres fases. [27]

De esta manera se decidió dar seguimiento por medio de RT-PCR a la expresión de citocinas como la IL-2 ya que esta reportado que conduce a una muerte rápida de las células cardíacas y a la inducción canónica de otras interleucinas proinflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , aunque también puede tener un papel regulatorio en este proceso patológico como la posible activación de Linfocitos T reguladoras (CD 4+; CD 25+). [28]

Se utilizaron 30 ratas Wistar con diferentes tiempos, los cuales fueron a las 48 hrs, 1,2,3 y 4 semanas de infarto, en el cual se utilizó una técnica oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, para realizar el seguimiento fisiopatológico de la expresión de IL-2 en el proceso inflamatorio y en tres fases que lo conforman.

Para llevar a cabo la cuantificación y darle seguimiento al papel fisiológico de esta citocina por RT-PCR en las tres etapas características a nivel inmunológico, se utilizaron muestras de corazón infartado por oclusión coronaria en rata Wistar de 48 h, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas, de acuerdo al tiempo ya documentado en cada etapa. [6]

De acuerdo con la cronología en la metodología para la amplificación y cuantificación de la expresión relativa de IL-2, se llevo a cabo la obtención de cDNA, en la cual se determinó principalmente la pureza mediante el cálculo del coeficiente 260/280, donde se obtuvieron coeficientes de pureza de 1.5 a 1.6 de

acuerdo con estos resultados se muestra un cDNA con posibles impurezas, ya que la relación es considerada pura si se encuentra dentro del rango 1.7 a 2.0. Estas impurezas pudieron originarse al momento de la extracción de RNA del tejido cardiaco debido a la complejidad proteica de este.

Por otra parte es importante llevar a cabo la estandarización de las condiciones requeridas para una correcta amplificación por RT-PCR, para medir la expresión relativa de mRNA de IL2 en el IAM de acuerdo a cada estadio, en la cual se utilizaron diferentes kits como Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x, Quantas, Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x y FastStart Universal SYBR Green Master (ROX).

Para ello se realizaron modificaciones en las cantidades, esto de acuerdo a las concentraciones obtenidas de cada uno de los primers y del cDNA sintetizado. De la misma manera se modificaron las condiciones de acuerdo a cada etapa de amplificación las cuales necesitan temperaturas específicas ya que cada fase comprende un paso importante para que se lleve a cabo la reacción, de tal manera que en la desnaturalización se necesitan temperaturas altas para romper los enlaces entre cada nucleótido, esto se llevó a cabo de acuerdo a un determinado tiempo, dado por la secuencia de los primers utilizados; en la amplificación se utilizaron condiciones de acuerdo a las temperaturas de fusión establecidas por cada primer, las cuales oscilaron entre 50 y 65 °C, realizándose un lampeo entre este intervalo de temperaturas para establecer la temperatura de fusión ( $T_m$ ) ideal, esto para que se llevara a cabo de forma adecuada la amplificación del producto por la Taq polimerasa, posterior a esta hibridación de las cadenas comienza la amplificación del producto por la Taq polimerasa a 72 °C, cuyo funcionamiento de la enzima es óptimo a esta temperatura, posteriormente se somete a otra etapa a diferentes condiciones, en la cual se establecen que tantos productos inespecíficos se formaron en la reacción, esta consta de una curva de fusión y otra etapa de enfriamiento por 45 ciclos, ya que establecer las condiciones de reacción es una parte importante para una correcta amplificación

del material genético deseado de acuerdo a las moléculas biológicas de interés y los primers utilizados para ello. [19]

Debido a la estandarización de condiciones de estos kit, se decidió utilizar el kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 10x, con una  $T_m$  de 64 °C ya que se obtuvo una buena amplificación con muy poca presencia de productos inespecíficos y con una cantidad considerable de producto de amplificación por las condiciones a las que se decidió establecer la reacción para IL-2 por RT-PCR.

Por lo tanto en la gráfica de amplificación (Grafica 2) se demuestra que la cantidad de producto de amplificación puede ser considerable ya que cuanto más producto inicial tenga la muestra se puede alcanzar con mayor anterioridad el valor de la Ct ya que el número de ciclos necesarios es menor y se puede considerar que la reacción es óptima, si la muestra se diluye 10 veces el valor de la Ct puede aumentar 3.3 ciclos, con esto se consideró este kit y las condiciones establecidas como ideales para la amplificación de la IL-2. [27]

Para corroborar la especificidad de la amplificación se obtuvo una curva de disociación, de esta manera se observa en la Grafica 3, que los productos disociados son específicos en cuanto a la hibridación, ya que todos los productos obtenidos se disocian a la misma temperatura. [32]

En el Infarto Agudo al Miocardio se requiere de una respuesta celular rápida y coordinada, en la cual el sistema inmunológico es muy importante ya que provoca un estado de alarma y reparación como resultado de señales emitidas por las diferentes células involucradas en el proceso, las cuales secretan diferentes moléculas ya sea de carácter inflamatorio, regulador o antiinflamatorio para comunicarse entre ellas y de esta manera se provocan tres fases, las cuales es importante darles un seguimiento fisiológico a través del papel que juegan las moléculas implicadas en dicho proceso.

Dado este proceso es importante el papel de una citocina como la IL-2, como se ha mencionado anteriormente; se han realizado estudios en los cuales se ha demostrado que tiene mayor participación en la regulación inflamatoria a través de

la diferenciación a linfocitos T reguladores, junto con un papel de remodelación después del daño provocado por la isquemia generando un mejoramiento de la angiogénesis y la función cardíaca. [21]

Por lo tanto en la Grafica 4 se observa la expresión relativa obtenida en cada uno de los tiempos establecidos. Dentro de las primeras 48 hrs después del IAM se registraron valores de expresión relativa de 1.174 con respecto a la muestra control (Sham-Veh), esto demuestra una mínima presencia de IL2, esto es característico al comienzo de la fase de inflamación por la inmunidad innata, ya que existe la liberación de DAMPS como HGMB-1, IL1 $\alpha$ , HSP, Acido hialurónico, ATP, Acido úrico, DNA mitocondrial, dsRNA y ssRNA, estos uniéndose a TLR 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 desatando la activación de cascadas de señalización como la vía NF $\kappa$ B y la de MAPK para la producción de IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  junto con quimiocinas en células locales como células cebadas y cardiomiocitos no necróticos para la quimioatracción de neutrófilos y algunos linfocitos T. Con todos estos sucesos presentes en esta etapa y con la llegada de Linfocitos T al tejido infartado puede existir una presentación antigénica temprana por parte de células dendríticas ya que se ha reportado la presencia de autoantígenos por parte del tejido dañado, dando como resultado esta ligera presencia de IL2, por medio de dichas cascadas de señalización que activan factores de transcripción como AP-1 o NF $\kappa$ -B generando la producción de esta citocina para la proliferación y diferenciación de estos Linfocitos T. [26]

En la determinación para 1 y 2 semanas del IAM se obtuvieron valores de expresión de 1.447 y 1.255, con esto se puede decir que continua la fase de inflamación, mostrando que en la primera semana y segunda semana existe una gran actividad metabólica inflamatoria por la mayor presencia de neutrófilos, monocitos, macrófagos clásicamente activados, los cuales, por medio de la fagocitosis remueven los restos celulares ocasionados por el daño provocado, al igual que se realiza la síntesis de moléculas como las Metaloproteinasas (MPPs), IL6 e IL8, pero comienza parte de la fase resolutive y de reparación, de tal manera

que aparecen niveles de expresión altos de IL-2 en la tercera semana, aumentando 1000 veces más en dicho tiempo de infarto. [24].

Consecuencia a estos niveles los linfocitos están altamente involucrados en los procesos y es muy importante la presencia de IL2, ya que continua la presentación antigénica por parte de los macrófagos y células dendríticas a Linfocitos T indicando un aumento de estas células en el tejido dañado, al igual que el incremento en la activación de los factores de transcripción involucrados en la síntesis de esta citocina, y de esta manera promueve la diferenciación de Linfocitos T a Linfocitos gamadelta, citotóxicos y Treg. [22, 23]

Dentro de este aumento considerable de síntesis de IL2 comienza la fase de resolución y reparación, la cual inicia con la diferenciación de linfocitos T a T reguladores, esto por la síntesis y aumento de IL2 llevada a cabo por estas células, para su autoestimulación, esta expansión celular se demostró por parte de Boyman et.al., ya que esta citocina es importante en la diferenciación de estas células para mantener la homeostasis y la tolerancia al daño por el IAM, al igual que se genera la diferenciación de los macrófagos a macrófagos alternativamente activados, los cuales se encargan de los procesos de regulación en la inflamación, esto con la producción de citocinas junto con la producción de colágeno para generar la cicatrización. [20]

De igual manera el incremento de la apoptosis de los neutrófilos y de cardiomiocitos, fagocitados por los monocitos, provoca la liberación de otras citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y de regulación como la IL-2, esto hace que incrementen la presencia de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , que induce la fibrosis por la presencia de miofibroblastos, por otro lado se ha demostrado que la IL-2 activa a las células NK para poder promover la angiogénesis, por medio de la unión a las integrinas 4b7 y VCAM-1, interrumpiendo la asociación N-cadherina asociada a la vía KLRG1. Cabe destacar que esta etapa se encuentra dentro de una posible isquemia crónica causada por una inflamación crónica que se puede dar después de haber transcurrido días o semanas de la fase de reparación, como consecuencia de una

resolución incompleta del daño, ocasionando una segunda etapa inflamatoria con infiltrado de linfocitos T y células dendríticas que indican la activación de factores transcripción para la síntesis de IL-2 y por lo tanto la presencia de esta citocina. [6]

Se observa que a la cuarta semana post-infarto hay un desenso en los niveles de IL2 con un valor de 0.404, esto quiere decir que existe una expresión muy baja, debido a que el proceso de reparación llegó a la etapa de maduración, esto quiere decir que la mayor parte del tejido dañado se encuentra cicatrizado, con ayuda de los factores de crecimiento, citocinas y producción de proteínas como el colágeno que participaron anteriormente.

Es importante señalar que la IL-2 está involucrada en las tres etapas del proceso, dado esto, se ha encontrado cierto interés clínico debido a que se puede utilizar como un posible biomarcador en la etapa final de la inflamación y principios de reparación de un IAM por su papel fisiológico a nivel inmunológico en este padecimiento, pero puede mostrar desviaciones de acuerdo a cada modelo animal utilizado o ya sea de persona a persona, ya que algunos procesos inmunológicos difieren entre especies, debido a ello el modelo murino es el más cercano filogenéticamente hablando con el humano y el más usado para llevar a cabo estas comparaciones e investigaciones. [27]

## **7 CONCLUSIONES**

Se obtuvo RNA de muestras infartadas en ratas Wistar de acuerdo a las condiciones del kit Pure Link RNA Mini Kit de Ambion para extracción de RNA con respecto a los tiempos establecidos de 48 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas de infarto.

Se lograron obtener concentraciones aceptables de cDNA, aunque con una pureza por debajo de los límites del coeficiente 260/280 por las características complejas del tejido infartado y la manipulación del mismo.

Se llevo a cabo la estandarización en las condiciones y concentraciones de los kits Quantas, Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x, Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x, FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) para la amplificación por RT-PCR seleccionando el Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x, lo que facilitará el trabajo posterior de esta técnica para la amplificación de otras proteínas.

Por primera vez, después de realizar un seguimiento temporal de la expresión de mRNA de IL-2, se encontró que la tercer semana postinfarto es un tiempo determinante para la generación del remodelamiento cardiaco pero igual se encuentra dentro del periodo de isquemia crónica con su consecuencia que es la insuficiencia cardiaca, en donde puede participar dicha interleucina por presencia de infiltrado de Linfocitos T.

## 8 REFERENCIAS

1. Aguilera, P. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología*, 17 0 -190.
2. Alreja, G. (2011). Renin and cardiovascular disease: Worn-out path, or new direction. *World Journal of Cardiology*, 72-83.
3. Battistoni, A. (2012). Circulating biomarkers with preventive, diagnostic and prognostic implications in cardiovascular disease. *Internation Journal of Cardiology*, 160-168.

4. Becari, C. (2011). Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 914-919.
5. Boateng, S., & Sanborn, T. (2007). Acute myocardial infarction. *Disease-a-Month*, 83-96.
6. Bouchentouf, M. (2011). Interleukin-2 enhances angiogenesis and preserves cardiac function following myocardial infarction. *Cytokine*, 732-738.
7. Braunwald, E. (2013). Heart Failure. *JACC*.
8. Burke, A., & Virmani, R. (2007). Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction. *Medical Clinics of North America*, 553-572.
9. Fyhrquist, F. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*, 224-236.
10. Gaggin, H. (2013). Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochimica et Biophysica acta*, 2442-2450.
11. Koch, M. (2009). Immunosuppression with an interleukin-2 fusion protein leads to improved LV. *International Immunopharmacology*, 207-212.
12. Kumar, R. (2007). The intracellular renin–angiotensin system: a new paradigm. *Trends in endocrinology and metabolism*, 208-214.
13. Meager, A. (2007). Interleukins. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 1-18.
14. Saxena, A. (2016). Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Translational Research*, 152-166.
15. Serrato, A. (2014). PCR: Reaccion en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología*, 54 - 70.

16. Spelman, S. (2015). Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nature Reviews Immunology* , 117-129.
17. Stoner, L. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*, 1353-1371.
18. Stuart, S. (2016). The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 114-122.
19. Tamay de Dios, L. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena (PCR) y de la PR en tiempo real. *Investigacion en discapacidad*, 70-77.
20. Boyman, O. (2006) "Selective stimulation of T cell subsets with antibody cytokine immune complexes," *Science*, 1924–1927.
21. Yang F, (2002). Myocardial infarction and cardiac remodeling in mice. *ExpPhysiol* 547–55.
22. Mehta, P. K. (2007).Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiology*, 292.
23. Dobaczewski, M. (2010).CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am. J. Pathol*, 2177–2187
24. Frantz S. (2009). Post-infarct remodeling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular Res*, 474–81.
25. Mann, D. (2010). Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell tolls. *Trans. Am. Clin. Climatol.Assoc*, 34–50.
26. Mezzaroma, E. (2011).The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc. NatlAcad. Sci*, 19725–19730.

27. Microbial. (Noviembre de 2009). *www.microbial-systems.com*. Recuperado el 6 de Febrero de 2017, de [http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia\\_interpretacion\\_resultados\\_SPAv2.pdf](http://www.microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf)
26. Burke, A., & Virmani, R. (2007). Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction. *Medical Clinics of North America*, 553-572.
27. Daskalopoulos, E. (2015). The role of inflammation in myocardial infarction. *inflammation in heart failure*, 105-116.
28. Jugdutt. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*, 1395-1903.
29. Koch, M. (2009). Immunosuppression with an interleukin-2 fusion protein leads to improved LV. *International Immunopharmacology*, 207-212.
30. Flores, S. (2016). *Biomarcadores en la insuficiencia cardiaca*. Mexico: Universidad Mexicana Autonoma de Mexico.
31. Fuentes, C. R. (2013). Panorama del iam con elevación del segmento st en México. *Rev Fed Arg Cardiol*, 168-169.
32. Pfaffl, M.W. 2004. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR S.A.Bustin, 87-120.
33. Perez, R. V. (2015). Enfermedad coronario no obstructiva y riesgo de infarto a miocardio. *Cardiología hoy 2015. Resumen anual de los avances en investigacion y cambios en la practica clinica*, 582.

## 9 ANEXOS

**Tabla 13.** Kit Quantas (Inserto).

REACTIVO	VOLUMEN (20 de Rxn $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN
Perfecta SYBR Green Fastmix for iQ (2x)	10 $\mu\text{L}$	1x
Fwd Primer	Variable	100-500 nM
Rvs Primer	variable	100-500 nM
H <sub>2</sub> O libre de nucleasa	variable	-----
cDNA	5-10 $\mu\text{L}$	Variable
<b>Volumen final</b>	20 $\mu\text{L}$	-----

**Tabla 14.** Condiciones Kit Quantas (inserto).

Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	
95	2-3 min
Amplificación	
95	10-15 s
60	30-60 s
Curva de fusión	
Opcional	de

acuerdo instrumental implementado	a -----
45 ciclos.	

**Tabla 15.** Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 10 x.

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
H <sub>2</sub> O grado PCR	X µL	-----
MgCl <sub>2</sub>	Y µL	25 mM
PCR primer mix	2 µL	0.2 a 1 µM
LightCycler DNA Master SYBR Green	2 µL	1x
cDNA	2 µL	2191 ng/µL
<b>Volumen total</b>	20 µL	-----

**Tabla 16.** Condiciones Kit Roche LightCycler DNA Master SYBR Green 1x (inserto).

Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	
95	30 s
95	0 s
Amplificación	
Dependiente de Primer	0-10 s
72	(Amplicon

	(bp)/25) s
<b>Curva de fusión</b>	
95	0 s
65	15 s
95	0 s
<b>Enfriamiento</b>	
40	30 s
45 ciclos.	

**Tabla 17.** Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x (inserto).

<b>REACTIVO</b>	<b>VOLUMEN</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
H <sub>2</sub> O GRADO PCR	3µL	-----
Primer mix	2 µL	10 x
Master mix 2x	10 µL	2 x
cDNA	5 µL	2191 ng/µL
<b>Volumen final</b>	18 µL	-----

**Tabla 18.** Condiciones para Kit Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master 2x (inserto).

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización</b>	
95	5 min

Amplificación	
95	10 s
Dependiente de Primer	5-20 s
72	5-30 s
Curva de fusión	
95	5 s
65	1 min
97	--
Enfriamiento	
40	10 s
45 ciclos.	

**Tabla 19.** FastStart Universal SYBR Green Master (ROX).

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	25 µL	1 x
Fwd Primer	0.5 µL	300 nM
Rvs Primer	0.5 µL	300 nM
H <sub>2</sub> O grado PCR	19 µL	-----
cDNA	5 µL	Variable
<b>Volumen final</b>	50 µL	-----

**Tabla 20.** Condiciones para Kit FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)  
(Inserto).

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización</b>	
+50	2 min
<b>Amplificación</b>	
+95	10 min
+95	15 s
Dependiente de Primer (58-60 °C)	30-60 s
<b>Curva de fusión</b>	
95	1 s
60	1 s
95	10 s
45 ciclos.	