



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“ACTIVIDAD DE NF- κ B DURANTE
EL DESARROLLO CARDIACO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M en C DESIDERIO SALOMÓN HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR(A) DE TESIS: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

MEXICO DF

MARZO DE 2006



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.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética y Toxicología Molecular del IIB-UNAM a cargo del Dr. Emilio Rojas del Castillo y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana a cargo del M en C Manuel Ramos Kuri

Agradezco a cada una de las personas que participaron con su ayuda en la realización de este trabajo, particularmente al Dr. Emilio Rojas del Castillo por darme su apoyo en todo momento como persona, tutor y amigo, a la Dra. Isabel García Pelaéz y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por formar parte de mi comité tutorial y los miembros del jurado por la minuciosa revisión de este escrito y sus valiosos comentarios.

Al Posgrado en Ciencias de la UNAM, al CONACyT y a la Escuela de Medicina de la UP cuyas contribuciones parciales financiaron este proyecto.

A mis amigos y compañeros Alfonso, Fernando, Manuel, Javier, Pablo, Mahara y Mariel

“ACTIVIDAD DE NF- κB DURANTE EL DESARROLLO CARDIACO”

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	
EL DESARROLLO DEL CORAZÓN	5
EL CORAZÓN Y LA APOPTOSIS	9
LA ACTIVACIÓN Y LA FUNCIÓN DE NF-κB	13
LOS INHIBIDORES DE NF-κB (IκBs)	15
EL NF-κB Y LOS CARDIOCITOS	18
EL NF-κB Y EL CORAZÓN	21
LA PARTICIPACIÓN DE NF-κB EN LA APOPTOSIS	22
EL PAPEL DE NF-κB Y LA PROTECCIÓN CONTRA LA APOPTOSIS EN CARDIOCITOS	23
EL CORAZÓN DE EMBRIÓN DE POLLO COMO MODELO PARA ESTUDIAR LA APOPTOSIS <i>IN VIVO</i> Y LA PARTICIPACIÓN DE NF-κB	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
HIPOTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
ARTÍCULO 1	28
ARTÍCULO 2	37
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFIA	72
APENDICE A	76

ACTIVIDAD DE NF- κ B DURANTE EL DESARROLLO CARDIACO

RESUMEN

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción dimérico que se encuentra en el citoplasma cuya actividad depende de un proceso de fosforilación de sus inhibidores los I κ Bs. A pesar de que su actividad ha sido asociada a mecanismos tanto apoptóticos como anti-apoptóticos, dependiendo del contexto celular; han sido más las evidencias que apoyan su papel como factor de protección contra la apoptosis. Sin embargo, se desconoce su participación como factor citoprotector en sistemas in vivo.

Aunque la presencia de apoptosis ha sido ampliamente estudiada en células y tejidos cardíacos, particularmente ha sido enfocado al estudio del tracto de salida (TS) del corazón durante el desarrollo de embrión de pollo, donde se requiere la eliminación espacio-temporal de cardiocitos, para poder formar las conexiones ventrículo-arteriales. Esta región del corazón es de suma importancia ya que más del 90% de las alteraciones cardíacas en niños se deben a defectos congénitos y de todas las enfermedades cardíacas congénitas, poco más del 30% tiene su origen en el TS.

En este trabajo investigamos si durante las etapas más críticas del desarrollo del tracto de salida, en el corazón de embrión de pollo, si NF- κ B está involucrado en procesos de protección contra la apoptosis y si es determinante en la morfogénesis durante el desarrollo normal del corazón. Para ello creamos un sistema reportero de expresión con sitios κ B unidos al cDNA de la proteína verde

fluorescente (GFP) en dos vectores de transferencia, uno plasmidico y otro adenoviral, que permitieron rastrear la actividad transcripcional de NF- κ B *in vivo*. Al mismo tiempo evitamos la fosforilación de un evento bioquímico asociado a la activación de NF- κ B al utilizar un inhibidor irreversible de I κ B α : BAY 11-7085 para bloquear su función y ver el efecto biológico que esto produce.

Los resultados del bloqueo de NF- κ B con el inhibidor farmacológico BAY 11-7085 muestran que al ser tratados con el BAY 11-7085, los corazones sufren serias alteraciones a nivel de tracto de salida. La fluorescencia aparece justo en la misma zona donde el inhibidor previamente causó las alteraciones cardiacas. Posteriormente, con análisis por TUNEL mostramos que los corazones alterados (a nivel del TS) por el inhibidor presentan un índice apoptótico mayor cuando se compara con los corazones normales, lo cual revela una función de protección contra la apoptosis de NF- κ B *in vivo*.

ABSTRACT:

NF- κ B is a dimeric transcription factor that exists in the cytosol. This complex is inhibited by I-kappa-B proteins, which inactivate NF- κ B by trapping it in the cytoplasm. Curiously NF- κ B has been found to be associated with anti-apoptotic as well as pro-apoptotic mechanisms. While NF- κ B is most commonly found to be cytoprotective there are a number of instances where it is pro-apoptotic depending on the inducing stimulus and the cell context. In case of *in vivo* remains unknown. Although, the presence of apoptosis or programmed cell death has been widely documented in developing cardiac tissues, particular studies in the chicken out flow tract (OFT) has been shown the the spatially and temporally regulated elimination of cardiocytes by apoptosis during the heart chicken development. The OFT zone is very important because, more than 90% of the heart ailments in children are due to known congenital defects and of all congenital heart defects, more than 30% are primary defects.

The aim of this work was investigated if NF- κ B plays an important cytoprotective role during apoptosis outflow tract (OFT), and that induces apoptosis during chicken heart morphology, for which we design a plasmid and an adenovirus vector that report the NF- κ B presence of the active form, although the GFP expression *in vivo*. Then we used BAY 11-7085 an irreversible inhibitor of I κ B α phosphorylation to inhibit NF- κ B activation and function.

The result of this study shown several congenital cardiac alterations at OFT level, when Bay 11-7085 was injected in the zone where the gene reporter was

expressed and we found, by TUNNEL assay; an increase of apoptosis rate, which suggest that, the activation of NF- κ B give rise to cytoprotective signals *in vivo* that prevent the development of cardiac alteration at OFT level.

EL DESARROLLO DEL CORAZON

Existen diferencias entre los diversos modelos de estudio del corazón, sin embargo los procesos y las moléculas durante la cardiogénesis son conservados.

Las principales diferencias parecen estar relacionadas al tiempo de expresión y los patrones de modulación de dichas moléculas conservadas (de la Cruz. 1997).

En el embrión de pollo la identificación de los progenitores cardiacos se da a partir de la gastrulación en la capa celular del epiblasto del tronco primitivo.

Los precursores cardiacos están localizados en ambos lados del nodo de亨特 (mesodermo anterior) esto ocurre durante las primeras 12 horas del desarrollo embrionario.

A partir de las 16 horas de incubación (estadio 3 de HH) es el período más importante para el desarrollo normal del corazón ya que en este momento se producen las señales que determinaran la direccionalidad de la migración celular desde las áreas precardiacas hasta el sitio final del corazón, así como también la diferenciación final a cardiocitos.

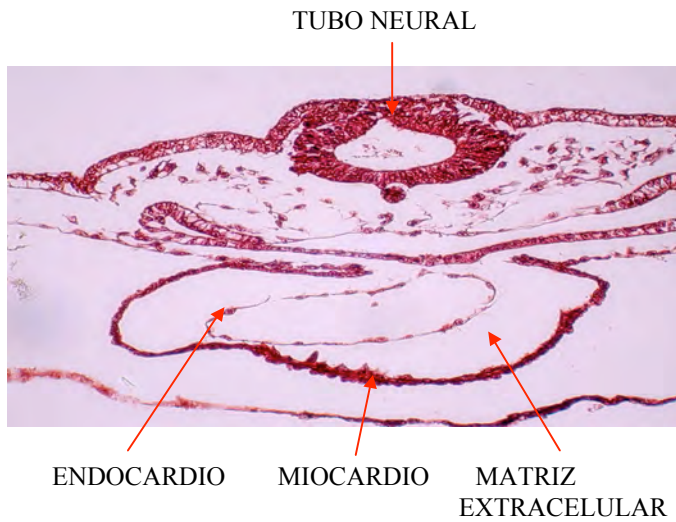
Posteriormente el desarrollo continúa formando un tubo primario y a las 33 horas del desarrollo (estadio 8-9 de HH) el corazón comienza a latir y a desarrollar su sistema de conducción.

Histológicamente, en el corazón, en etapas embrionarias tempranas cuando aparece como una estructura tubular, fácilmente se pueden distinguir dos tipos de células, una epitelial interna constituida por endocardio, una externa cubriendo el miocardio y ambas están separadas por una interfase de matriz extracelular conocida también como gelatina cardiaca (fig 1 A).

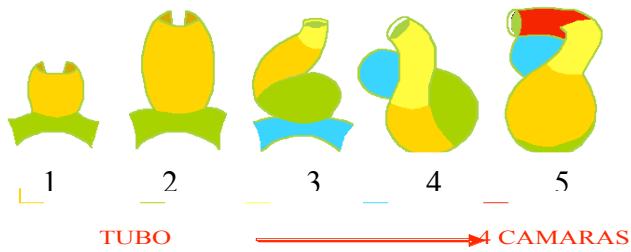
proceso de torsión del corazón en forma de tubo, lo podemos dividir en tres etapas: pre-asa, asa y post-asa (fig1 B). Durante estas etapas del desarrollo podemos ya de manera morfológica y funcional, distinguir 4 segmentos bien definidos 1.- atrios 2.- ventrículos 3.- canal atrio-ventricular y 4.-tracto de salida.

Durante los estadios 10-14 se comienza a dar la formación temprana del tracto de salida (cono-tronco) primero con la aparición del cono proximal y luego del 16-22 con la aparición de la porción distal, el tronco. La apoptosis en el tracto de salida es detectada a partir del estadio 19-34 alcanzando su máxima actividad entre el 27-30, se cree que el epicardio induce apoptosis en los cardiocitos tan pronto como entra en contacto con el miocardio. El epicardio se origina en el estadio 14-15 a partir del órgano pro-epicárdico formado por células mesoteliales (epitelio celómico) que se encuentran sobre la superficie del seno venoso y el septum transversal. El epicardio da origen, a las células mesenquimales de la capa sub-epicardica, al endotelio y células del músculo liso de las coronarias y a los fibroblastos perivasculares e inter-miocardiales. Durante el estadio 15 y 16 se lleva a cabo la septación ventricular y atrial, aparecen los cojines que darán origen a la formación de las válvulas en el canal atrioventricular y en el tracto de salida. El miocardio prolifera y hay trabeculación. Durante el estadio 27 se da la septación del tracto de salida y origina el tronco arterioso formado por la aorta y la pulmonar. En el estadio 36 comienzan a aparecer las fibras de Purkinje y el corazón esta constituido como órgano completamente funcional y diferenciado (Martinsen 2005)

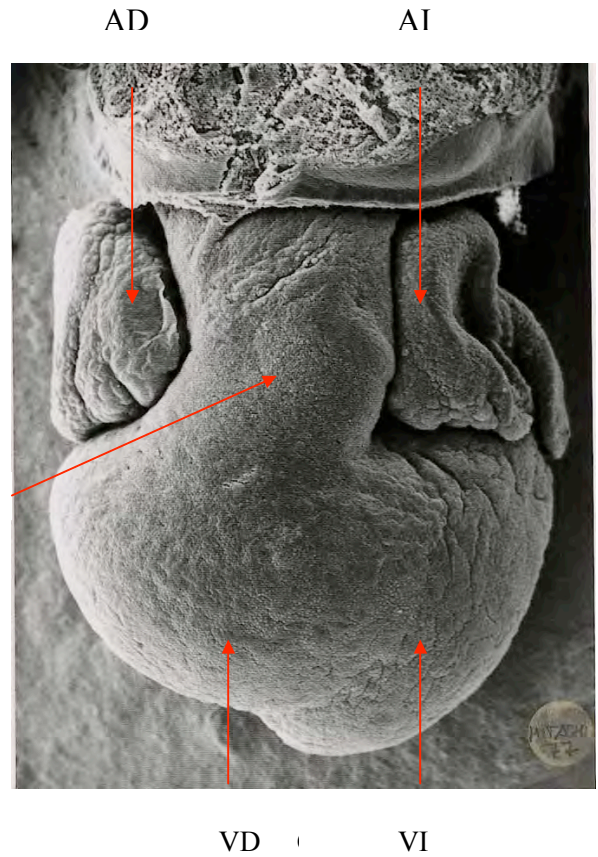
La conformación final del corazón, como órgano de cuatro cámaras con tracto de entrada y de salida ocurre por efecto de torsión a partir de la formación del tubo cardiaco (fig 1 C). Esta transformación se explica en términos de crecimiento diferencial y por procesos morfogénicos que se dan con el paso del tiempo. Indudablemente, estos procesos están controlados por mecanismos de activación que ponen en marcha diferentes programas genéticos, cuyo resultado es la aparición de zonas transcripcionales regionalizadas (Kelly et al 1999).



A)



B)



C)

Figura 1 Morfogénesis Cardíaca. Conformación final del corazón como órgano de cuatro cámaras a partir de un simple tubo. A) Corte transversal que muestra como la formación de corazón inicia como un simple tubo formado por dos capas, una interna, endocardio una externa miocardio y entre ambas de la matriz extracelular. B) El desarrollo del corazón embrionario se divide en tres etapas 1 y 2 pre-asa, 3 asa y 4 y 5 post-asa para finalmente quedar conformado como un órgano de cuatro cámaras C) AD (atrio derecho), AI (atrio izquierdo), TS (tracto de salida), VD (ventriculo derecho), VI (ventriculo Izquierdo).

EL CORAZÓN Y LA APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada no es un proceso limitado a una sola especie ya que a través del tiempo se ha podido identificar en todas especies de animales donde se ha buscado, presentándose en una diversidad de órganos. Uno de los procesos relevantes durante la remodelación del corazón es precisamente la apoptosis, que a diferencia de las patologías, durante el desarrollo se trata de un evento fisiológico altamente regulado en tiempo y espacio. Particularmente, el estudio de la apoptosis en el corazón se ha realizado utilizando los modelos de pollo, rata, ratón y humano, principalmente.

La historia de la apoptosis en corazón comienza formalmente en 1957 cuando Goerttler habla de la existencia de células necróticas, aunque ya en 1948 Hughes sugiere que ocurre muerte celular durante los procesos de remodelación en la parte dorsal de la aorta, en la involución de los ductos arteriosos y la formación del septum aortico pulmonar, en corazón de embrión de pollo. En 1965 Menkes y colaboradores descubren células muertas en el septum aortico-pulmonar. En 1967 Illies fue el primero en reportar la existencia de células degeneradas en el corazón embrionario humano y en 1969 reportó la presencia de muerte celular asociada a procesos de fagocitosis en el ventrículo de embrión de pollo. Pexieder y colaboradores han sido los que más han trabajado en caracterizar la muerte celular durante el desarrollo embrionario (1968-1975) concentrando sus esfuerzos en estudios sistemáticos de la localización ultra-estructural del fenómeno de muerte celular durante el desarrollo del corazón de embrión de pollo, lo que les permitió hacer estudios más extensos sobre el papel de la muerte celular en morfogénesis y teratogénesis del corazón. En 1973 Satow publica el primer

reporte de la presencia de apoptosis en corazón embrionario de rata, en este mismo año Ojeda y Hurley publican su primer artículo de la muerte celular en el endocardio del tubo cardíaco de embrionarios de pollo. En 1981 Satow y colaboradores reportan una serie de estudios comparativos sobre morfología y muerte celular fisiológica entre los modelos de rata y pollo. Los resultados revelaron que en el corazón embrionario de rata, la muerte celular en el septum del cono parece jugar un papel importante para la formación del tracto de salida del ventrículo derecho, lo mismo ocurre en el corazón de pollo pero con menor intensidad.

Hay que mencionar que lo anterior fue una recopilación de un libro publicado en 1981 por Thomas Pexieder cuando concepto de apoptosis como lo conocemos hoy en día, no existía. En todos estos estudios se uso el termino de muerte celular espontánea o fisiológica y en retrospectiva podemos darnos cuenta que se trataba de apoptosis. Para su detección se utilizaron criterios morfológicos por medio del análisis histológico. El término de apoptosis toma relevancia y se vuelve un concepto más común a finales de los 80s y principios de los 90s con estudios a nivel molecular.

Durante mucho tiempo los estudios de apoptosis en el corazón fueron meramente descriptivos ya que se podía encontrar esporádicamente en cualquier región, e incluso se llego a concluir que era un proceso importante en la remodelación. Sin embargo, esto no se pudo comprobar del todo debido a limitaciones técnicas que previeran de estudios más profundos. Esto hizo que existiera un abandono parcial en el estudio de la apoptosis en el corazón, y no fuera sino hasta 1998 cuando Watanabe y Fisher, Keyes en 2000 y Cheng en 2000 retomaran el estudio de la

apoptosis del corazón en pollo y rata, con la ayuda de nuevas técnicas en biología molecular. Ellos utilizan, genes reporteros acarreados en diferentes vectores virales, ensayos de TUNEL, Anexina V etc. Los resultados obtenidos con las técnicas moleculares traen nuevamente al centro de la discusión la importancia que tiene la apoptosis en el desarrollo del corazón, sobre todo en zonas que tienen que ver con el tracto de salida, donde se requiere de muerte celular para la formación de las conexiones ventrículo-arteriales (Watanabe et al 2001) o en la zona de los cojines endocárdicos que tienen que ver con la formación de las válvulas arteriales (Keyes y Sanders 2002)

Una de las zonas del corazón de embrión de pollo que sufre un marcado proceso de remodelación por apoptosis es la del tracto de salida, donde se alcanza su mayor actividad apoptótica durante los estadios 29-30 de Hamburger y Hamilton (HH) (Rothenberg et al, 2002, Cheng et al 2002), que corresponde aproximadamente a los 6 y 1/2 días de incubación. En esta etapa del desarrollo la apoptosis juega un papel importante para la conformación funcional final del tracto de salida ya que si se inhibe la formación de focos apoptóticos que ocurren normalmente durante el desarrollo de estas áreas, se provocan anomalías y alteraciones morfogénicas (Watanabe et al 2001). Cabe mencionar que poco más del 30% de las malformaciones congénitas en el corazón se debe a alteraciones del tracto de salida (Ferencz et al, 1985).

Los eventos apoptóticos pueden ser desencadenados por múltiples estímulos y actuar a través de dos vías diferentes, una extrínseca, mediada por receptores de muerte que estimulan la activación de caspasas y la otra intrínseca a nivel mitocondrial estimulando la liberación de citocromo C (Fig 2)

La ejecución del programa de muerte, activado durante la apoptosis puede suspenderse inactivando sus vías con el uso de inhibidores específicos, o a través de inhibidores de la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear κ B (NF- κ B, RelA/p50) que se transloca al núcleo para regular la actividad transcripcional de genes que poseen en su promotor secuencias consenso κ B, algunos de los genes que regula NF- κ B para bloquear la apoptosis codifican para las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis) y el gen Bcl-2 (fig 2)

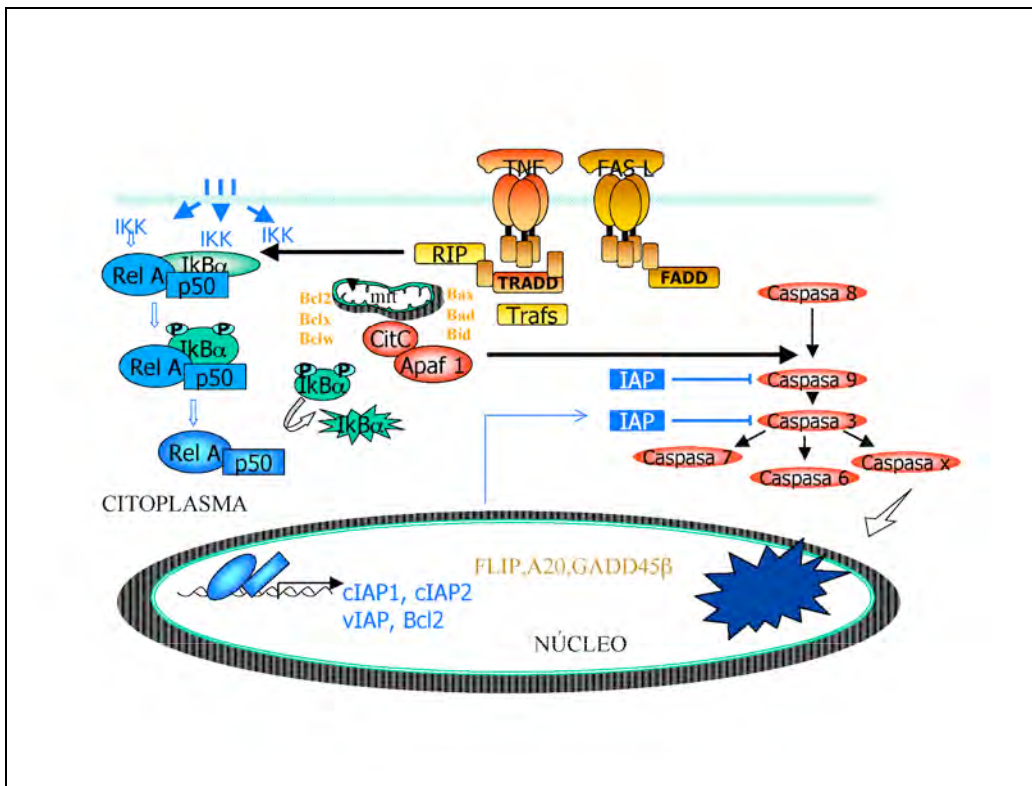


Figura 2. Posible mecanismo de protección contra la apoptosis en cardiocitos. Una vez que NF- κ B (RelA/p50) ingresa al núcleo puede activar genes cuyos productos bloquean el paso de la señal apoptótica de la vía mediada por receptores (extrínseca), como las IAPs que inactivan a las caspasa, o activar genes antiapoptóticos como Bcl-2 de la vía intrínseca, que impide la liberación del citocromo C de la mitocondria. Recientemente, se ha visto que también puede activar genes antiapoptóticos como FLIP, A20 Y GADD45 β .

LA ACTIVACIÓN Y LA FUNCIÓN DE NF- κ B

EL factor nuclear κ B (NF- κ B) fue el primer factor de transcripción específico identificado en linfocitos B. Su función en estas células es activar el gen de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas (Ig- κ B) por medio de la unión a una secuencia consenso formada por diez pares de bases (GGGACTTTCC) (Sen y Baltimore, 1986). Posteriormente, se encontró la existencia de motivos de unión, muy parecidos a la secuencia consenso en otros genes de células diferentes a los linfocitos, y que también son reconocidos y activados por NF- κ B, a estos sitios se les llamo “sitios κ B”. Esto vino a definir al factor nuclear κ B como un factor de transcripción ubicuo detectado de forma inactiva casi en todas las células (Baldwin, 1996), cuya actividad involucra la regulación de una amplia variedad de genes (Miyamoto y Verma, 1995).

NF- κ B es una proteína heterodimérica compuesta por diferentes combinaciones de miembros de la familia de factores de transcripción Rel. NF- κ B forma una familia de proteínas que incluye a p50 (NF- κ B 1), p52 (NF- κ B 2), p65 (Rel A), c-Rel y RelB. Los miembros de la familia NF- κ B han sido divididos en dos grupos: subunidades de clase 1 son aquellas que no poseen dominios de trans-activación (p50 y p52) y son producidos por sus percursores p100 y p105 respectivamente, subunidades de clase 2 que son aquellas que poseen el dominio trans-activador (Rel A, Rel B y c-rel) (fig 3).

Todos los miembros que constituyen esta familia se caracterizan por la presencia de un dominio común conservado llamado RHD (Rel Homology Domain). El dominio RHD tiene varias funciones: 1. a través de él, los miembros de esta familia se unen y forman homodímeros como p50/p50 o heterodímeros como p50/p65 o

p52/p65, las formas más comunes están constituidas por los heterodímeros (Baldwin, 1996, Ballard et al, 1992). 2. Les permite unirse al DNA, 3. Contiene la señal de localización nuclear y 4. Es el sitio de unión para los inhibidores: los IκB (Chen et al, 1999 y Ghosh, 1998).

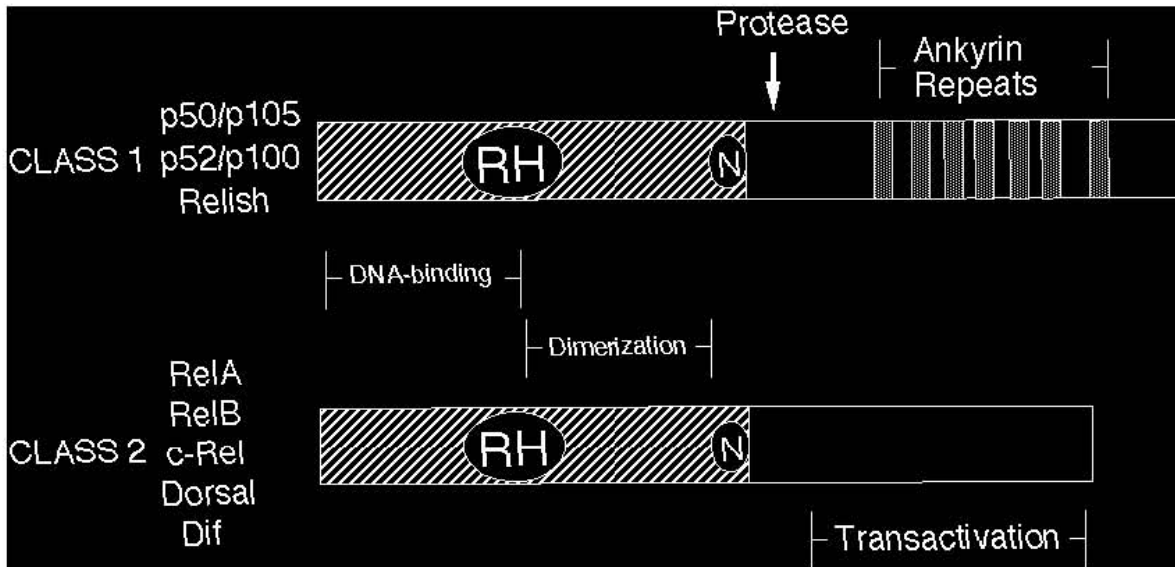


Figura 3. Clasificación de las proteínas del NF-κB.

La actividad del NF-κB depende de su localización celular. Los dímeros de NF-κB son secuestrados en el citoplasma de células no estimuladas vía interacciones no covalentes a través del dominio RHD, por una clase de proteínas llamadas IκBs, con las que forman un complejo trimérico inactivo. Las señales ambientales que activan NF-κB promueven la degradación del inhibidor IκB α a través de la fosforilación en sitios específicos y hace que el dímero del NF-κB sea liberado, de tal modo que se transloca al núcleo y ejerce su actividad biológica como factor de transcripción. (Tomado de Gilmore et al, 1996)

LOS INHIBIDORES DE NF-κB (IκBs)

Los I κ Bs originalmente fueron identificados como factores que inhiben la actividad de NF- κ B por interacción proteína-proteína por Baeuerle y Baltimore en 1988. Los I κ B constituyen una familia de al menos 7 miembros: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , p105, p100 y Bcl-3, los 7 están involucrados en el control de la activación de NF- κ B. (Baldwin 1996 ; Ballard et al 1992, Bours et al, 2000). Estas proteínas inhibitorias contienen motivos conservados de ankirina (6 o más repetidos con secuencias de 30-33 aa) por medio de los cuales interactúan con los dominios RH de NF- κ B. Poseen también un dominio regulador N-terminal que contienen los sitios de fosforilación y un dominio C-terminal que a su vez contiene un motivo PEST (fig 4). Los I κ B s se unen a los dímeros de NF- κ B y estéricamente bloquean la función de su señal de localización nuclear, lo que permite su retención en el citoplasma. Para que NF- κ B tenga acceso a su sitio de acción, el núcleo, el complejo NF κ B/I κ B debe ser disociado a través de la fosforilación de su inhibidor. Sin embargo, este proceso que en primera instancia parece sencillo, requiere la participación interactiva, también guiada por procesos de fosforilación, de proteínas citoplásmicas que se encuentran río arriba en la vía de activación de NF- κ B.

Los I κ Bs mejor estudiados son α y β , ambos se fosforilan en respuesta a diferentes estímulos en los residuos de serina: S32 y S36. Una vez que los I κ Bs se han fosforilado se da un proceso de ubiquitinación y de degradación en el proteosoma. Este mecanismo activa a NF- κ B, ya que se descubre la señal de localización nuclear y permite al dímero ser translocado al núcleo, cuando queda de forma libre está listo para unirse a promotores de genes con sitios de unión κ B

e iniciar la transcripción de los mismos (Barnes, 1997, Chen et al 1999, Ghosh 1998, Thurberg,1998).

COMPLEJO NFκB	MIEMBROS IκB	
p50/p65(RelA)	IκBα, IκBγ, p105, p100	
p52/P65	IκBα	
p50/Rel A	IκBα, IκBγ	
p50/Rel B	IκBα	
p65/p65	IκBα, IκBγ, p105	
Rel/Rel	IκBα, IκBγ, p105	
p50/p50	Bcl3, IκBγ, p105	
p52/p52	Bcl3, IκBγ	

Figura 4. Miembros que constituyen la familia de NF-κB y la familia de los IκBs. En la primera columna se muestran todas las posibles uniones de los diferentes miembros de NF-κB a través de su dominio RH que les permite formar diferentes complejos, heterodímeros (en rojo) u homodímeros (en azul).

La segunda columna muestra los inhibidores específicos para cada uno de los dímeros de NF-κB. En la tercera columna aparece la estructura general de las proteínas IκBs que se caracterizan por tener motivos formados por varios repetidos de ankirina, p105 y p100 son los precursores de las proteínas p50 y p52, respectivamente. Figura tomada de Miyamoto y Verma, 1995.

Un paso crucial en la activación de NFκB es la fosforilación de los IκBs que se lleva a cabo cuando los inhibidores son reclutados en el complejo IκB cinasa

(IKK). IκB cinasa es un complejo multimérico de 700-900 kDa (Chen et al 1996). El complejo está constituido por dos sub.-unidades catalíticas (IKK1/IKK α e IKK2/IKK β) (Mercurio et al 1997, Zandi et al 1997), por el modulador esencial de NF- κ B (NEMO) (Yamaoka et al, 1998) ó IKK γ , (Rothwarf et al, 1998, Karin, 1999) y por la proteína 1 asociada a IKK (Mercurio et al, 1999). Además puede utilizar alternativamente las sub-unidades IKK ϵ , IKKi (Peters et al, 2000) (Fig. 5). Para que el complejo IKK pueda funcionar requiere ser activado por la cinasa inductora de NF- κ B (NIK) y por MEKK1 de la familia de las MAP3K (Ling, et al 1998, Li et al, 1998) entre otras. Ver figura 5.

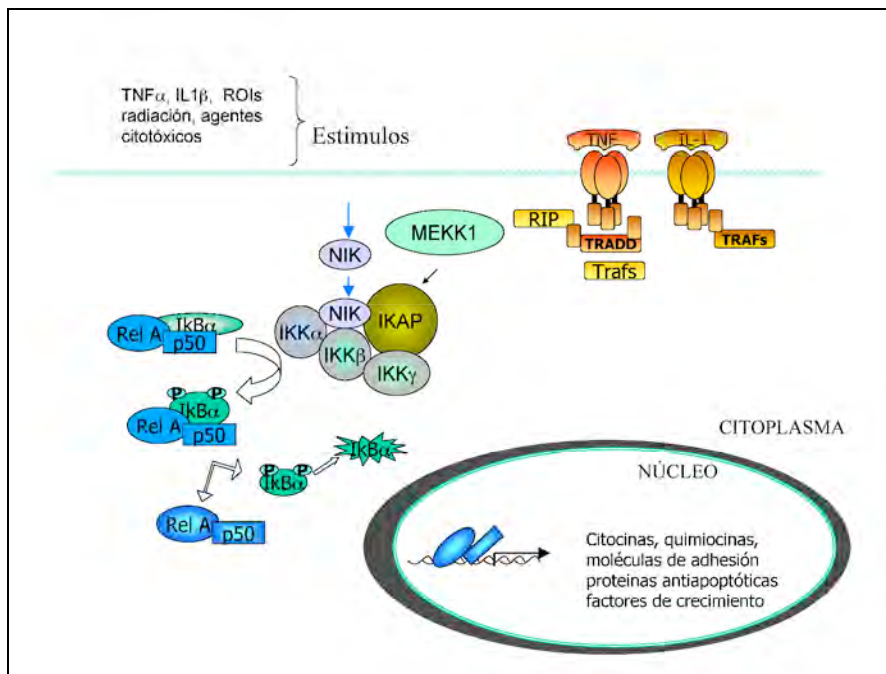


Figura 5. Activación de NF- κ B por TNF α o IL-1. Una vez que se lleva a cabo la interacción de la citocina con el receptor, proteínas cinasas adaptadoras intermediarias como NIK o MEKK1 y probablemente otras más, permiten la fosforilación de complejo multimérico IKK para que el inhibidor I κ B sea degradado rápidamente por el proteosoma.

Son numerosos los estímulos que causan la translocación de NF κ B al núcleo, estos incluyen la presencia de lipopolisacaridos (LPS), activadores de proteína cinasa C, radiación ultravioleta, virus, citocinas, estrés oxidativo entre otros (Baeuerle y Henkel 1994). Una vez dentro del núcleo NF- κ B activa genes como las interleucinas 2, 6 y 8, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), el interferón β , la enzima inducible oxido nítrico sintasa (iNOS), metaloproteasas, ciclo oxigenasa 2 y diversas moléculas de adhesión (ICAM1, VCAM1 y E-selectina), (Baeuerle y Henkel, 1994, Baldwin, 1996).

Células como leucocitos, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos y cardiocitos responden a citocinas pro inflamatorias por activación de NF- κ B (Baldwin, 1996). Adicionalmente, NF- κ B específicamente en corazón es de gran relevancia ya que ha sido involucrado en varias cardiopatías (ver artículo de revisión en el Apéndice A).

EL NF- κ B Y LOS CARDIOCITOS

Como ya se ha venido discutiendo, el movimiento de NF- κ B hacia el núcleo, es un requisito para la supervivencia de diversos tipos celulares ante determinados estímulos o señales de estrés. En el miocardio, los dos tipos de condiciones de estrés más comunes en el adulto son los que se relacionan con el estrés oxidativo y la sobrecarga. Recientemente, ha crecido en interés el estudio de las respuestas que generan en la célula tales condiciones, usando como modelo “in vitro” cultivos primarios de cardiocitos neonatos. Los avances apuntan en ambos casos hacia

una participación activa de NF- κ B en la supervivencia y el condicionamiento. Ver figura 1.

Un buen ejemplo de lo anterior es el caso de la cardiotrofina. Se sabe que ante la falta de oxigenación del miocardio (hipoxia), es necesario montar una respuesta que evite la activación del programa de muerte en los cardiocitos y que uno de los efectores de esta respuesta anti-apoptótica es una citocina liberada de forma autócrina llamada cardiotrofina 1. En el estudio de Craig y colaboradores (2001) realizado con cardiocitos de rata sometidos a hipoxia, se mostró que la señal anti-apoptótica mediada por la cardiotrofina requiere la translocación de NF- κ B. La cardiotrofina, al igual que otras citocinas de su tipo, transduce su señal a través del receptor común gp130 y puede activar a las vías de la ERK (extracellular regulated kinase), de la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) y de la proteína cinasa B o Akt de forma independiente. El uso de inhibidores específicos de cada una de las vías demostró que cada una de ellas es parcialmente responsable del incremento total en los niveles de NF- κ B en el núcleo de cardiocitos en cultivo. Este efecto sumado se ve disminuido al impedir la translocación de NF- κ B mediante el uso de una forma mutada de I κ B (impide la liberación del dímero de NF- κ B y permanece inactivo en el citoplasma) evidenciando la asociación de las tres vías con la respuesta protectora mediada por dicho factor.

El efecto protector de NF- κ B en los modelos in vitro, sin embargo, parece no restringirse a las señales positivas de supervivencia como en el caso de la cardiotrofina; también actúa como mediador de la respuesta anti-apoptótica en el

caso de señales típicamente pro-apoptóticas como el $\text{TNF}\alpha$. Por ejemplo, en cardiocitos ventriculares cultivados, el efecto apoptótico de $\text{TNF}\alpha$ más cicloheximida se ve aumentado por la presencia de una forma mutada de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Mustapha et al, 2000) o bien por el uso de un inhibidor de la actividad del proteasoma (Bergmann et al, 2001). En ninguno de los dos casos se conoce cuál es el mecanismo por el cual $\text{NF-}\kappa\text{B}$ promueve la supervivencia. La transcripción de algunos genes de supervivencia que contienen elementos de unión para $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en sus promotores es la idea más apoyada, sin embargo, se ha demostrado que la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, en cardiocitos, no modifica los niveles celulares de los candidatos más fuertes como las IAPs (inhibitor of Apoptosis Protein) 1 y 2 ni los de Bcl-2 o Bcl-xL (Bergmann et al, 2001). Esta evidencia no descarta del todo la posible participación de moléculas como Bcl-2 en el efecto protector, aunque es posible que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ no ejerza su efecto en un nivel río arriba, sino río abajo como sugieren los experimentos del grupo de Kirshenbaum en los que se ha observado que la transfección de Bcl-2 disminuye los niveles de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y en consecuencia favorece un incremento de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en el núcleo (de Moissac et al, 1999).

La otra condición relevante en donde se ha observado la participación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es en la hipertrofia cardiaca inducida por estímulos de hipertrofia endógenos como la angiotensina II, la fenilefrina y la endotelina 1. Se ha demostrado que estos agonistas provocan una estimulación de la actividad de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ que depende de la degradación de las proteínas $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y la activación del complejo IKK. Tal activación es necesaria para la producción de dos de los principales marcadores del fenotipo hipertrófico que son la producción del factor natriurético atrial y el incremento en el

tamaño de los cardiocitos. Y de hecho, la sola sobre-expresión de las sub-unidades p65 o c-Rel provoca por sí misma un incremento en el tamaño celular (Purcell et al, 2001).

Es importante destacar que la inducción de la hipertrofia también puede ocurrir por estimulación con $TNF\alpha$ en cardiocitos aislados y está mediada por la activación de NF- κ B a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Higuchi et al, 2002).

Tratar de extrapolar el papel que desempeña NF- κ B in vitro a lo que ocurre in vivo resulta muy complicado, aunque no se descarta del todo, porque el resultado ya no se limita a lo que está ocurriendo en el cardiocito como una célula individual, el resultado es a nivel global en el corazón como órgano en su conjunto y como tal involucra otros tejidos cardiacos.

EL NF- κ B Y EL CORAZÓN

NF- κ B parece jugar un papel clave en algunas patologías cardiacas como son: daño por isquemia-reperfusión, infarto congestivo cardiaco, síndromes coronarios agudos, rechazo de transplante, angina de pecho, hipertrofia y aterosclerosis (Valen et al 2001). En algunas de ellas parece jugar un papel protector mientras que en otras parece causar daño severo al corazón. Sin embargo, se desconoce si está presente durante el desarrollo embrionario cardiaco y si tiene alguna importancia para la cardiogénesis.

LA PARTICIPACIÓN DE NF- κ B EN LA APOPTOSIS

Como hemos visto NF- κ B es un factor de transcripción que regula una amplia gama de genes, principalmente genes de la respuesta inflamatoria, pero también ha sido implicado en la iniciación y la progresión de varias enfermedades como cáncer, artritis autoinmune, glomerulonefritis, asma, fibrosis pulmonar, choque séptico, sida y enfermedades cardiovasculares (Barnes et al 1997, Chen et al 1999, Ghosh et al 1998). NF- κ B es un factor de transcripción peculiar, cuya función biológica en relación con la apoptosis va a depender del modelo con el que se esté trabajando ya que en algunos actúa promoviendo la apoptosis, y en otros, en la mayoría actúa evitándola. Sin lugar a dudas para nosotros en este trabajo NF- κ B tendría una participación destacada en la protección contra la apoptosis; éstos son algunos ejemplos de ello, donde participa como agente citoprotector. Las células carentes de NF- κ B son más sensibles a las señales pro-apoptóticas que aquellas que lo expresan normalmente (Barkett y Gilmore, 1999); células embrionarias de hígado carentes de rel A (p65) son susceptibles a apoptosis masiva (Tanaka et al 1999; Beg et al, 1995); el TNF dispara la apoptosis en macrófagos y fibroblastos de ratón carentes de NF- κ B (Beg y Baltimore 1996); la inducción de la apoptosis en células de hepatoma de rata esta asociada a un decremento de NF- κ B (Marianneau et al 1997); en células de cáncer de pulmón, colón y de ovario la activación de NF- κ B determina la sensibilidad de TNF a la apoptosis (Mayo y Baldwin 2000); NF- κ B protege de la apoptosis a hepatocitos, y células embrionarias (Bellas et al 1997); y finalmente, en

fibroblastos y células de bazo de pollo NF- κ B suprime la apoptosis inducida por la caspasa 1 a través de XIAP1 (Van den Hoff et al 2000).

EL PAPEL DE NF- κ B Y LA PROTECCIÓN CONTRA LA APOPTOSIS EN CARDIOCITOS

Son tres las evidencias que apoyan la idea de que NF- κ B juega un papel fundamental en la protección contra la apoptosis en cardiocitos *in vitro*.

1. La activación de NF- κ B es crucial para suprimir la muerte celular programada inducida por TNF α en cardiocitos embrionarios *in vitro* (de Moissac et al, 1998).
2. La disminución de los niveles de I κ B α en cardiocitos ventriculares que expresan BCL-2 los protege contra la apoptosis (Mustapha et al 2000).
3. La función antiapoptótica de BCL-2 se ve afectada en células donde no se puede activar NF- κ B (Bergmann et al 2001).

EL CORAZÓN DE EMBRIÓN DE POLLO COMO MODELO PARA ESTUDIAR LA APOPTOSIS *IN VIVO* Y LA PARTICIPACIÓN DE NF- κ B

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados una de las primeras estructuras en aparecer es el corazón cuyo desarrollo es muy parecido en todas las especies de este grupo.

Uno de los modelos mejor caracterizados para llevar a cabo estudios sobre el desarrollo cardiaco es el embrión de pollo, porque se conoce con gran detalle su descripción, gracias a los estudios realizados ya desde 1951 por Hamburger y

Hamilton y a una amplia revisión de la apoptosis a través de todas las etapas del desarrollo cardiaco (Martinsen 2005).

El modelo de embrión de pollo ofrece grandes ventajas para realizar estudios sobre desarrollo cardiaco por diversas razones. La primera y quizá la más importante, por su fácil abordaje ya que a diferencia de los mamíferos, no está en el interior del útero lo que permite realizar experimentos in vivo con un mínimo de invasión sin alterar su micro-ambiente, lo cual es de suma importancia en los estudios de normalidad. Adicionalmente, su manejo y manipulación es relativamente simple, mientras que su costo es significativamente bajo lo que permite incluir un número de muestras lo suficientemente grande por experimento lo que se traduce en un número también grande de individuos para ser analizados estadísticamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por procesos de remodelación el corazón adquiere su conformación funcional final como un órgano de cuatro cámaras, con tracto de entrada y salida. Uno de los procesos fisiológicos y morfológicos importantes durante su remodelación es la apoptosis, siendo la del tracto de salida una de las zonas del corazón que mayormente sufre procesos de remodelación por apoptosis, su mayor actividad apoptótica se da durante los estadios 28-30 de HH del desarrollo embrionario, pudiéndose observar focos apoptóticos en esta región cardiaca (Cheng et al 2002)

Después de conocer que el tracto de salida es una de las zonas importantes del corazón donde se lleva a cabo la apoptosis la pregunta sigue siendo, ¿como se

Hamilton y a una amplia revisión de la apoptosis a través de todas las etapas del desarrollo cardiaco (Martinsen 2005).

El modelo de embrión de pollo ofrece grandes ventajas para realizar estudios sobre desarrollo cardiaco por diversas razones. La primera y quizá la más importante, por su fácil abordaje ya que a diferencia de los mamíferos, no está en el interior del útero lo que permite realizar experimentos in vivo con un mínimo de invasión sin alterar su micro-ambiente, lo cual es de suma importancia en los estudios de normalidad. Adicionalmente, su manejo y manipulación es relativamente simple, mientras que su costo es significativamente bajo lo que permite incluir un número de muestras lo suficientemente grande por experimento lo que se traduce en un número también grande de individuos para ser analizados estadísticamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por procesos de remodelación el corazón adquiere su conformación funcional final como un órgano de cuatro cámaras, con tracto de entrada y salida. Uno de los procesos fisiológicos y morfológicos importantes durante su remodelación es la apoptosis, siendo la del tracto de salida una de las zonas del corazón que mayormente sufre procesos de remodelación por apoptosis, su mayor actividad apoptótica se da durante los estadios 28-30 de HH del desarrollo embrionario, pudiéndose observar focos apoptóticos en esta región cardiaca (Cheng et al 2002)

Después de conocer que el tracto de salida es una de las zonas importantes del corazón donde se lleva a cabo la apoptosis la pregunta sigue siendo, ¿como se

inicia la apoptosis y cuales son los mecanismos moleculares que la regulan? Sin embargo, preguntas interesantes son ¿como dentro de una misma zona podemos encontrar al mismo tiempo focos apoptóticos y cardiocitos adyacentes resistentes a estas señales de muerte?, ¿Cuales son esas señales intracelulares que les permiten sobrevivir? ¿Que factores de transcripción toman ese papel activo en este proceso?, las cuales se plantean como objetivos primordiales del presente proyecto.

Por otra parte durante la cardiogénesis se desconoce el momento de aparición del factor de transcripción NF- κ B, tampoco se sabe si su papel es relevante durante la apoptosis del corazón en desarrollo. Nosotros proponemos que este factor de transcripción juega un papel activo en la protección contra la apoptosis en el tracto de salida del corazón de embrión de pollo, por lo tanto, las células que no se mueren en la periferia a las zonas apoptóticas, o cardiocitos adyacentes a los focos apoptóticos son células que están expresando NF- κ B y se protegen de la apoptosis.

HIPÓTESIS

NF- κ B es un factor de transcripción ubicuo y sus niveles de activación se ven aumentados solo en los cardiocitos adyacentes a los focos apoptóticos generando citoprotección en la zona del tracto de salida del corazón de embrión de pollo en estadios 28-30 de HH.

OBJETIVO GENERAL

Localizar zonas de actividad transcripcional para NF- κ B en el tracto de salida de corazones de embrión de pollo de estadios 22-30 de HH y determinar su posible participación previniendo procesos de apoptosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar un sistema reportero de expresión con sitios κ B unidos al cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP) en dos vectores de transferencia, uno plasmídico y otro adenoviral, que permita rastrear la actividad transcripcional de NF- κ B *in vivo*.
2. Localizar zonas apoptóticas y zonas de actividad de NF- κ B (citoprotectas) en los cardiocitos adyacentes a los focos apoptóticos del tracto de salida.
3. Inhibir farmacológicamente la función y la expresión de NF- κ B *in vivo* con Bay 11-7085.

La descripción de materiales y método y resultados, se presentan en los artículos 1 y 2 que se anexan en el siguiente apartado, después de ellos se da una discusión de manera global al trabajo y se añade una conclusión. Cabe mencionar que además se incluye en el apéndice A una revisión sobre el papel del factor de transcripción NF- κ B en la célula cardíaca, el cual es un refuerzo al marco teórico que sustenta el presente proyecto.

CORRECCION ARTÍCULO 1: La figura 4 del artículo (corazones alterados) corresponde a la gráfica de barras y la foto de los corazones alterados es en realidad la figura 5. Los pies de figura quedarían de la siguiente manera.

Figure 4. Dose-dependent effects of Bay 11-7085 on incidence of heart alterations. (A) Injection of vehicle alone produced no external or internal effects on the morphological structure of a chick embryo heart. Panels (B-F) show different kind of alteration in chicken embryo hearts injected with Bay 11-7085. Alterations were mainly seen at the outflow tract (OFT) and it are showed with arrows, including IVC (B), great arteries (C), brachiocephalic truncus absence (D), brachyocephalic truncus absence (E1), DORV (E2), IVC (E3), subvalvular stenosis (F1) myocardial right ventricle thickness (F2).

Figure 5. Morphological alterations induced by inactivation of NF- κ B by the specific inhibitor Bay 11-7085. A) Embryo hearts injected with Vehicle 1 (PBS + 8% DMSO) or 2 (PBS + 12% DMSO); B) embryo hearts injected with Bay 11-7085. Dark bars represent the percentage of hearts with some morphological alteration; white bars show the percentage of normal hearts..

NF- κ B signaling blockade by Bay 11-7085 during early cardiac morphogenesis induces alterations of the outflow tract in chicken heart

S. Hernández-Gutiérrez · I. García-Peláez ·
A. Zentella-Dehesa · M. Ramos-Kuri ·
P. Hernández-Franco · F. Hernández-Sánchez · E. Rojas

Published online: xxx
© Springer Science + Business Media, LLC 2006

Abstract Nuclear factor κ B (NF- κ B) is a pleiotropic transcription factor implicated in the regulation of diverse morphologic cardiac alterations, for which the p50 and p65 subunits form the most prevalent dimeric form in the heart. NF- κ B is inactivated by proteins of the I κ B family, which trap it in the cytoplasm. It is not known whether NF- κ B influences cardiac development. *Objective:* Here we investigated the role of NF- κ B in regulating transcription in chicken heart morphogenesis. Specifically, we tested whether NF- κ B activation is required for normal formation of the outflow tract (OFT) during a critical stage of heart development. *Methods and results:* We designed a reporter vector with κ B binding sites for Rel family members in the promoter, upstream from the cDNA of Green Fluorescent Protein (GFP). This construct was injected directly into the developing heart of chicken embryos. NF- κ B activation was subsequently inhibited by administration of the specific pharmacological agent Bay 11-7085. We found that forced NF- κ B expression

was associated with multiple congenital cardiac alterations of the OFT (mainly CIV, DORV and great arteries stenosis). *Conclusion:* These findings indicate that blockade of NF- κ B induces apoptosis and is an important factor in the development of OFT during cardiogenesis. However, it remains unknown which members of the Rel family are relevant in this process.

Keywords NF- κ B · Bay11-7085 · Chick heart development · Green Fluorescent Protein · Cardiac alterations

Introduction

Nuclear factor κ B (NF- κ B) is a pleiotropic transcription factor involved in the regulation of several biological phenomena such as apoptosis, cell survival and growth, mitosis, differentiation and immune response, as well as cellular response to oxidative stress, hypoxia and ischemia in different organs and tissues. In the heart, NF- κ B has been implicated in several pathologies, such as ischemic and reperfusion injury [1], congestive heart failure [2], transplant rejection, [3] angina pectoris [4], dilated cardiopathy [5], and atherosclerosis [6]. NF- κ B also appears to be involved in congenital diseases such as Fallot's tetralogy, defects in the ventricular septum and pulmonary artery problems [7, 8]. Furthermore, NF- κ B has been shown to cause *in vitro* cardiomyocyte hypertrophy [9].

Involvement of NF- κ B in heart physiology regulation is complex. In addition to being activated by the canonic pathway mediated by cytokines, NF- κ B is also activated by several signal transduction cascades associated with the development of hypertrophy and of response to oxidative

S. Hernández-Gutiérrez · A. Zentella-Dehesa · E. Rojas (✉)
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM, México D.F. 04510
e-mail: emilior@servidor.unam.mx

S. Hernández-Gutiérrez · M. Ramos-Kuri · P. Hernández-Franco ·
F. Hernández-Sánchez
Escuela de Medicina, Laboratorio de Biología Molecular
Universidad, Panamericana

I. García-Peláez
Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y
Tisular, UNAM

A. Zentella-Dehesa · F. Hernández-Sánchez
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición "Salvador Subirán"

stress [10], as well as by pro-apoptotic and anti-apoptotic signals [11]. Moreover, inhibition of NF- κ B by I κ B α has been shown to result in some cardiac pathologies after an insult of using transgenic mice [12–16].

Many postnatal heart diseases are often associated with pre-existing congenital alterations in prenatal heart development. Such congenital heart defects are relatively common; indeed among pediatric patients they are found twice as frequently as cancer [17]. More than 90% of the heart ailments in children are due to known congenital defects and of all congenital heart defects, more than 30% are primary defects of the outflow tract (OFT) [18] (conus and truncus arteriosus), which is the origination of the ventricular infundibulum (outlet ventricles) and the great arteries. The role of NF- κ B has been determined in several heart pathologies and its presence during some stages of cardiac development has been shown. Nevertheless, its participation in the regulation of heart morphogenesis and its involvement in congenital cardiopathies, remain unknown. Therefore the present work investigated if NF- κ B is a key factor in chicken heart morphogenesis. For this purpose the pharmacological agent Bay 11-7085, an IKK inhibitor, was employed to prevent NF- κ B translocation to the nucleus where it exerts its biological activity.

Materials and methods

Experiments were conducted in chicken (*Gallus gallus*) embryos of the White Leghorn strain from ALPES SA de CV (Mexico). Fertilized chicken embryos were incubated at 37.5°C and 86–87% humidity in a forced-draft incubator between stages 23–25 as defined by Hamburger and Hamilton (HH) [19].

Constructions generation of pNF- κ B -GFP reporter plasmid

We generated a NF- κ B reporter vector with green fluorescent protein (GFP-cDNA). The promoter region of this reporter vector contained the minimal TK elements and four consensus binding sites for the transcription factor NF- κ B joined to GFP cDNA. Primers were designed to include HindIII and XbaI restriction sites (forward 5'/aagcttccaatggtagcaagggcgag3' and reverse 5'/ctagattactgtacagctgctcatgccgag 3') (Fig. 2(A)). The GFP cDNA of the pEGFP-C1 plasmid was amplified by PCR. The 744 bp amplified fragment was subcloned using the same HindIII and XbaI restriction sites, and the skeleton of the pNF- κ B-Luc plasmid (both plasmids from Clontech) and the new reporter vector pNF- κ B-GFP were generated. The presence of NF- κ B binding sites was verified by restric-

tion enzyme digestion and automated sequencing, and it was tested in cardiomyocytes isolates.

Generation of adenovirus recombinant

The plasmids to generate a recombinant replication-defective adenovirus were a gift from Dr. Vogelstein from Howar Huges Institute, and the construction were made following the methodology described in [20, 21]. The overall strategy developed is diagrammed in Fig. 2 and involved three steps. First, the fragment with NF- κ B sites and GFP from pNF- κ B-GFP was cloned into a pshuttle vector. Second, the resultant construction was cleaved with pmeI to linearize it and transformed together with a supercoiled adenoviral vector pAdEasy into *E. coli* strain BJ5183. Recombinants were selected with kanamycin and screened by restriction endonuclease digestion and automated sequencing. Third the recombinant adenoviral plasmid construct is cleaved with pacI and transfected into packing cells (293 cell line), and after 5–7 days we obtained the adenoviral infective recombinant particles.

Cells and virus

293 cells were kept in cell culture dishes (Falcon 10 × 10 mm) or six plates dishes for virus titration; with DMEM (Invitrogen, USA) supplemented with 10% neonate bovine serum (Hi-clone, USA) and antibiotics (100 mg/ml streptomycine and 100 U/ml penicillin) (Invitrogen, USA), incubated at 37°C, 5% CO₂ and 100% humidity atmosphere. The selection of recombinant adenovirus strain was amplified in a cellular reactor and its titration as described [21] and we obtained an adenoviral concentration of 2 × 10⁸ pfus/ml.

In vitro expression assay

To detect transcriptionally active forms of NF- κ B, 20 chicken embryos at HH stages [23–25] (4 to 5 days incubation) were dissected under stereoscopic microscope (Zeiss, AxioStar plus). The OFT was separated from the ventricles and placed in Eppendorf tubes with phosphate buffered saline solution (PBS) at 4°C. Cardiocytes were dispersed to generate primary cultures following the Eschenhagen [22] method with modifications. Hearts were washed twice with PBS and once with 0.25% trypsin and 0.1% EDTA (Gibco, USA). Subsequently, they were digested with trypsin/EDTA for 5 min at 37°C while being shaken gently. The digested samples were centrifuged. The resultant supernatant was discarded and the pellet was subjected to 3 digestion and incubation cycles with 0.1% collagenase in PBS for 5 min, until the tissue was completely digested. To the last incubation cycle, 1 U DNase/ml (Gibco, USA) was added. Isolated cells

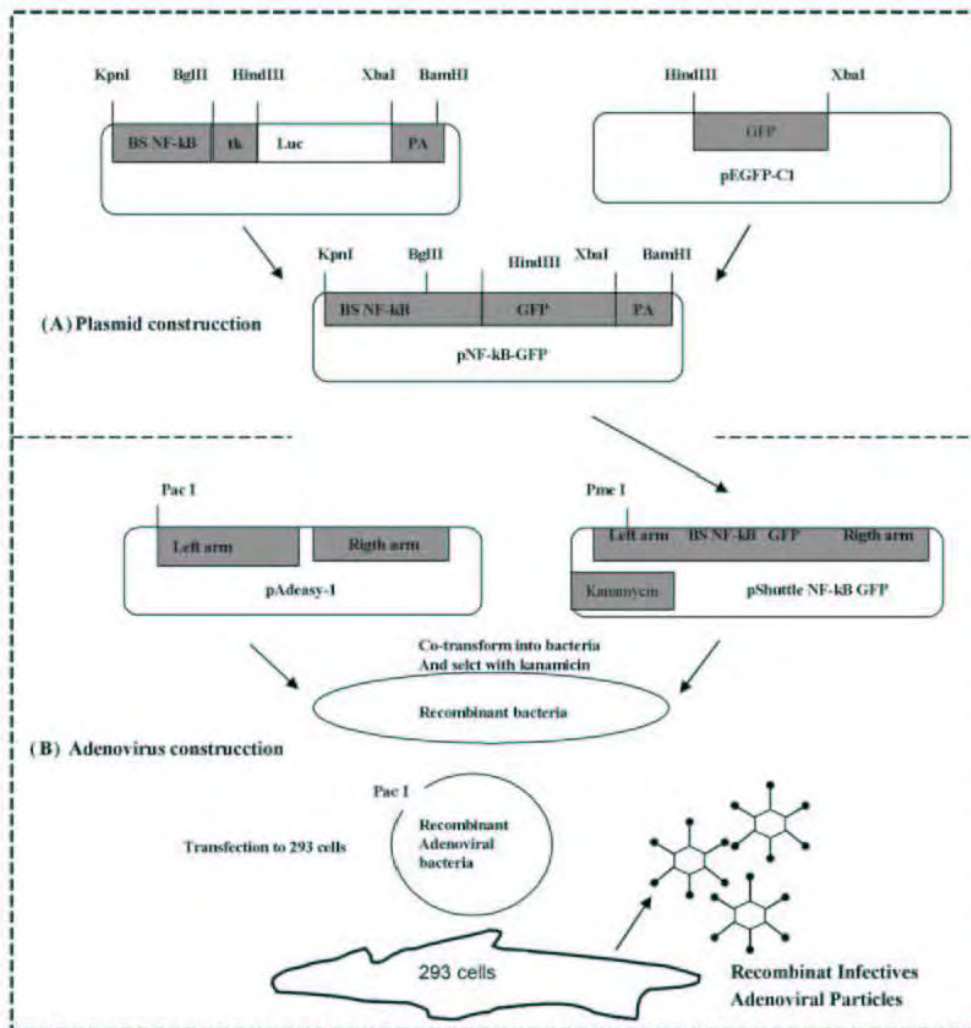
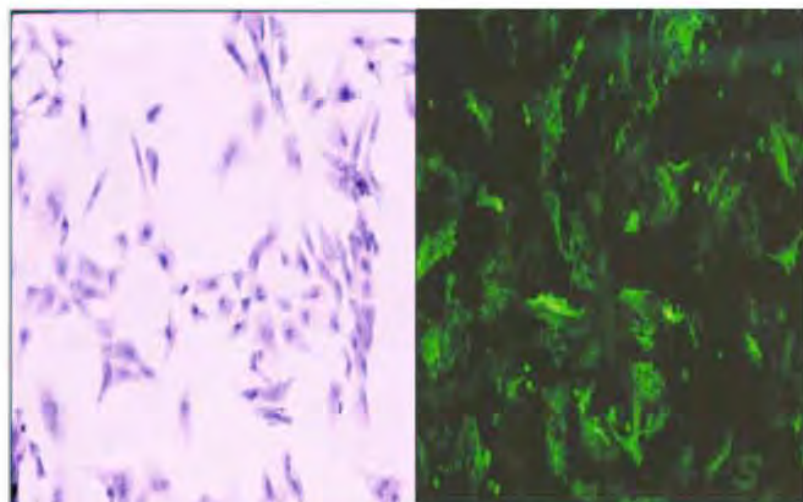


Fig. 1 Diagram of strategy designed for construction of the NF- κ B-GFP reporter vectors. (A) In a first step we constructed a plasmid with the NF- κ B binding sites joined to GFP cDNA. (B) In a second step we used

a system to generate a recombinant adenovirus, for which the plasmid constructed in panel A was used (for details check methodology)

Fig. 2 Reporter plasmid expression in isolated cardiocytes from primary cultures of chicken embryo heart. To verify the function of the pNF- κ B-GFP construct, isolated cardiocytes were transfected with the plasmid and left in serum-free medium for 24 h. NF- κ B activity was induced by TNF treatment. (A) non-stimulated cardiocytes. (B) GFP expression in response to TNF-mediated NF- κ B activation



150 were kept in cell culture dishes (Falcon 35 × 10 mm) with
 151 DMEM (Invitrogen, USA) supplemented with 5% neonate
 152 bovine serum (Hi-clone, USA) and antibiotics (100 mg/ml
 153 streptomycin and 100 U/ml penicillin) (Invitrogen, USA),
 154 incubated at 37°C, 5% CO₂ and 100% humidity atmosphere.
 155 Isolated cardiocytes were transfected with 2 μg of the pNF-
 156 κB-GFP plasmid with FUGENE (Roche Diagnostics, USA)
 157 following the manufacturer's instructions, or an infection
 158 with 100 moi of adenovirus particles alone or adenovirus
 159 plus bay 11-7085 (1.2 mM).

160 NF-κB induction experiments in cardiocytes were per-
 161 formed according to Bergmann's method [23]. Briefly, cells
 162 were stimulated for 24 h with 10 ng/ml TNFα, and 48 h
 163 later cells were observed with an epifluorescence microscope
 164 (Carl Zeiss Axioplan, 10×).

165 *In vivo* NF-κB expression

166 To examine *in vivo* NF-κB expression, an *in ovo* electro-
 167 poration experiment was performed. To gain access to the
 168 embryo and expose the heart surface, a small window was
 169 opened on the shell and the surrounding extracellular mem-
 170 branes were removed. Once unveiled, the whole heart was
 171 exposed to the plasmid or adenovirus by a pericardial injection.
 172 Microinjection (0.5 μl of any vector or vehicle) was
 173 performed with a G-1 capillary micropipette from Narishige
 174 Co. LTD (Japan) under a stereoscopic microscope. In plas-
 175 mid case, microinjection solution was a 2:1:1 mixture of
 176 pNF-κB-GFP plasmid (3–5 μg), mineral oil and china ink.
 177 Electroporation was subsequently carried out during which
 178 four 28-V, 35-ms pulses were delivered or an injection with
 179 0.5 μl of adenovirus particles alone or 0.5 μl adenovirus
 180 plus 0.5 μl bay 11-7085 (1.2 mM) injected at the same time.
 181 The windows were sealed and eggs were incubated for 48 h,
 182 subsequently extracted, and whole heart was observed under
 183 an epifluorescence microscope (4× or 10×).

184 NF-κB inhibition

185 To resolve if NF-κB is a determinant of heart morpho-
 186 genesis we blocked the phosphorylation of a biochemical
 187 event associated with NF-κB activation with the irreversible
 188 inhibitor Bay 11-7085 (Calbiochem, Germany). Forty em-
 189 bryos at stages 23–25 were prepared for microinjection as
 190 described above, and then the embryo's hearts were injected
 191 with 0.5 μl of 1.2 or 2.0 mM Bay 11-7085 (dissolved in
 192 dimethyl sulfoxide (DMSO)(SIGMA, Mexico) diluted in
 193 PBS). Once injected, eggs were sealed and returned to in-
 194 cubation, and the development of the injected embryos was
 195 allowed to continue for 6d, until HH stages 34–36 when the
 196 fetal heart has partitioned. Later, the hearts were dissected
 197 for morphological analysis with a stereoscopic microscope.
 198 Embryos that died during the experiment were collected and

199 analyzed at the end of the experiment. Statistical analysis
 200 was done with the χ^2 test, $n = 40$ embryos. Comparisons
 201 with a p value < 0.05 were considered significant in all
 202 cases.

TUNEL assay

203 For TUNEL assay studies, hearts were fixed in 10% neu-
 204 tral buffered formalin, paraffin-embedded or frozen and sec-
 205 tioned in sagittal plan. The 5 μm serial sections were stained
 206 using the TUNEL technique as suggested by manufacture's
 207 instructions from PROMEGA. The slices were mounted with
 208 Vectashield. Slides were observed under a laser scanning con-
 209 focal microscope (Zeiss LSM 410; Axiovert 100, Zeiss 40×
 210 plan-Neofluor WD 13.5 mm, excitation lines 488 nm for
 211 green).

212 Results

213 To analyze the distribution of transcriptional active forms of
 214 NF-κB, we built and employed a pair of vectors such that
 215 the expression of the GFP-cDNA reporter transcript revealed
 216 only those cells with active forms of NF-κB.

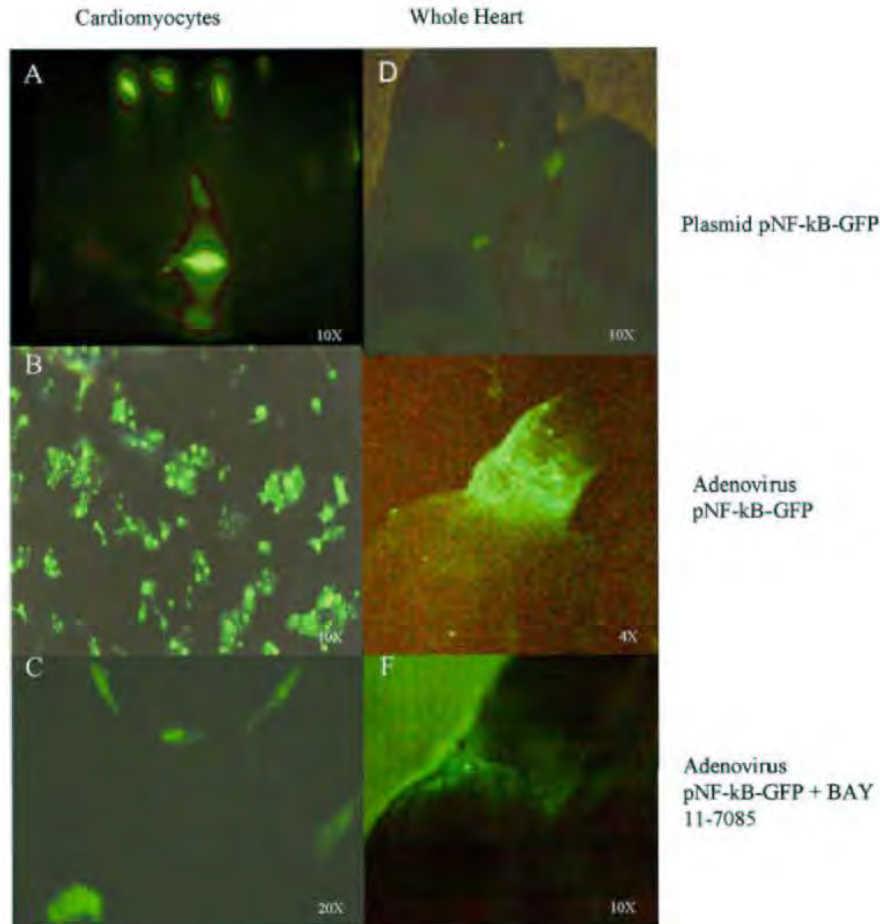
217 NF-κB expression

218 Cardiocytes were grown up in primary cultures from cells
 219 that were isolated from chicken embryo hearts (OFT and
 220 ventricles) transfected with the p NF-κB-GFP construct and
 221 treated with TNF-α. Cells expressed GFP in response to
 222 NF-κB activation (Fig. 2(A) and (B)), as Bergmann et al.
 223 [23] reported previously. This induction's experiment con-
 224 firmed pNF-κB-GFP reporter functionality. When we com-
 225 parisoned in an *in vitro* assay the efficiency of transfection
 226 individually for both vectors, we found a 30–40% with
 227 the plasmid (Fig. 3(A)), while a 100% were for the ade-
 228 novirus (Fig. 3(B)). The same plasmid and the adenovirus
 229 were used to indirectly locate the presence of transcription-
 230 ally active NF-κB *in vivo*, in microinjected electroporated
 231 or microinjected infected hearts. Forty-eight hours later, flu-
 232 orescence was detected at the OFT region (Fig. 3(D) and
 233 (E)). We found better results in GFP expression when in-
 234 jected the hearts with the recombinant replication-defective
 235 adenovirus.

236 NF-κB inhibition

237 In order to investigate the inhibitory effect of Bay 11-7085
 238 in GFP expression, which reveler the NF-κB presence, we
 239 culture cardiomyocytes *in vitro* with the inhibitor and we
 240 injected it in the heart at the same time that the adenovirus.
 241 The results obtained showed a diminished GFP expression
 242 in cardiomyocytes *in vitro* (Fig. 3(C)) as well as 7/15 hearts
 243

Fig. 3 Vector reporter Expression. The efficient of transfection between both vectors were comparison between an *in-vitro* (A and B) and an *in-vivo* (D and E) assay. The plasmid (D) and the adenovirus (E) were used to indirectly locate the presence of transcriptionally active NF- κ B in microinjected electroporated or microinjected infected hearts. We found better results in GFP expression when the hearts were injected with the recombinant replication-defective adenovirus. Forty-eight hours later, fluorescence was detected at the OFT region. The panel (C and F) shows the inhibitory effect of Bay 11-7085 in GFP expression



244 injected with bay 11-7085 showed a decrease in GFP ex-
 245 pression in the OFT (Fig. 3(F)), 60–70% lower than hearts
 246 injected with adenovirus alone (Fig. 3(D)). This experiment
 247 confirmed bay 11-7085 as inhibitor of NF- κ B activity in the
 248 OFT.

249 In other set of experiment for inhibit NF- κ B function, we
 250 tested the *in vivo* effects of Bay 11-7085, its microinjection
 251 altered morphology within the OFT zone of the heart, pre-
 252 cisely in the region where the fluorescence of GFP appeared
 253 when hearts were injected with the reporters vectors. Figure
 254 4 shows the most severe drug-induced OFT alterations.
 255 Fifty-two and 82% of hearts injected with 1.2 and 2.0 mM
 256 Bay 11-7085, respectively, were afflicted with some type of
 257 morphological alteration (Fig. (5) $\chi^2 p, s < 0.001$ vs. control
 258 sporadic defect rate).

259 Another consequence of the inhibition of the NF κ B func-
 260 tion results in the increase of cells on the OFT region,
 261 which gone under apoptosis death. Figure 6 shows an in-
 262 crease of labeled tunel cells in the embryos treated with Bay
 263 11-7085.

Cardiac alterations

264 Table 1 summaries the more frequent heart alterations caused
 265 by Bay 11-7085 treatment. Principally we observed intra-
 266 ventricle communication with outlet ventricular septal de-
 267 fect, subvalvular stenosis, and double outlet right ventricle,
 268 absence of left or right brachiocephalic trunk.

Discussion

269 The chicken embryo is an advantageous model for the study
 270 of heart development for several reasons. Firstly, it allows
 271 *in vivo* experiments to be carried out without altering the
 272 microenvironment. In addition, manipulation and handling
 273 of the embryo is relatively simple, while the cost is afford-
 274 able enough to enable a large number of samples to be in-
 275 cluded per experiment. Moreover, a detailed description of
 276 chicken embryo development, as provided by Hamilton and
 277 Hamburger, has been available since 1951.

Fig. 4 Dose-dependent effects of Bay 11-7085 on incidence of heart alterations. (A) Embryo hearts injected with Vehicle 1 (PBS + 8% DMSO) or 2 (PBS + 12% DMSO); (B) embryo hearts injected with Bay 11-7085. Dark bars represent the percentage of hearts with some morphological alteration; white bars show the percentage of normal hearts

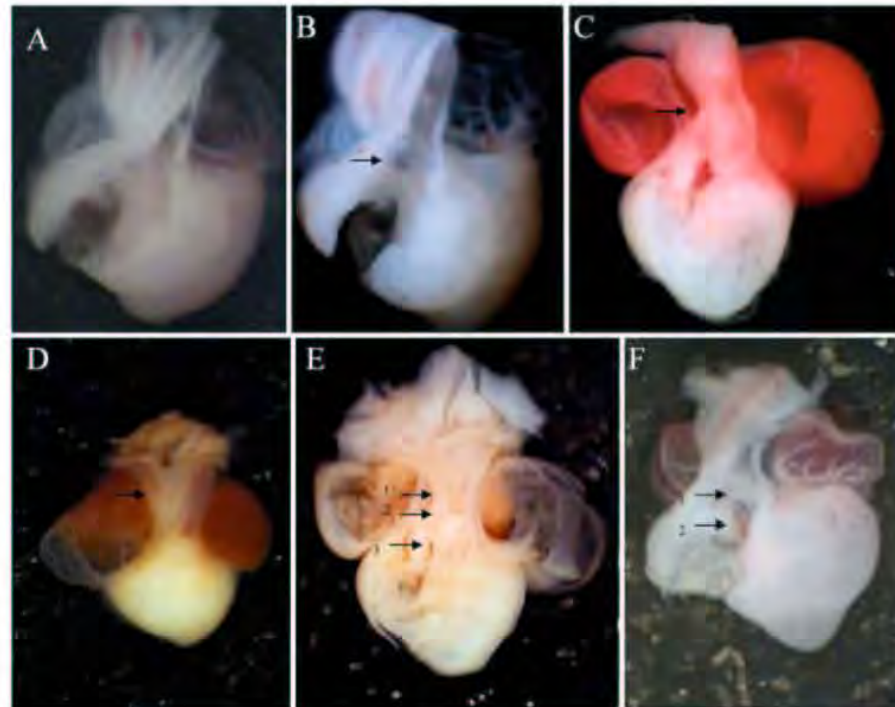


Table 1 Cardiac alterations induced by Bay 11-7085 during chicken heart development. Type of cardiac alterations caused by inhibition of NF- κ B activation during chicken embryo heart development. Embryos were injected with different concentrations of Bay 11-7085 and re-incubated for 6 days to allow development to conclude. After this period, embryos were sacrificed, and those that died during the experiment were collected ($n = 40$)

Type of alteration	Number of heart alterations	
	Bay 11-7085	Controls
Interventricular communication	17	8
Great arteries subvalvular stenosis	10	-
Double outlet right ventricle	7	2
Visceral ectopia	3	-
Interventricular communication at subpulmonary artery	2	-
Hypoplastic right ventricle	1	-
Ectopia cordis	1	-
Pericardial spills	1	-
Others	2	-

We studied the expression and function of NF- κ B during a stage of heart development that includes a critical time period for the morphogenesis of several heart structures, including growth of myocardial OFT, development of the OFT ridges, septation of the arteries of the proximal region and formation of the arterial valves. Our results showed that NF- κ B is actively expressed in the heart at HH stages 23–24, and that its pharmacological inhibition during these stages causes severe development abnormalities through an incre-

ment of apoptosis. The strategy was to inject a IKK specific pharmacological inhibitor directly into the developing heart to prevent IKK phosphorylation inhibiting the interaction between IKK and I κ B. Thus in the presence of this inhibitor NF- κ B remains inactive in the cytoplasm [24, 25]. Interestingly, when higher concentrations of Bay 11-7085 were used (data not shown), heart alterations and embryotoxicity were more evident, indicating that there are cytotoxic and probably unspecific effects of some pharmacological NF- κ B inhibitors [12]. It is worth noting that since NF- κ B is a ubiquitous transcription factor, it is certainly possible that diffusion of injected Bay 11-7085 could affect other organs. However, NF- κ B expression revealed by the reporter plasmid pNF- κ B-GFP (which shows consensus binding sites for p65/50) was localized to the same sites as the alterations and found to occur at precisely the same time (HH stages 23–24) as when NF- κ B activation blockade interfered with OFT development increasing the apoptosis rate. Thus these findings provide compelling evidence that altered NF- κ B expression contributes to the emergence of non-spontaneous heart alterations. In this respect in Fig. 7, a possible model of the events involved in the induction of apoptosis due to the blockade of NFKb is shown.

The morphological alterations that accompanied NF- κ B inhibition resembled commonly occurring human cardiopathies. The most frequent alterations found in our study were interventricular communication (IVC), double outlet right ventricle (DORV) and valvular and great arteries

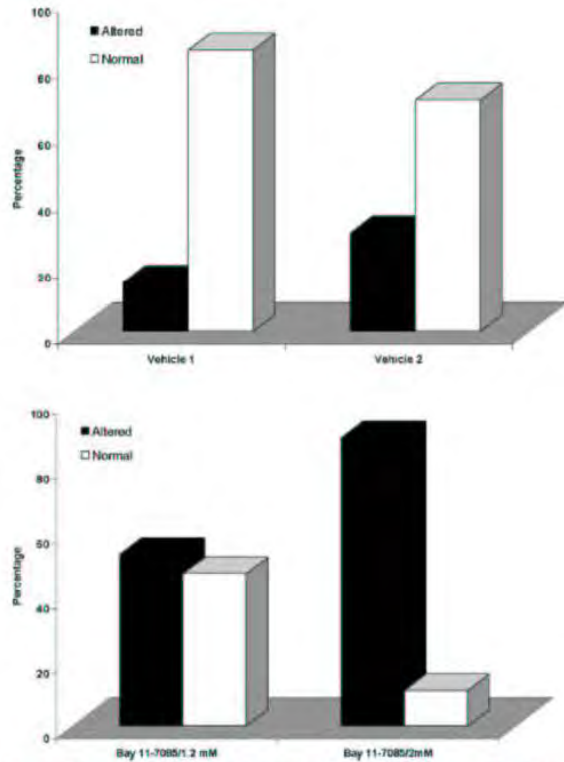


Fig. 5 Morphological alterations induced by inactivation of NF- κ B by the specific inhibitor Bay 11-7085. Injection of vehicle alone produced no external (A) or internal (B) effects on the morphological structure of a chick embryo heart. Panels C and D show a chick embryo heart injected with Bay 11-7085. This heart displays some of the many alterations caused by this chemical agent. Alterations were mainly seen at the outflow tract (OFT), including subvalvular stenosis (C1 and D1); double outlet of the right ventricle (D2); interventricular communication (D3) and right ventricle hypoplasia (D4)

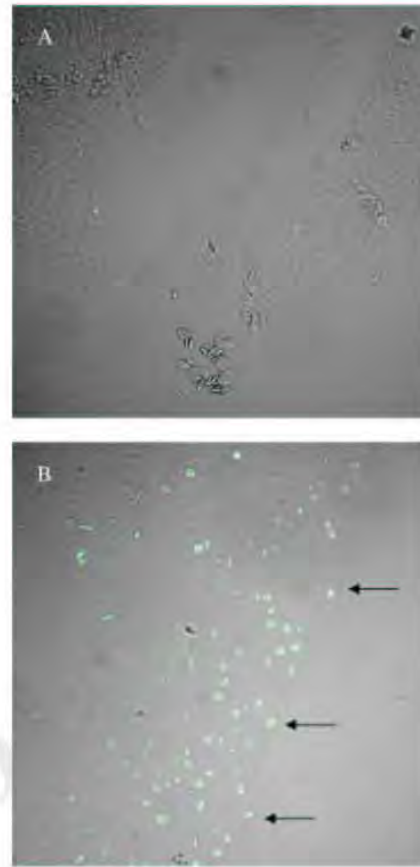


Fig. 6 TUNEL-assay demonstrating apoptosis of chicken OFT heart altered by the NF κ B blockade by Bay 11-7085. Panel A shows a micrograph of a control heart at 34 HH stage and in panel B a heart at 34 HH where NF κ B function was altered by Bay 11-7085 injection

317 stenosis. These findings are in agreement with previous work
 318 demonstrating an association between disrupted OFT, and
 319 the development of CIV and DORV [26]. All of the alter-
 320 ations were located within anatomical structures whose
 321 development is associated with OFT formation, in the same
 322 region where we find the NF- κ B expression. Thus, these
 323 findings suggest that NF- κ B inhibition may be involved di-
 324 rectly with the induction of frequent congenital cardiac al-
 325 terations, such as Fallot tetralogy, as suggested by Mou [7]
 326 and MaQuing [8].

327 Although the present data demonstrate a pivotal role for
 328 NF- κ B during heart development, some reports in trans-
 329 genic mice with blocked NF- κ B activation have indicated
 330 that NF- κ B is not an indispensable transcription factor for
 331 heart development [12, 14]. This incongruence may be due to
 332 the wide range of possible dimers that can be formed among
 333 members of the NF- κ B family [24, 25] because of the func-
 334 tional redundancy of NF- κ B subunits [27, 28]. Furthermore,

325 it has been impossible to generate mice with a complete
 326 knockout of all Rel family members because p65 knockout
 327 mice die *in utero*, apparently as a result of widespread liver
 328 apoptosis [29].

329 It is not so clear why alterations emerged in the region of
 330 the large arteries in addition to in the OFT region, considering
 331 that these structures have their origin in the aortic sacs [30]
 332 and not in the OFT. It is possible that NF- κ B expression was
 333 not observed in these structures because the plasmid may
 334 not diffuse to the aortic arches region from the pericardial
 335 cavity where it was injected. On the other hand, the chemical
 336 structure of the inhibitor permits it to diffuse widely. Further
 337 studies are needed to determine whether alterations in the
 338 large arteries are due to a direct or indirect effect of NF- κ B
 339 inhibition.

340 This present study is the first in chicken embryo to pro-
 341 vide evidence that interference with activation Rel family
 342

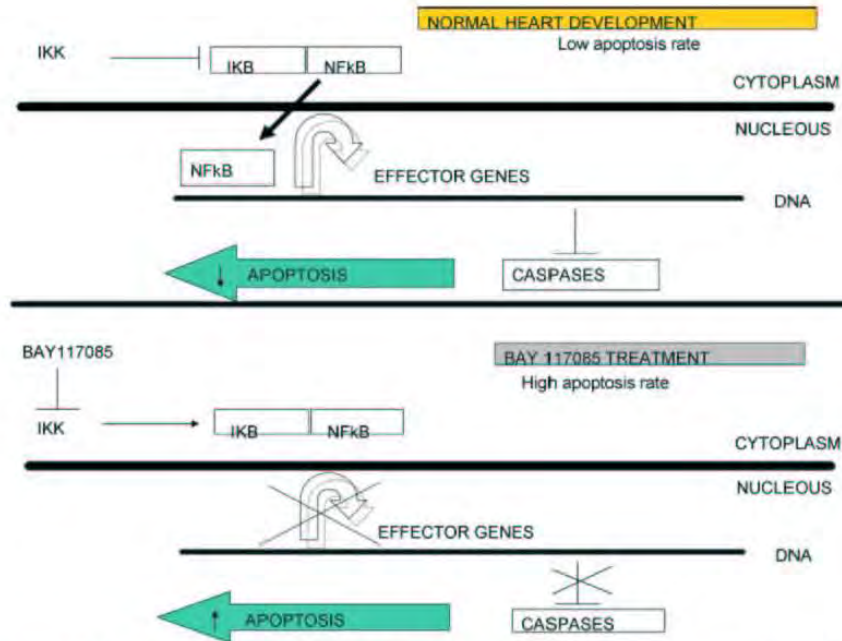


Fig. 7 Schematic view of possible role of NF- κ B in the protection of apoptosis during OFT heart development. Panel A shows the role of NF- κ B under normal development. Panel B shows the altered NF- κ B pathway induced by Bay 11-7085

members can result in the induction of apoptosis and congenital cardiopathies during heart development. It remains to be determined whether other Rel family members form active dimers that mediate morphological processes involved in the transformation of the OFT during cardiogenesis.

Acknowledgments Hernandez-Gutierrez received a scholarship from Conacyt and support of the Posgrado-UNAM. This study was partially supported by Conacyt-Project 33373. A professional scientific editor at Write Science Right was consulted during the preparation of this manuscript.

References

- Li C, Browder W, Kao RL (1999) Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 276:H543–H552
- Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giada A (1998) Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor κ B in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 98:100–103
- Cooper M, Lindholm P, Pieper G, et al (1998) Myocardial nuclear factor activity and nitric oxide production in rejecting cardiac allografts. *Transplantation* 66:838–844
- Ritchie ME (1998) Nuclear factor κ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 98:1707–1713
- Kubota T, McTierman CF, Frye CS, et al (1997) Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 81:627–635
- Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145:33–43
- Mou SS, Haudek SB, Lequier L, et al (2002) Myocardial inflammatory activation in children with congenital disease. *Crit Care Med* 4:827–832
- Qing M, Schumacher K, Helse R, et al (2003) Intramyocardial synthesis of pro- and anti-inflammatory cytokines in infants with congenital cardiac defects. *J Am Coll Cardiol* 41(12):2266–2274
- Hirotsani S, Otau K, Nishida K, et al (2002) Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 105(4):509–515
- Jones WK, Brown M, Ren X, He S, McGuinness M (2003) NF- κ B as an Integrator of Diverse Signaling Pathways The Heart of Myocardial Signaling? *Cardiovasc Toxicol* 3(3):229–254
- McGowan BS, Ciccimaro EF, Chan TO, Feldman AM (2003) The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the failing myocardium. *Cardiovasc Toxicol* 3(3):191–206
- Dawn B, Xuan YT, Marian M, et al (2001) Cardiac-specific abrogation of NF- κ B activation in mice by transdominant expression of a mutant I κ B α . *J Mol Cell Cardiol* 33(1):161–173
- Zingarelli B, Hake PW, Yang Z, O'connor M, De-Linberg A, Wong HR (2002) Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF- κ B and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *FASEB J* 16:327–342
- Mitra A, Chen Z, Sivasubramaniann, et al (2001) Both cardiac myocyte apoptosis and infarct size are increased in mice with defective NF- κ B signaling. *Circulation* 104(Suppl.):II-11
- Higuchi Y, Chan TO, Brown MA, et al (2005) Cardioprotector Afforded by NF- κ B Ablation Is Associated with Activation of Akt In Mice Over-Expressing TNF α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*

Autpls
provide
page
range

Autpls
provide
page
range

- 413 16. Brown M, McGuinness M, Wright T, et al (2005) Cardiac-specific
414 blockade of NF- κ B in cardiac pathophysiology: Differences
415 between acute and chronic stimuli *in vivo*. *Am J Physiol Heart*
416 *Circ Physiol* 289(1):H466-H476
- 417 17. Jay PY, Izumo S (2002) Elucidating the molecular and genetic
418 interactions responsible for congenital heart disease. *Pediatr Res*
419 51(2):127
- 420 18. Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, et al (1985) Maternal mitral
421 valve prolapse and congenital heart disease in the offspring. *Am*
422 *Heart J* 110(4):899-900
- 423 19. Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in
424 the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92
- 425 20. He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW,
426 Vogelstein B (1998) A simplified system for generating re-
427 combinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci* 95(5):2509-
428 2514
- 429 21. Badrichani AZ, Stroka DM, Bilbao G, Curiel DT, Bach FH,
430 Ferran CJ (1999) Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory
431 function in endothelial cells through inhibition of NF- κ B. *Clin*
432 *Invest* 103(4):543-553
- 433 22. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al (1997) Three-
434 dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a
435 collagen matrix: A new heart muscle model system. *FASEB J*
436 11:683-694
- 437 23. Bergmann MW, Loser P, Dietz R, Harsdorf R (2001) Effect of
438 NF- κ B inhibition on TNF α induced apoptosis and downstream
439 pathway in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33:1223-1232
- 440 24. Parry G, Mackman N (1994) A set of inducible genes expressed by
441 activated human monocytic and endothelial cells contain KB-like
442 sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J Biol Chem*
443 269:20823-20825
- 444 25. Baldwin AS Jr (2001) Series introduction: The transcription factor
445 NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 107(1):3-6
- 446 26. Arteaga M, De la Cruz MV, Sánchez C, Díaz GF (1982) Double
447 outlet right ventricle: Experimental morphogenesis in the chick
448 embryo heart. *Ped Cardiol* 3:219-227
- 449 27. Baldwin AS Jr (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins:
450 New discoveries and insights. *Annu Rev J Immunol* 14:649-683
- 451 28. Weih F, Durham SK, Barton DS, Sha WC, Baltimore D, Bravo
452 R (1997) p50-NF- κ B complexes partially compensate for the
453 absence of RelB: Severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-)
454 double-knockout mice. *J Exp Med* 185(7):1359-1370
- 455 29. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D (1995)
456 Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the
457 RelA component of NF κ B. *Nature* 376(6536):167-170
- 458 30. Waldo K, Kirby ML (1998) Development of the Great arteries. In:
459 De la Cruz MV, Markwald R (eds) *Living morphogenesis of the*
460 *heart*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp 187-217

ARTÍCULO 2 SOMETIDO A LA REVISTA DEVELOPMENT

New Submission

Your submission has been uploaded successfully!

Judith Eisen

NF-61547B Plays an Important Role as a Key Cytoprotective Factor in Adjacent Zones of Apoptosis in the during Chicken Heart Development.

NF- κ B is a ubiquitous dimeric homo-heterodimer transcription factor complex that normally resides within the cytoplasm. This complex is inhibited by I κ B proteins, which inactivate NF- κ B by trapping it in the cytoplasm. Curcumin has been associated with both anti- and pro-apoptotic mechanisms. While NF- κ B is most commonly found in a cytoprotective influence, there are a number of instances where it can be pro-apoptotic, depending on the stimulus and the cellular context. It remains unknown precisely what role is played in vivo and during organ development.

The presence of apoptosis, or programmed cell death (PCD), has been widely documented in developing cardiac tissue. Indeed studies examining avian development have shown that the shortening and rotation of the outflow tract (OFT) require spatially and temporally regulated apoptotic elimination of OFT cardiomyocytes during heart development in chicken. The aim of this work was to investigate whether NF- κ B plays an important cytoprotective role during development of the OFT, and whether blocking NF- κ B can induce apoptosis during chicken heart development. In order to perform these experiments, we designed an adenovirus vector that reports the presence of the active form of NF- κ B. We used BAY 11-7085, an irreversible inhibitor of I κ B phosphorylation, to inhibit NF- κ B activation. When BAY 11-7085 was injected into the zone where the reporter gene was expressed, we found several congenital cardiac alterations, including OFT, along with increased apoptosis. This suggests that activation of NF- κ B gives rise to cytoprotective signals that prevent the development of cardiac alteration at the OFT level.

Salomón Hernández-Gutierrez^{1,2}, Fernando Hernández-Sánchez¹, Alejandro Zentella-Dehesa^{1,4}, Isabel Manuel Ramos-Kuri¹, Pablo Hernández-Franco², and Emilio Rojas¹

heart development

No covering message

E:\salomon\paper2\Rojas_version para development (23 de marzo).pdf

E:\salomon\paper2\cover letter development.doc

NF- κ B Plays an Important Role as a Key Cytoprotective Factor in Adjacent Zones of Apoptosis in the Outflow Tract during Chicken Heart Development.

Salomón Hernández G^{1,2}, Fernando Hernández S¹, Alejandro Zentella D^{1,4}, Isabel García P³, Manuel Ramos K¹, Pablo Hernández F², and Emilio Rojas¹.

¹ **Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM**

² **Escuela de Medicina, Laboratorio de Biología Molecular Universidad Panamericana**

³ **Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular, UNAM**

⁴ **Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion “Salvador Zubirán”.**

Running Title: Cytoprotective effect of NF- κ B during OFT apoptosis.

Key words: NF- κ B, Bay11-7085, Chick heart development, Green Fluorescent Protein, Cardiac Alterations.

*** Address correspondence to: Emilio Rojas . Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, UNAM. México D.F. 04510. E-mail: emilior@servidor.unam.mx**

Summary

NF- κ B is a ubiquitous dimeric (homo-/heterodimer) transcription factor complex that normally resides within the cytosol. This complex is inhibited by I κ B proteins, which inactivate NF- κ B by trapping it in the cytoplasm. Curiously, NF- κ B has been associated with both anti- and pro-apoptotic mechanisms. While NF- κ B is most commonly found to have a cytoprotective influence, there are a number of instances where it can be pro-apoptotic, depending on the inducing stimulus and the cellular context. It remains unknown precisely what role is played *in vivo* and during organ development.

The presence of apoptosis, or programmed cell death (PCD), has been widely documented in developing cardiac tissues. Indeed studies examining avian development have shown that the shortening and rotation of the outflow tract (OFT) require spatially and temporally regulated apoptotic elimination of OFT cardiomyocytes during heart development in chicken. The aim of this work was to investigate whether NF- κ B plays an important cytoprotective role during apoptosis of the OFT, and whether blocking NF- κ B can induce apoptosis during chicken heart development. In order to perform these experiments, we designed an adenovirus vector that reports the presence of the active form of NF- κ B. We then used BAY 11-7085, an irreversible inhibitor of I κ B α phosphorylation, to inhibit NF- κ B activation. When Bay 11-7085 was injected into the zone where the reporter gene was expressed, we found several congenital cardiac alterations in the OFT, along with increased apoptosis. This suggests that activation of NF- κ B gives rise

to cytoprotective signals that prevent the development of cardiac alteration at the OFT level.

INTRODUCTION

NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) is a transcription factor composed of various combinations of homo- and hetero-dimer components consisting of five members of the Rel family, including NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), Rel A (p65), and c-Rel (Rel). In un-stimulated cells, NF- κ B dimers are sequestered in the cytosol by inhibitor proteins, called I κ Bs. The phosphorylation of I κ Bs and their subsequent dissociation from the complex and degradation allow activation of the NF- κ B complex. Paradoxically, NF- κ B activation has been associated with both anti- and pro-apoptotic processes (Barkett and Gilmore, 1999).

The embryonic cardiac outflow tract (OFT), the portion of the embryonic heart connecting the developing ventricles to the aortic sac, plays a key role in the establishment of dual circulation (Pexieder, 1995; Rothenberg et al., 2003; Webb et al., 2003). In birds and mammals, OFT myocardium is added from a 'secondary (anterior) heart-forming field' derived from splanchnic mesoderm beneath the caudal pharynx after the formation of the primitive heart tube from the primary heart-forming field (Kelly et al., 2001; Mjaatvedt et al., 2001; Waldo et al., 2001). The OFT subsequently undergoes a complex remodeling process during the transition to dual circulation. It is divided into pulmonary and systemic circuits by septation, a process dependent upon the invasion of cells migrating from the neural crest (Kirby et al., 1983). The OFT also shortens and rotates in order for the pulmonary artery to connect to the right ventricle in a position anterior to and to the

right of the aorta's point of insertion into the left ventricle (de la Cruz et al., 1977; Thompson et al., 1987; Watanabe et al., 1998).

The phenomenon of programmed cell death (PCD) has been widely documented in developing cardiac tissues (Pexieder, 1975; Fisher et al., 2000; Poelmann et al., 2000; van den Hoff et al., 2000; Schaefer et al., 2004). Specifically during avian development, it has been demonstrated that the shortening and rotation of the OFT requires the spatially and temporally coordinated elimination of OFT cardiomyocytes; this reduction is achieved by apoptosis between stages 25 and 32 (Hamburger and Hamilton, 1951) during development of the chicken heart (Watanabe et al., 1998; Salle et al., 2004).

The aim of this study was to test the possible participation *in vivo* of NF- κ B as a key cytoprotective factor in adjacent zones of apoptosis in the OFT, including investigating whether blockade of NF- κ B activation induces apoptosis during chicken heart development, in the area where p52 subunit of the Rel family is observed.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were conducted in chicken (*Gallus gallus*) embryos of the White Leghorn strain obtained from ALPES SA de CV (Mexico). Fertilized chicken embryos were incubated at 37.5°C at 86-87% humidity in a forced-draft incubator between stages 22-24 as described by Hamburger and Hamilton (HH) (1951).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Non-quantitative expression analysis of p50, p52, and p65 transcripts was carried out by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) on tissue that was isolated from the different portions of the heart (OTF and ventricles). The OTF was separated from the rest of heart (25 hearts) and total RNA was extracted using an RNA isolation kit from Gentra Systems (Minneapolis, MN) according to the manufacturer's specifications. Reverse transcription reactions were performed with 2 µg of total RNA from each segment using the following primers:

p50 (Forward 5'-ctaaaatggcaggagaggatcc-3', Reverse 5'-gtacacttccgggaagcgta-3')

p52 (Forward 5'-cttccgatttcggtatgtctgc-3', Reverse 5'-gtagtacaagaagaaccactgcacc-3')

p65 (Forward 5'-ggatgcggttccgctataagtgt-3', Reverse 5'-gtggcgcgagtcagcataag-3')

The reaction conditions for RT-PCR were as follows: an initial 1-h incubation at 42 °C with M-MLV RT enzyme, followed by inactivation for 60 s at 95 °C. After RT reaction, a standard PCR denaturing step (5 min at 95 °C), followed by 36 cycles, each cycle consisting of 30 s at 95 °C, annealing 30 s at 54, 55, or 58 °C for p50, p52, and p65 respectively, and extension for 60 s at 72 °C; after the final cycle an additional extension step at 72 °C during 7 min was performed. All amplification reagents were supplied by GIBCO, USA).

Generation of Adenovirus Recombinant

The plasmids required to generate the adenovirus were a gift from Dr. Vogelstein of the Howard Hughes Medical Institute, Maryland USA). Construction

was performed following the methodology described in He et al., 1998). The overall strategy, which involved 3 steps, is diagrammed in Fig. 2. First, a fragment with NF- κ B sites and the cDNA corresponding to the green fluorescent protein (GFP) from pNF- κ B-GFP (Hernandez-Gutierrez et al.,2006) was cloned into a shuttle vector. Second, the resulting construct was linearized with Pme I and transformed together with a supercoiled adenoviral vector, pAdEasy, into *E. coli* strain BJ5183. Recombinants were selected with kanamycin and screened by restriction endonuclease digestion and automated sequencing. Third, the recombinant adenoviral plasmid construct was digested with Pac I and transfected into packaging cells (293 T cell line). After 5-7 days we obtained the infective recombinant adenoviral particles.

Cells and virus

293 T cells were grown in cell culture dishes (Falcon 10 X 10 mm) or six-well plates for virus titration with DMEM (Invitrogen, USA) supplemented with 10% neonate bovine serum (Hi-clone, USA), and antibiotics (100 mg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin) (Invitrogen, USA) at 37°C, 5% CO₂, and 100% humidity. The selection of recombinant adenovirus strain was amplified and titrated using conventional methodologies.

NF- κ B expression

To examine transcriptionally active forms of NF- κ B *in vivo*, an *in ovo* microinjection experiment was performed. To gain access to the embryo and

expose the heart surface, a small window was opened in the shell and the surrounding extracellular membranes were removed in embryos at HH stages 22-24 (4.5 d incubation). Once unveiled, the entire heart was exposed to virus by pericardial microinjection of 2×10^8 pfu in $0.5 \mu\text{l}$ with a G-1 capillary micropipette (Narishige Co. LTD., Japan) under a stereoscopic microscope. The windows were then sealed and eggs were incubated for 48 h, when hearts were extracted and observed under an epifluorescence microscope (Carl Zeiss Axioplan, 4X) or a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 410; Axiovert 100, Zeiss 5X plan-Neofluor WD 13.5 mm, excitation lines: 488 nm for green and 568 nm for red) for analysis.

NF- κ B inhibition

To resolve whether NF- κ B is indeed a determinant of heart morphogenesis, we blocked phosphorylation of I κ -B, which is necessary for NF- κ B activation, using the irreversible inhibitor, Bay 11-7085 (Calbiochem, Germany). Embryos at HH stages 22-24 were prepared for microinjection as described above. The embryo's hearts were injected with $0.5 \mu\text{l}$ of 1.2 mM Bay 11-7085 (dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; SIGMA, Mexico) diluted in PBS). Once injected, eggs were sealed and returned to incubation. Development of the injected embryos was allowed to continue for 6 d, until HH stages 34-36, when the fetal heart has partitioned. Later, the hearts were dissected for morphological analysis with a stereoscopic microscope.

Antibodies

NF- κ B family-specific murine monoclonal antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc (USA).

Immunofluorescence

Tissue from normal hearts previously injected with adenovirus at 22-24 stage of HH, normal untreated hearts, and hearts treated with BAY 11-7085 at HH stage 36 were immediately fixed in a 4% paraformaldehyde for 24 h, then exchanged against 15% and 30% sucrose solution in PBS for 24 h each. Hearts protected by embedding Tissue-Tek OCT (Miles-Bayer) media were immediately frozen in a cryostat. Five μ m sections were cut and mounted onto Poly-L-Lysine (Sigma) coated slide and stored at -70 °C before staining using the TUNEL technique.

TUNEL assay

For TUNEL assay, the hearts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, or frozen/sectioned in the sagittal plane. The 5 μ m serial sections were stained using the TUNEL technique according to the manufacturer's instructions (Promega, USA), with modifications. We exchanged the nucleotide mix included into the kit with Cy5-dUTP (Amersham Biosciences, UK) and we used unlabelled nucleotides (Applied Biosystems, USA) at 200 μ m. The slices were mounted with Vectashield DAKO, UK).

Immunocytochemistry

A subset of the normal and BAY 11-7085-treated hearts at stages 22-23 and 36 of HH were processed for paraffin embedding and sectioning. Serial transverse sections (5 μm) were collected on electrically-charged slides (Superfrost/Plus, Fisher Scientific, USA). Slices were incubated overnight at 4 °C with α -p52 antibody that was diluted 1:100 with 10% BSA in PBS and revealed with an immunoperoxidase kit (Dako, UK). For certain procedures, hearts were processed for frozen sectioning.

RESULTS

NF- κ B expression

The presence and role of NF- κ B in heart development is not well defined. It is not known when NF- κ B becomes activated, whether activation is compartmentalized, or even whether it is important for heart development at all. In order to investigate the expression of NF- κ B subunits in heart tissue, total RNA extracts were prepared by dissecting the OFT and the rest of heart (ventricles) from HH stage 22-24 chicks. We designed primers for the commonly found members of the chicken NF- κ B family, p50, p52, and p65, and determined their expression by RT-PCR. The expected fragments for p50, p52, and p65 were 220, 292, and 380 bp, respectively. Prior to RT-PCR amplification from total heart RNA, the primers were tested on different chicken tissues, corroborating amplification of the expected PCR products (data not shown). Our RT-PCR data (Fig. 1) shows

the pattern of expression of these NF- κ B family members in each of the two stages of development analyzed for each heart segment.

NF- κ B activity

To analyze the distribution of transcriptionally active forms of NF- κ B, we constructed an adenoviral vector (Fig. 2) that employs an NF- κ B-sensitive GFP reporter transcript to reveal those cells with active NF- κ B. This adenovirus vector was used to indirectly locate the presence of transcriptionally active NF- κ B *in vivo* in the microinjected hearts. Forty-eight hours after injection, fluorescence was detected in the OFT region (Fig. 3A). Figures 3B-F shows the presence of GFP by confocal microscopy at different levels through several optical cuts. Interestingly, this analysis revealed that GFP reporter expression is abundant in the anterior part of the OFT and absent in the posterior part of this structure (Fig. 3F).

NF- κ B cytoprotection

To investigate the potential participation *in vivo* of NF- κ B as a key cytoprotective factor in adjacent zones of apoptosis in the OFT during normal heart development, we injected the adenoviral reporter into chicken hearts and observed fluorescence in the OFT region after 48 h (Fig. 4A). We then carried out a TUNEL assay to locate apoptosis in the OFT of hearts at HH stage 28-29 (Fig 4B). Finally, we also performed an experiment to simultaneously visualize regions of apoptotic foci (red), surrounding green myocytes, which are those expressing NF- κ B factor in

the OFT (Fig. 4C). Where the cells surrounding apoptotic regions of the OFT are NF- κ B.

NF- κ B inhibition and Apoptosis

To test *in vivo* the hypotheses that signaling through NF- κ B in the OFT is at least in part associated with an anti-apoptotic mechanism, we applied a pharmacological inhibitor of NF- κ B, Bay 11-7085. After treatment, development of the injected embryos was allowed to continue for 6 d, at which time the morphology of the embryo hearts was analyzed. We found an increased rate of apoptosis in hearts that had been injected with the inhibitor (Fig. 5D) compared to hearts injected with vehicle alone (Fig. 5C). We found (Fig. 5B and prior studies from our laboratory, *in press*) that microinjection of Bay 11-7085 altered morphology within the OFT zone of the heart, precisely in the region where the fluorescence of GFP appeared when hearts were injected with the reporter adenovirus. Inhibitor treatment caused various kinds of alterations (Fig. 5E); however, in comparison vehicle-injected hearts displayed normal morphology (Fig. 5A).

Pharmacological inhibition of NF- κ B may predominantly produce nonspecific effects that are independent of the NF- κ B pathway. However, the application of NF- κ B inhibitors in *in vivo* models has allowed spatio-temporal modulation of activation (Zou et al., 2003). It has been previously shown that the compound Bay 11-7085 inhibits NF- κ B activation by blocking inducible I κ B α phosphorylation at Ser 32 and Ser 36 (Pierce et al., 1997; Bhakar et al., 2002; Chiarugi, 2002), thus preventing participation of this factor in apoptotic events.

Immunochemistry

With the aim of verifying NF- κ B inhibition *in vivo*, we micro-injected the NF- κ B inhibitor Bay 11-7085 2 h before performing immunochemistry for p50, p52, and p65 using commercial antibodies raised against mammalian protein. Even though these NF- κ B family members are highly conserved proteins, only staining for p52 was positive. This selectively is most likely due to the p50 and p65 antibodies not being raised against the chicken antigen. Figure 6A shows results from control hearts injected only with vehicle; panel B shows little to no positive staining for p52 in the hearts injected with the inhibitor. Both views are transverse slices of the injected OFT region. We also carried out immunochemistry for NF- κ B (p52) on slices from Bay11-7085-treated hearts, and founding it to be absent from the zone altered by this inhibitor (Fig 6F). The untreated zone is shown for comparison in figure 6E.

DISCUSSION

Studies reported by Watanabe et al., (1998) showed that OFT remodeling requires the spatially and temporally regulated elimination of OFT cardiomyocytes by apoptosis between HH stages 25 and 32; however, the whole OFT does not undergo apoptosis. This group has also suggested that the signal that triggers the cardiomyocyte apoptosis and remodeling of the OFT during the transition to dual circulation is produced by regional myocardial hypoxia (Sughishita et al., 2004). However, these observations generate some questions, such as: what factors may prevent apoptosis in those cardiomyocytes that do not undergo apoptosis?

Our results suggest that NF- κ B is such an apoptosis suppressing factor, which may participate as a protective factor in cells surrounding the apoptotic zones. We decided to utilize two different approaches to test this idea. First, we analyzed the role of a pharmacological inhibitor of NF κ B activation, Bay 11-7085, assessing apoptosis with a TUNEL assay. A nominal amount of apoptosis was observed in the control hearts; however, at HH stage 34, Bay 11-7085 induced significant apoptosis in the OFT, strongly implicating the participation of NF- κ B in protection against apoptosis *in vivo*. Under normal conditions at this stage of heart development, apoptosis does not occur in the OFT zone and the heart is completely partitioned. In addition, we also observed inhibition of an NF- κ B-controlled GFP reporter expression in the OFT after treatment with the NF- κ B inhibitor and consequently an alteration of heart morphology.

A second approach, confocal analysis, was used to demonstrate that the cells surrounding apoptotic regions of the OFT are NF- κ B positive. Taken together

our data confirm that NF- κ B gives rise to an anti-apoptotic cytoprotective signal and prevents the cardiac development at the OFT level. Although this study was not designed to identify the complete portfolio of biological mechanisms responsible for the cytoprotective effects of NF- κ B, the immunohistochemistry findings reported herein strongly suggest the participation of the NF- κ B member, p52, in conferring cytoprotection against apoptosis.

Our results disagree with some studies in mammals that have suggested that NF- κ B may not play a role in the development and differentiation of organs and tissues (Weih et al., 1997; Dawn et al, 2001). Although all of the Rel family members have been individually genetically ablated, none of these knockout mice are reported to have cardiac defects, raising the possibility that functional redundancy persists and the reason for this discrepancy may be related to differences between experimental models.

The changes induced in the OFT zone demonstrate a role for NF- κ B in cardiac morphogenesis and cytoprotection. However, the other up- and downstream players involved of survival signaling through the NF- κ B pathway remain to be identified. In this respect, the proposition by Watanabe's group that regional myocardial hypoxia may trigger cardiomyocyte apoptosis and remodeling of the OFT is very interesting, particularly because in the transition to dual circulation, VEGF and Akt provide survival signals that regulate these processes (Sugishita et al., 2004). Thus one of the possible factors upstream of the NF- κ B pathway may be the Akt/PKB pathway. Indeed Akt/PKB has been shown to regulate IKK activity, which leads to the nuclear translocation and activation of NF- κ B and transcription

of NF- κ B-dependent pro-survival genes, including Bcl-xL, caspase inhibitors, and c-Myb [reviewed in Song, 2005]. Elucidating the role of this and other potential players in this system will be an important aim for future studies.

Acknowledgements:

Hernandez-Gutierrez received a scholarship from CONACYT and support of the Direccion General de Posgrado-UNAM. This study was partially supported by CONACYT-Project 33373. A professional scientific editor at Write Science Right was consulted during the preparation of this manuscript.

Figure 1. Expression of NF- κ B dimers in the chicken heart Total RNA was prepared from OFT (lanes 2, 3, 4, and 8) and ventricular samples (lanes 5, 6, 7, and 9) of chicken hearts at HH stage 22-23. Lane 1, standard molecular weight marker; lanes 2 and 5, the expression of p50; lanes 3 and 6, p52; and lanes 4 and 7, p65. Lanes 8 and 9 are negative controls for OFT and ventricular RNA, respectively.

Figure 2. Diagram of the strategy designed for construction of the adenoviral NF- κ B-GFP reporter vector A fragment of the plasmid pNF- κ B-GFP, which contains the consensus sites for NF- κ B joined to GFP, was sub-cloned in a system to generate recombinant adenovirus (for details, see methods).

Figure 3. GFP expression in the chick embryo outflow tract (OFT) Panel (A), (10_μ) view under epifluorescence microscope of a chick embryo heart OFT region previously injected with the adenoviral reporter vector. Panel (B-F), (10_μ) confocal serial micrographs at different optical levels, where the GFP presence is more evident at the OFT anterior (B-D) part and decreased or ablated expression appears at OFT posterior (E-F).

Figure 4. Activation of NF- κ B and possible participation as protective factor in apoptosis of the OFT in the chicken embryo (A) The NF- κ B-GFP adenovirus reporter was used to indirectly locate the presence of transcriptionally active NF- κ B in microinjected hearts *in vivo*. Green fluorescence was detected in the OFT

region (stage 28-29). (B), Shown is the apoptotic zone of the OFT at stage 28-29 (same stage as panel A). Panel (C), shown is the simultaneous localization of apoptotic foci (red), surrounding green myocytes signifying expression of NF- κ B in the OFT.

Figure 5. Morphological alterations and apoptosis induced by inactivation of NF- κ B by inhibitor Bay 11-7085 Injection of vehicle alone produced no external or internal effects on the morphological structure of chick embryo hearts (A), with some apoptotic cells found at the outflow tract (OFT) level (panel C, arrows). (B), a chick embryo heart injected with Bay 11-7085 displays some of the many alterations caused by this chemical agent at precisely the zone where the adenovirus reporter was expressed. (D), the inhibitor-treated heart shows an increased rate of apoptosis in the OFT zone. Alterations were primarily seen in the (OFT), including subvalvular stenosis, (E1); double outlet of the right ventricle (DORV), (E2); interventricular communication, (E3); and right ventricle hypoplasia, (E4).

Figure 6 Immunochemistry for NF- κ B (A), p52 is distributed in OFT only at the anterior section in control-injected stage 22-24 hearts, but absent from the posterior region. Little or no expression of p52 in hearts inhibited by Bay 11-7085 2 h after injection. Panel (C) and (D) show a panoramic view of a heart with OFT stenosis and DORV induced by Bay 11-7085. (E), magnified view of boxed area in (C); p52 is present in the nucleus of myocytes just below the stenosis alteration in

a non-affected zone. Shown in panel (D) is the absence of p52 in nuclei in an altered zone (stenosis at OFT level). (F), magnified view of boxed section in (D) showing little signal in the cytoplasm of cells.

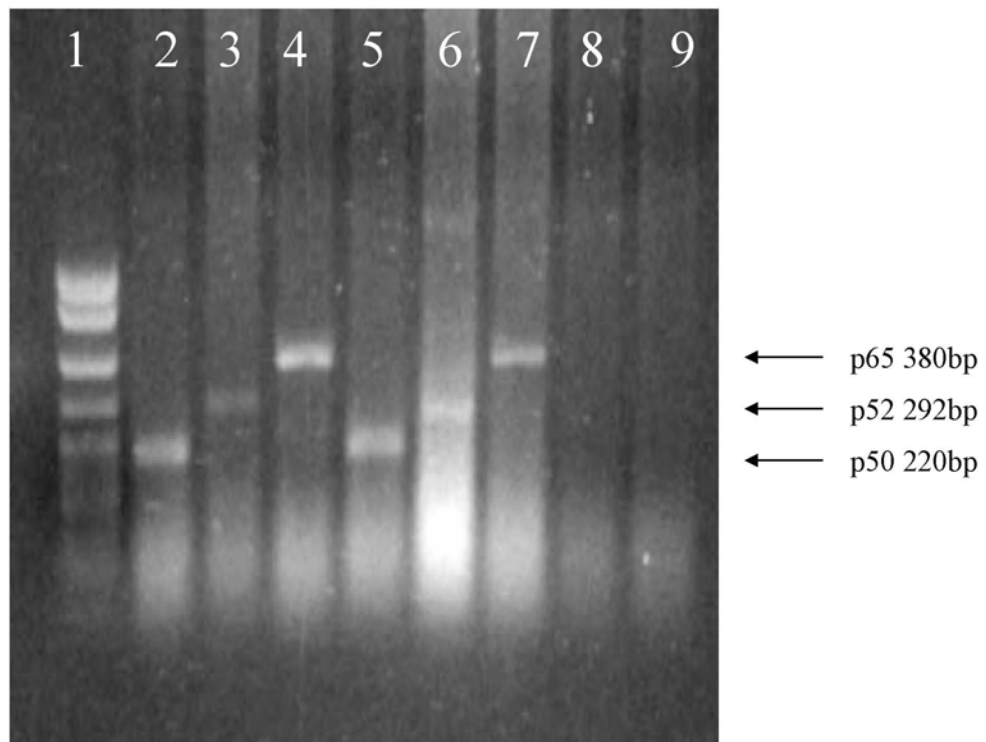


Figure 1

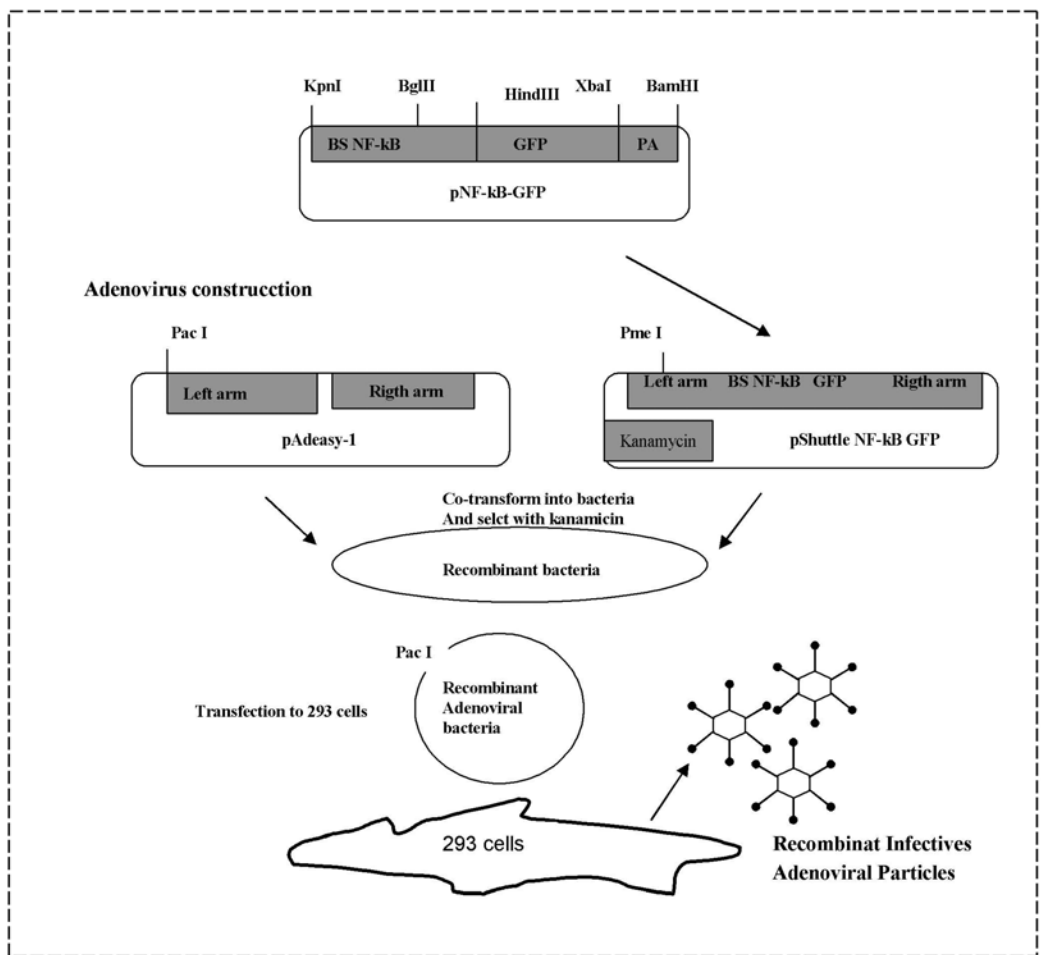


Figure 2

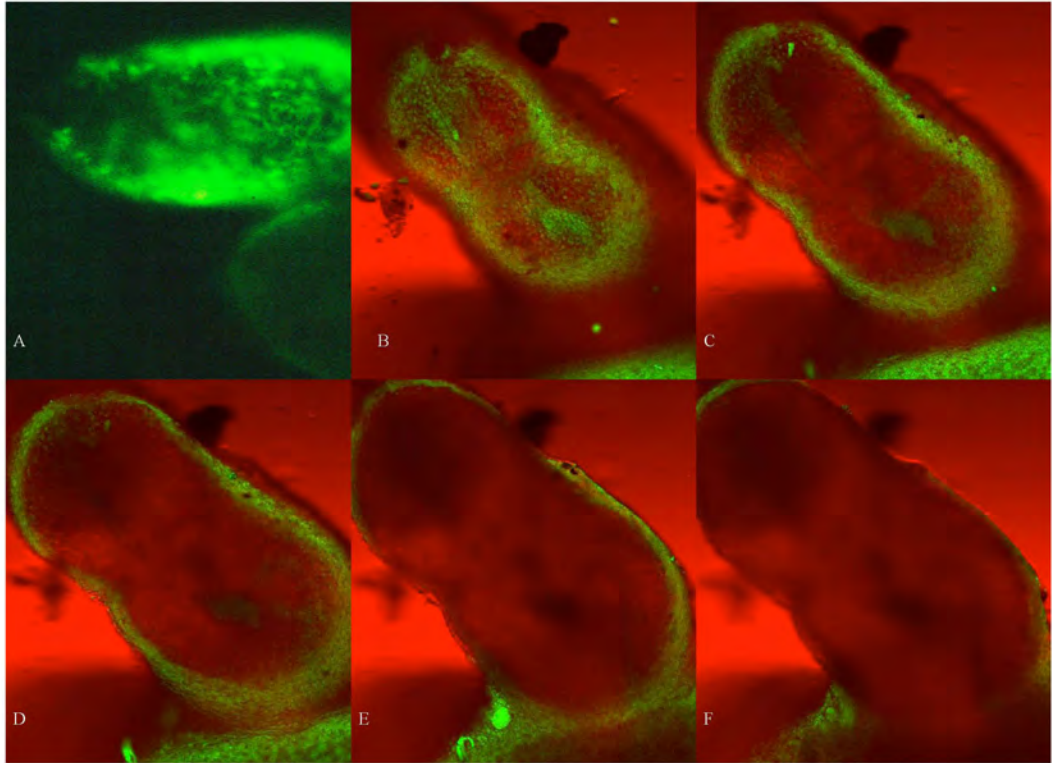


Figure 3

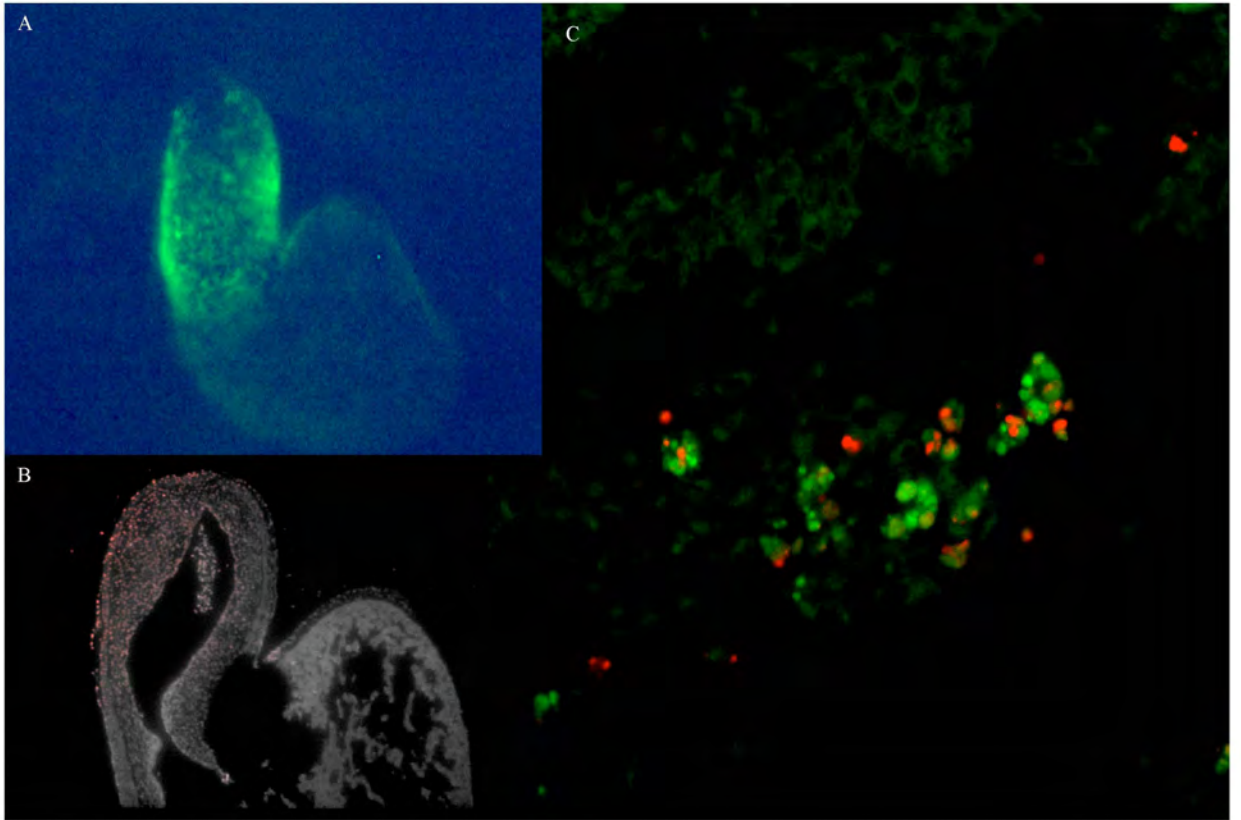
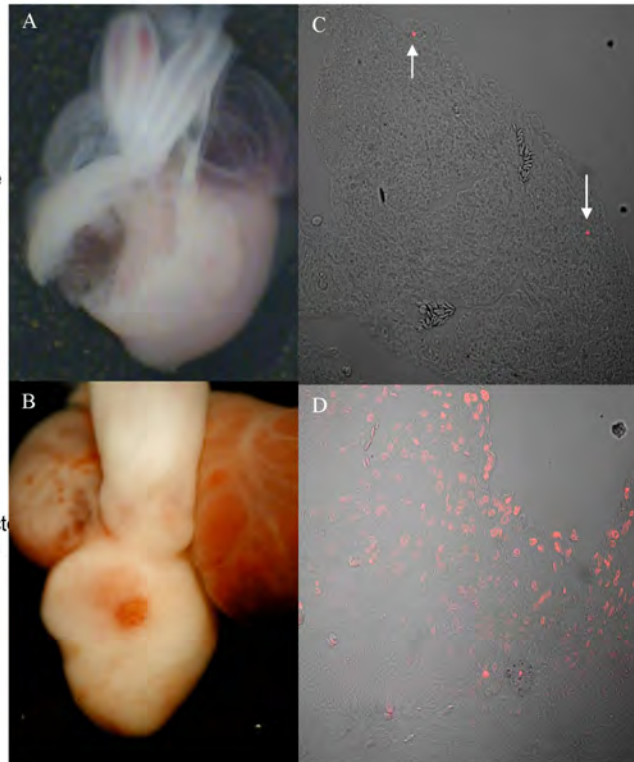


Figure 4

Apoptosis at OFT level

Normal heart injected with vehicle



Altered heart injected with Bay 11-7085

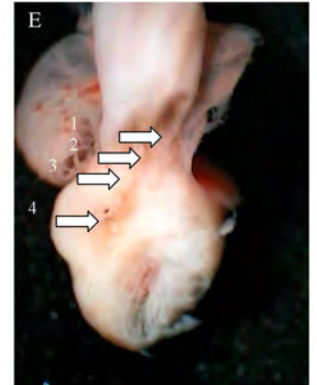


Figure 5

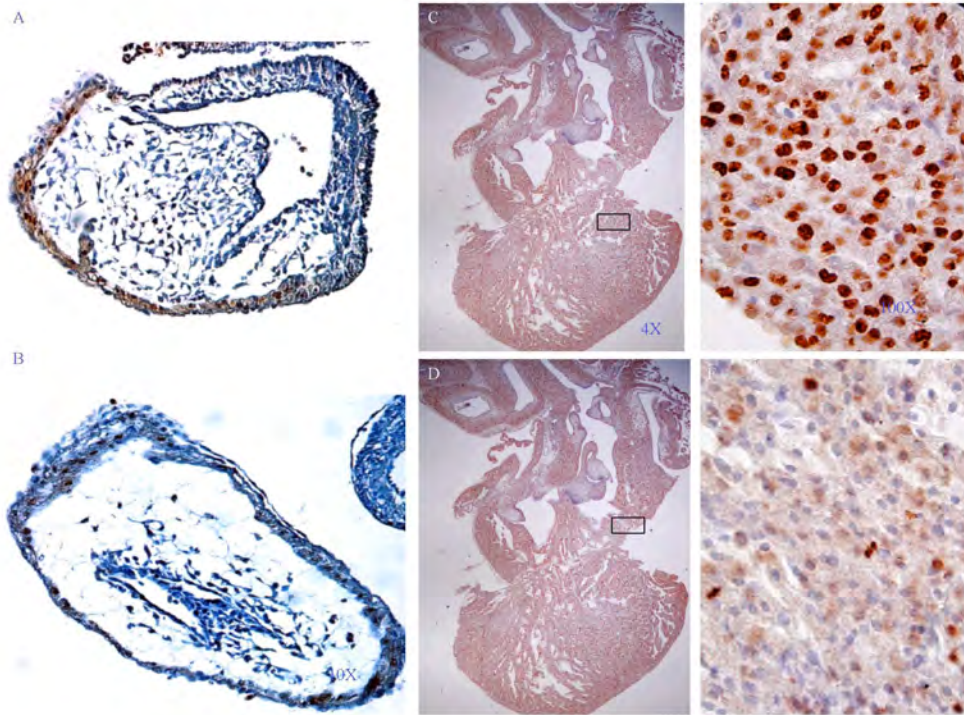


Figure 6

REFERENCES

- Barkett M, Gilmore TD., 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. Nov 22;18(49):6910-24.
- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA., 2002. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci*. Oct 1;22(19):8466-75
- Chiarugi A, 2002. Characterization of the molecular events following impairment of NF-kappaB-driven transcription in neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. Dec 30;109(1-2):179-88.
- Dawn B, Xuan YT, Marian M, Flaherty MP, Murphree SS, Smith TL, Bolli R, Jones WK. 2001 Cardiac-specific abrogation of NF- kappa B activation in mice by transdominant expression of a mutant I kappa B alpha. *J Mol Cell Cardiol*; 33(1): 161-173.
- de la Cruz, M.V., Sanchez, G.C., Arteaga, M.M., Arguello, C., 1977. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *J. Anat.* 123, 661– 686.
- Fisher SA, Langille BL, Srivastava D., 2000. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res*. Nov 10;87(10):856-64. Review.
- Hamburger, V., Hamilton, J.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–92.
- He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci*;3;95(5):2509-14.
- Hernández-Gutierrez S, Hernández F, Zentella A , García I, Ramos-Kuri M, Hernández-Franco and Rojas E. 2006 NF-κB signaling blockade by Bay 11-7085 during early cardiac morphogenesis induces alterations of the outflow tract in chicken Herat. Apoptosis (in press).
- Kelly, R.G., Brown, N.A., Buckingham, M.E., 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev. Cell* 1, 435–440.
- Kirby, M.L., Gale, T.F., Stewart, D.E., 1983. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 220, 1059– 1061.

- Mjaatvedt, C.H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R.A., Kern, M.J., Eisenberg, C.A., Turner, D., Markwald, R.R., 2001. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev. Biol.* 238, 97– 109.
- Pexieder, T. 1975. Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart. *Adv Anat Embryol Cell Biol.*;51(3):3-99.
- Pexieder, T., 1995. The conotruncus and its septation at the advent of the molecular biology era. In: Clark, E.B., Markwald, R.R., Takao, A. (Eds.), *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. Futura Publishing Co., Inc., Armonk, NY, pp. 227– 248.
- Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, Gerritsen ME., 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem.* Aug 22;272(34):21096-103.
- Poelmann RE, Molin D, Wisse LJ, Gittenberger-de Groot AC., 2000. Apoptosis in cardiac development. *Cell Tissue Res.* Jul;301(1):43-52.
- Rothenberg, F., Fisher, S.A., Watanabe, M., 2003. Sculpting the cardiac outflow tract. *Birth Defects Res., Part C. Embryol. Today* 69, 38–45.
- Sallee, D., Qiu, Y., Liu, J., Watanabe, M., Fisher, S.A., 2004. Fas ligand gene transfer to the embryonic heart induces programmed cell death and outflow tract defects. *Dev. Biol.* 267, 309–319.
- Schaefer, K.S., Doughman, Y.Q., Fisher, S.A., Watanabe, M., 2004. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev. Dyn.* 229, 489– 499.
- Song G, Ouyang G, Bao S., 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):59-71.
- Sugishita Y, Watanabe M, Fisher SA 2004. Role of myocardial hypoxia in the remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract. *Dev Biol.* Mar 15;267 (2) : 294-308.
- Sugishita Y, Leifer DW, Agani F, Watanabe M, Fisher SA., 2004. Hypoxia-responsive signaling regulates the apoptosis-dependent remodeling of the embryonic avian cardiac outflow tract. *Dev Biol.* Sep 15;273(2):285-96
- Thompson, R.P., Abercrombie, V., Wong, M., 1987. Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: movements of autoradiographic tattoos during septation. *Anat. Rec.* 218, 434–435.

van den Hoff MJ, van den Eijnde SM, Viragh S, Moorman AF., 2000. Programmed cell death in the developing heart. *Cardiovasc Res.* Feb;45(3):603-20.

Waldo, K.L., Kumiski, D.H., Wallis, K.T., Stadt, H.A., Hutson, M.R., Platt, D.H., Kirby, M.L., 2001. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128, 3179–3188.

Watanabe, M., Choudhry, A., Berlan, M., Singal, A., Siwik, E., Mohr, S., Fisher, S.A., 1998. Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development* 125, 3809– 3820.

Webb, S., Qayyum, S.R., Anderson, R.H., Lamers, W.H., Richardson, M.K., 2003. Septation and separation within the outflow tract of the developing heart. *J. Anat.* 202, 327–342.

Weih F, Durham SK, Barton DS, Sha WC, Baltimore D, Bravo R. 1997. p50-NF-kappaB complexes partially compensate for the absence of RelB: severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-) double-knockout mice. *J Exp Med*; **185**(7):1359-70.

Zou L, Attuwaybi B, Kone BC., 2003. Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Apr;284(4):G713-21. Epub 2002 Dec 4.

DISCUSIÓN:

La presencia de apoptosis durante el desarrollo del corazón ha sido ampliamente estudiada. Muchos de estos estudios se han realizado en la zona del tracto de salida, que es la porción del corazón que conecta los ventrículos al saco aórtico, es una estructura de suma importancia para el establecimiento de la circulación dual, para ello, el tracto de salida sufre un proceso complejo de remodelación a través de su acortamiento y rotación para lo cual se requiere de manera espacio-temporal la eliminación coordinada de cardiocitos por apoptosis durante los estadios 25-30 de HH en el modelo de corazón de embrión de pollo. Sin embargo no todo el tracto de salida sufre apoptosis, de esta observación surge nuestra pregunta del presente trabajo ¿Qué factores pueden prevenir la apoptosis en aquellos cardiocitos del tracto de salida que no sufren apoptosis?

Siendo NF- κ B un factor de transcripción asociado a procesos de apoptosis, comúnmente asociado a generar protección contra la apoptosis en cardiocitos en cultivo, nos preguntamos si NF- κ B podría estar jugando el mismo papel citoprotector *in vivo* durante el desarrollo del corazón. El objetivo fue probar la participación de NF- κ B como un factor clave de citoprotección en zonas adyacentes de apoptosis en el tracto de salida.

Nuestra estrategia para probar nuestra hipótesis fue en primera instancia detectar la presencia de NF- κ B en el corazón, en los estadios estudiados, por lo que uno de nuestros objetivos fue diseñar un vector plasmidico y uno adenoviral con un gen reportero (GFP) sensible a NF- κ B que nos permitiera rastrear la presencia de la forma activa en el corazón, el resultado de ello fue la localización de la

fluorescencia en el tracto de salida. Sin embargo hasta este momento no se sabía cual podría ser la participación de NF- κ B en la regulación de la morfogénesis del corazón, por lo que decidimos inhibir farmacológicamente, la función de NF- κ B *in vivo* con el inhibidor Bay 11-7085. Este inhibidor se inyectó directamente en el corazón y se evaluó su efecto sobre la morfología. Los resultados de estos experimentos, fueron reportados en el primer artículo.

Hasta este momento habíamos aportado evidencias de la importancia que NF- κ B podía tener para el desarrollo del corazón, puesto que la zona donde estamos observando la presencia de la fluorescencia con el gen reportero sensible a NF- κ B era la misma zona donde encontramos las alteraciones cardiacas. Esto nos conducía a otra pregunta ¿NF- κ B podría estar involucrado directamente en estas alteraciones? A pesar de que el inhibidor farmacológico en algunos reportes se ha mencionado que es inespecífico, nosotros, como otros grupos demostramos que en nuestro sistema, podemos modular la actividad de NF- κ B a través de nuestros vectores reporteros usando el Bay 11-7085.

Los resultados de nuestro primer artículo parecían apuntar a que efectivamente NF- κ B juega un papel importante durante la remodelación del tracto de salida, sin embargo la pregunta inicial seguía sin responderse y precisamente uno de nuestros objetivos fue el de localizar zonas apoptóticas y zonas de actividad de NF- κ B (citoprotégidas) en los cardiocitos adyacentes a los focos apoptóticos del tracto de salida. Para ello en un segundo artículo hicimos experimentos en los cuales inyectamos el vector adenoviral sensible a NF- κ B y sobre cortes de corazones normales que expresan la GFP (en verde) en el tracto de salida

llevamos a cabo la detección simultánea de células apoptóticas (en rojo). Estos resultados confirmaron nuestra hipótesis, el factor NF- κ B se expresa en zonas adyacentes a células apoptóticas del tracto de salida. Para demostrar que su papel es citoprotector o antiapoptótico, inhibimos su activación nuevamente con Bay 11-7085, sabiendo que causa alteraciones morfológicas, observamos que los corazones alterados en comparación con los controles hay un incremento muy elevado de los niveles de apoptosis, lo cual significa que si NF- κ B no esta presente, no protege contra la apoptosis.

En conjunto los resultados sugieren que NF- κ B es un factor que suprime la apoptosis, el cual participa como un factor protector de células adyacentes a los focos apoptóticos y que su inactivación esta directamente involucrada con la inducción de alteraciones cardiacas congénitas.

Las alteraciones más frecuentemente encontradas en este trabajo fueron las comunicaciones interventriculares, la estenosis de grandes arterias y las dobles salidas de ventrículo derecho. Es difícil saber porque con un mismo tratamiento (Bay11-7085) se obtienen diferentes tipos de cardiopatías, sin embargo lo que todas ellas tienen en común es que se originan en la misma estructura. Aunque podríamos sugerir que el tratamiento farmacológico en el caso de las estenosis, al inactivar NF- κ B y no estar presente, favorezca a que las células de esa región se mueran y esto causa el adelgazamiento de las arterias. Lo mismo estaría ocurriendo en las comunicaciones interventriculares, que por efecto de la inhibición no se de una proliferación celular suficiente para llegar a cerrar completamente la comunicación. En el caso de las dobles salidas de ventrículo

derecho lo más probable es que no se llevara a cabo una septación adecuada del tracto de salida, proceso que requiere de apoptosis.

Pero quizá la respuesta a esta pregunta no sea tan sencilla, ya que al estar trabajando con un modelo *in vivo* nos enfrentamos a procesos biológicos dinámicos y que durante el desarrollo embrionario transcurren de manera rápida y coordinada en tiempo y espacio, esto se complica aun más cuando se trabaja con un órgano como el corazón que es una estructura compartimentalizada y transcripcionalmente regionalizada.

Particularmente en la región del tracto de salida, que es una estructura de conexión entre los ventrículos y las grandes arterias, podrían existir distintos tipos de poblaciones de cardiocitos o regiones celulares que durante el desarrollo se mueven hacia la parte de ventricular o hacia la parte arterial. Por lo cual, no sabemos el momento exacto de aparición de estas supuestas regiones celulares y quizá, aunque el inhibidor este llegando a la misma zona, pequeñas diferencias en tiempo para nosotros (1-2 horas) al momento de la inyección, en los eventos del desarrollo podrían representar grandes diferencias y de esta manera se pueda estar afectando a unas u otras poblaciones celulares de la misma estructura que pueden generar diferentes alteraciones morfológicas.

Por otra parte, el tracto de salida suele ser una estructura muy delicada, porque la mayoría de las alteraciones congénitas se presentan en esta zona, lo cual nos podría estar hablando de mecanismos de regulación muy estrictos, es obvio que NF- κ B juega un papel importante en esta zona, pero no es el único, de aquí la importancia de conocer más sobre la expresión de factores tejido-específicos que

podieran estar por arriba o por debajo de las vías de señalización de NF- κ B, aunque ya tenemos indicios de por arriba podría estar involucrada la Proteína Kinasa B (PKB/AKT) y por abajo las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) todavía se necesita hacer más estudios de los posibles factores que estarían involucrados en estas intrincadas redes de señalización, no solo en la morfogénesis del corazón sino también en muchas de las enfermedades cardiacas humanas en las que NF- κ B ha sido involucrado.

CONCLUSION:

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan fuertemente la hipótesis planteada, demostrando por primera vez in vivo, a través del uso de vectores reporteros con sitios de unión para κ B y GFP, la participación de NF- κ B como un factor clave de citoprotección en zonas adyacentes de apoptosis en el tracto de salida del corazón de embrión de pollo.

También mostramos que la inhibición de NF- κ B en las zonas de expresión de la GFP, induce un incremento de la apoptosis, lo cual interfiere con el proceso normal de desarrollo y transformación del tracto de salida, mismo que provee los componentes estructurales que forman la conexión ventrículo-arterial, lo cual trae como consecuencia la aparición de alteraciones cardíacas congénitas durante la morfogénesis del corazón, en el embrión de pollo.

BIBLIOGRAFÍA

Baeuerle PA, Henkel T. 1994 Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12:141-79.

Baldwin AS 1996 The NF- κ B and I κ B proteins : new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 649-81

Ballard DW, Dixon EP, Peffer NJ, Bogerd H, Doerre S, Stein B, Greene WC. 1992 The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(5):1875-9

Barkett M, y Gilmore T. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49):6910-24

Barnes PJ, Adcock IM. 1997. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 18(2):46-50.

Beg AA, Baltimore D. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* Nov 1;274(5288):782-4

Beg, AA, Sha, WC., Bronson, RT., Ghosh, S y Baltimore, D. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 376, 177-170.

Bellas RE, FitzGerald MJ, Fausto N, Sonenshein GE. 1997. Inhibition of NF-kappa B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Pathol* Oct;151(4):891-6

Bergmann MW, Loser P, Dietz R y Harsdorf R. (2001) Effect of NF κ B inhibition on TNF α induced apoptosis and downstream pathway in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1223-1232

Bours V, Bonizzi G, Bentires-Alj M, Bureau F, Piette J, Lekeux P, Merville M. 2000. NF-kappaB activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology.* 153(1-3):27-38.

Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. 1999. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 45(1):7-17

Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. 1996. Site-specific phosphorylation of I kappa B alpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell.* 84(6):853-62.

- Cheng G., Wessels A. Gourdie G. y Thompson R. 2002. Spationtemporal and Tissue Specific Distribution of Apoptosis in the Developing Chick Heart. *Developmental Dynamics* 223 (1): 119-133.
- Craig R, Wagner M, McCardle T, Craig AG, Glembotski CC. 2001. The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 276(40): 37621-9.
- de Moissac, D., Mustapha, S., Greenberg, A. H. y Kirshenbaum, L. A. 1998. Bcl-2 activates the transcription factor NFkB through degradation of cytoplasmic inhibitor Ikbk. *J Biol Chem* 273 (37) : 23946-23951
- de Moissac, D., Sheng, H. y Kirshenbaum, L. A. 1999. Linkage of the BH4 domain of Bcl-2 and the Nuclear Factor kB signaling pathway suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 274 (41): 29505-29509.
- Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Brenner JI, Neill CA, Perry LW, Hepner SI, Downing JW. 1985. Maternal mitral valve prolapse and congenital heart disease in the offspring. *Am Heart J* 110(4): 899-900.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16: 225-60
- Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. 1996. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene.* 13(7):1367-78.
- Hamburger V, and Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88: 49-92.
- Higuchi Y., Otsu K., Nishida K., Hirotani S., Nakayama H., Yamaguchi O., Matsumura Y., Ueno H., Tada M., Hori M. 2002. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 34(2):233-40.
- Karin M. 1999. The beginning of the end: I-kappa-B kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 274 (39): 27339-42.
- Kelly RG, Zammit PS, Buckingham ME.,1999. Cardiosensor mice and transcriptional subdomains of the vertebrate heart. *Trends Cardiovasc Med.* 9(12): 3-10.
- Keyes WM, Sanders EJ. 2002. Regulation of apoptosis in the endocardial cushions of the developing chick heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(6):C1348-60.

- Kirshenbaum LA. 2000. Bcl-2 intersects the NFkappaB signalling pathway and suppresses apoptosis in ventricular myocytes. *Clin Invest Med.* 23(5):322-30.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huan, C.C y Kain, S. R. 1998. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273(52):34970-5.
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV. 1998. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Nat Acad Sci U S A* 95 (7): 3792-7.
- Marianneau P., Cardona A., Edelman L. Deubel V. y Después P. 1997. Dengue Virus Replication in Human Hematoma Cells Activates NF-kB in Turn Induces Apoptotic Cell Death. *Journal of Virology Apr.* 3244-3249.
- Martinsen BJ. 2005. References guide to stages of chick heart embryology. *Dev Dyn* 233:1217-37.
- Mayo M, y Baldwin A. 2000. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogénesis and cáncer therapy. *Biochim.Biophy. Acta* 1470 (2):55-62
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* 278(5339):860-6.
- Mercurio F, Murray BW, Shevchenko A, et al. 1999. I-kappa-B kinase (IKK)-associated protein I, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 19 (2): 1526-38.
- Miyamoto S, Verma IM. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer Res.* 66:255-92.
- Mustapha S, Kirshner A, De Moissac D y Kirshenbaum L. 2000. A direct requirement of nuclear factor kB for suppression of apoptosis in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (3): H939-H945
- Peters RT, Liao SM, Maniatis T. 2000. IKK-epsilon is part of a novel PMA-inducible Ikappa-B kinase complex. *Mol Cell* 5(3): 513-22.
- Purcell N., Tang G., Yu C., Mercurio F., DiDonato J. y Lin A. 2001. Activation of NF-kB is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *PNAS* 98(12):6668-73.
- Pexieder T: Mechanisms of Cardiac Morphogenesis and Teratogenesis. En *Perspectives in Cardiovascular Research*, Vol 5, Ed Raven Press, New York, 1981, pp. 93-99.

Rothenberg F., Hitomi M., Fisher S. y Watanabe M. 2002. Initiation of Apoptosis in the Developing Avian Outflow Tract Myocardium. *Devl Dyn* 223(4): 469-482.

Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M. 1998. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*. 395(6699):297-300

Sen R, Baltimore D. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 47(6):921-8.

Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, Durnin MH, Dalrymple SA, Hardy KL, Goeddel DV. 1999. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF kappa B activation in IKK-beta- deficient mice. *Immunity* 10(4):421-9

Thurberg BL, Collins T. 1998. The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 9(5):387-96.

Valen G., Yan Z. y Hansson G. 2001. Nuclear Factor Kappa-B and the Heart. *J Am Coll Cardiol* 38(2) 307-314.

Van den Hoff, M., Van den Eijned, S. M., Viragh, S y Moorman, A. F. 2000. Programmed cell death in the developing heart. *Cardiovasc Res* 45, 603-620.

Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*. 93(7):1231-40.

Watanabe M, Jafri A, Fisher S. 2001. Apoptosis Is Required for the Proper Formation of the Ventriculo-Arterial Connections. *Dev Biol* 240(1): 274-288

Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*. 91(2):243-52.

El papel del factor de transcripción NF-κB en la célula cardíaca

Salomón Hernández Gutiérrez,^{***} Emilio Rojas del Castillo^{**}

Resumen

Para la biología de hoy las vías de señalización intracelular que controlan los procesos entre la vida y la muerte celular son de gran interés. Al respecto, el NF-κB destaca como un factor de transcripción decisivo de respuesta rápida que participa en la activación de las vías de señalización de la muerte celular programada. Lo relevante es que sus efectos tienen consecuencias en el desarrollo normal y/o la homeostasis en muchas células o tejidos, que incluyen entre otros al sistema inmune, los folículos capilares, apéndices epidermales, el riñón y el sistema nervioso. En esta revisión analizamos el papel central que juega el factor de transcripción NF-κB en el funcionamiento normal de la célula cardíaca y sus implicaciones en algunas de las patologías cardíacas más frecuentes como: el daño por isquemia-reperusión, la isquemia precondicionada, la hipertrofia, la aterosclerosis, y el paro cardíaco. El NF-κB comúnmente funciona como un agente citoprotector, aunque hay algunos casos en los cuales resulta ser pro-apoptótico dependiendo del estímulo y del contexto celular. Se han logrado avances significativos a nivel molecular, que han permitido entender su modo de acción y el papel interactivo que juega con otros factores claves. Estos estudios han identificado muchos genes anti-apoptóticos y pro-apoptóticos regulados por la actividad del NF-κB abriendo novedosas aproximaciones que se pueden hacer sobre sus efectos en el desarrollo de patologías cardíacas.

Summary

ROLE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB IN THE CARDIAC CELL

The signaling pathways that control the life-death switch of a cell are a prime interest in Modern Biology. To this respect, NF-κB has emerged as a decisive transcription factor in the cell's response to apoptotic challenge and its effects on apoptosis have far-reaching consequences for normal development and/or homeostasis in many cells and tissues, including the immune system, hair follicles, and epidermal appendages, the liver, and nervous system. In this review we analyze the pivotal role of the transcription factor NF-κB in the normal functioning of the cardiac cell and its implication on some of the most frequent cardiac pathologies, such as ischemia-reperfusion injury, ischemic precondition, hypertrophy, atherosclerosis and cardiac arrest. While NF-κB is commonly found to be cytoprotective, there are a number of instances where it is proapoptotic depending on the inducing stimulus and the cell context. Significant progress has been made in understanding its mode of action and its interplay with other key factors. These studies identified many anti- and pro-apoptotic NF-κB regulated genes that mediate its activity, these important new insights fuel hope that novel approaches will be developed to control the effects of NF-κB in cardiac pathologies.

(Arch Cardiol Mex 2005; 75: 363-370)

Palabras clave: Cardiomiocitos. Apoptosis. Factor de transcripción nuclear κB (NF-κB).

Key words: Cardiomyocytes. Apoptosis. Nuclear factor κB (NF-κB).

^{***} Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Medicina Universidad Panamericana.

^{**} Departamento de Toxicología Ambiental y Medicina Genómica IIB-UNAM.

Correspondencia: Dr. Emilio Rojas del Castillo. Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. Circuito Escolar s/n Ciudad Universitaria. 04510 México DF. Tel. 56-22-91-76. E-mail: emilior@servidor.unam.mx

Recibido: 16 de febrero de 2004

Aceptado: 04 de mayo de 2005

Introducción

En un organismo, los diversos tipos celulares que constituyen sus órganos y tejidos, difieren dramáticamente. Estas diferencias no son más que un simple reflejo de cambios en la expresión de sus genes. Como bien sabemos, el ADN de un organismo codifica para todas las moléculas protéicas que se requieren para crear, dar forma y función a una célula. Todo ello gracias a los principios básicos de control en la expresión diferencial, a través de mecanismos finos de regulación donde los factores de transcripción son determinantes ya que finalmente éstos son los encargados de modular la expresión genética.

A nivel molecular sabemos que muchas patologías tienen su origen en alteraciones en los niveles de expresión de algunos genes, las cardíacas no son la excepción. Las enfermedades cardíacas son la primera causa de muerte a nivel mundial, prácticamente todas terminan con un infarto al miocardio. De muchas de ellas se conocen las causas, pero no del todo los mecanismos moleculares que las ponen en marcha.

Conocer cómo se lleva a cabo el control a nivel molecular dentro de la célula cardíaca, podría ayudarnos a entender mejor la patología de algunas enfermedades causadas por la desregulación en la expresión y la actividad transcripcional. Dentro de estos factores, el factor de transcripción de la cadena κ de anticuerpos de células B (NF- κ B), parece jugar un papel clave en diversas patologías cardíacas como: el daño por isquemia-reperusión y enfermedades que tienen en común la participación de tejido de músculo liso y endotelial de vasos y arterias (el infarto congestivo cardíaco, los síndromes coronarios agudos, la angina de pecho, la hipertrofia y la aterosclerosis) y al parecer con enfermedades congénitas como tetralogía de Fallot.¹

I. La activación y la función del NF- κ B

El NF- κ B se ha definido como un factor de transcripción ubicuo detectado de forma inactiva casi en todas las células y cuya activación involucra la regulación de una amplia variedad de genes.²⁻⁴ La familia de factores de transcripción eucarióticos Rel/NF- κ B está compuesta por proteínas relacionadas estructuralmente como son las p50, p52, p65 (Rel A), c-Rel y RelB. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de un dominio común conservado llama-

do RHD (Rel Homology Domain). El dominio RHD tiene varias funciones: a través de él, los miembros de esta familia se unen y forman homó o hetero-dímeros, las formas más comunes están constituidas por los hetero-dímeros p50, p65/ o p52/p65.^{3,5} Este dominio además de ser el sitio de unión para sus inhibidores: los I κ Bs, contiene las secuencias de localización nuclear y las secuencias de unión al ADN.^{6,7}

La actividad del NF- κ B depende de su localización celular. Si está en el citoplasma se encuentra formando un complejo trimérico con alguno de sus inhibidores (I κ B) que oculta sus secuencias de destino nuclear y es por tanto, transcripcionalmente inactivo. Cuando el I κ B se fosforila, éste es ubiquitinilado, lo que permite su reconocimiento por el proteosoma que lo degrada, liberando al dímero del NF- κ B (por ejemplo: p50/p65) que se transloca al núcleo, donde activa a sus genes blanco.

Los I κ Bs fueron identificados originalmente como factores que inhiben la actividad del NF- κ B debida a una interacción proteína-proteína.⁸ Los I κ B constituyen una familia de al menos 6 miembros: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , p105, p100 y Bcl3, que están involucrados en el control de la activación del NF- κ B.^{3,5,9} Los I κ Bs se unen a los dímeros de NF- κ B a través de motivos conservados de ankirina y bloquean estéricamente la función de sus secuencias de localización nuclear, lo que permite su retención en el citoplasma. Para que el NF- κ B tenga acceso a su sitio de acción, el núcleo; el complejo NF κ B/I κ B debe ser disociado a través de la fosforilación de su inhibidor. Este proceso que en primera instancia parece tan sencillo, requiere la participación interactiva, también guiada por procesos de fosforilación de proteínas citoplásmicas que se encuentran por arriba en la vía de activación del NF- κ B, llamadas cinasas de los inhibidores de I κ B (IKK). Los I κ Bs mejor estudiados son el α y el β , ambos se fosforilan en respuesta a diferentes estímulos en los residuos de serinas: S32 y S36. Una vez que los I κ Bs se han fosforilado, se inicia un proceso de ubiquitinación y de su degradación en el proteosoma. Este mecanismo libera al NF- κ B, ya que al desaparecer el inhibidor, se descubre la secuencia de localización nuclear y permite al dímero ser translocado al núcleo, quedando de forma libre para unirse a promotores de genes con sitios de unión κ B e iniciar la transcripción de los mismos.^{6,7,10,11}

II. El NF- κ B y los cardiocitos en cultivo

Se ha demostrado que el movimiento del NF- κ B hacia el núcleo, entre otras cosas, es un requisito para la supervivencia ante determinados estímulos o señales de estrés que desencadenan la muerte celular programada o apoptosis. Estos resultados se han observado, usando como modelo cultivos primarios de cardiocitos murinos neonatos *in vitro*, bajo las condiciones de estrés más comunes en el adulto; el estrés oxidativo y la sobrecarga.

Otro ejemplo donde el NF- κ B participa en la protección contra la apoptosis en células cardíacas, es cuando hay falta de oxigenación del miocardio (hipoxia), por lo que es necesario montar una respuesta que evite la activación del programa de muerte en los cardiocitos y uno de los efectores de esta respuesta anti-apoptótica es una citocina liberada de forma autocrina llamada cardiotropina 1; sin embargo, para que esta molécula pueda actuar se requiere la translocación nuclear del NF- κ B.¹²

En el caso de cardiocitos ventriculares en cultivo, cuando se impide la translocación del NF- κ B al núcleo por la presencia de una forma mutada del I κ B α que no puede ser fosforilada,¹³ que actúa como una forma dominante negativa, o bien con el uso de un inhibidor de la actividad del proteasoma,¹⁴ se pierde toda capacidad de respuesta anti-apoptótica ante la presencia de sustancias como la cicloheximida, que promueve la muerte celular programada en ausencia de la función del NF- κ B.

En ninguno de los casos anteriores se conoce el mecanismo por el cual el NF- κ B promueve la supervivencia. La transcripción de algunos genes de supervivencia que contienen elementos de unión para el NF- κ B en sus promotores es la idea más apoyada, a pesar de que se ha demostrado que la activación del NF- κ B en cardiocitos, no modifica los niveles celulares de los candidatos más fuertes como las proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs) 1 y 2 o los niveles de genes inhibitorios de la apoptosis de la familia del Bcl-2.¹⁴ Esta evidencia no descarta la posible participación del NF- κ B en el efecto protector, ya que se ha observado que es posible que no ejerza su efecto sobre moléculas que se encuentran por arriba de la cascada de señalización, sino más bien sobre moléculas por debajo de la cascada, como sugieren experimentos en los que se ha observado que la transfección del Bcl-2 dismi-

nuye los niveles del I κ B α y en consecuencia, favorece un incremento del NF- κ B en el núcleo¹⁵ (Fig. 1).

La otra condición relevante en donde se ha observado la participación del NF- κ B es en la hipertrofia inducida por la angiotensina II, la fenilefrina y la endotelina 1 provocando una estimulación de la actividad del NF- κ B que depende de la degradación de las proteínas I κ B α . Tal activación es necesaria para la producción de dos de los principales marcadores del fenotipo hipertrófico que son la producción del factor natriurético atrial y el incremento en la talla de los cardiocitos. De hecho, la sola sobre-expresión de las sub-unidades p65 o c-Rel provoca por sí misma un incremento del tamaño celular.¹⁵ Por otra parte, es importante destacar que la inducción de la hipertrofia también puede ocurrir por estimulación con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en cardiocitos aislados, y ésta es mediada por la activación del NF- κ B a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).^{16,17}

III. El NF- κ B y el corazón

Se ha logrado tener progresos significativos en esclarecer los mecanismos moleculares para demostrar el papel clave que tiene el NF- κ B en algunas patologías cardíacas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los cardiocitos en cultivo, donde NF- κ B se destaca por su papel anti-apoptótico, en algunas alteraciones cardíacas como la isquemia-reperfusión, el rechazo a trasplante, los síndromes coronarios agudos y la aterosclerosis, el NF- κ B parece tener una función pro-apoptótica,¹ sólo en el caso de la precondición isquémica tiene una función anti-apoptótica.¹

Aunque todavía no se puede confirmar una relación casual entre apoptosis en los cardiocitos y la difusión cardíaca, la controversia continúa a pesar de contar ya con algunos modelos. A continuación analizaremos brevemente el papel de este factor de transcripción en algunas de estas patologías.

III.1 La isquemia-reperfusión

La isquemia-reperfusión (I/R) provoca apoptosis en las células de corazones de rata. También se sabe que la I/R induce rápidamente la activación de NF- κ B en el miocardio,¹⁸⁻²⁰ incluso se ha observado un incremento en la expresión de este factor, en humanos con cirugías a corazón abier-

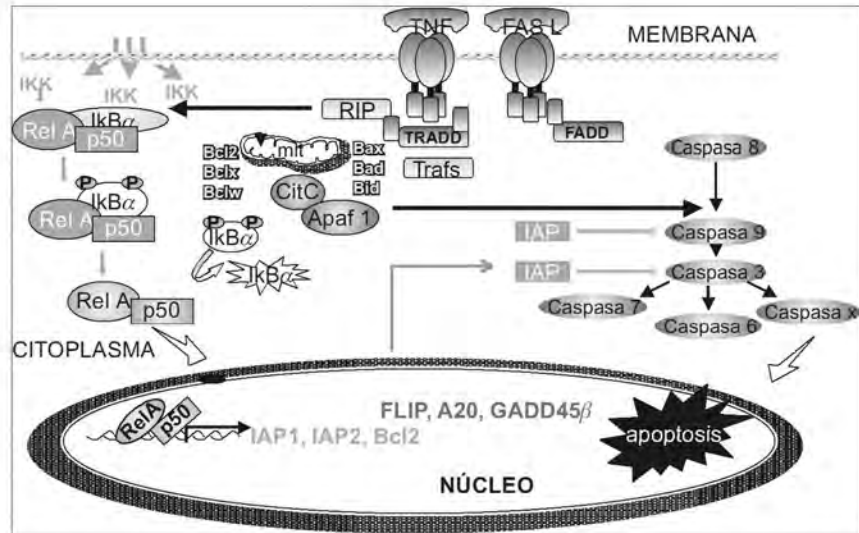


Fig. 1. Posible mecanismo de protección contra la apoptosis en cardiocitos. Una vez que NF- κ B ingresa al núcleo, puede activar genes cuyos productos bloquean el paso de la señal apoptótica de la vía mediada por receptores (extrínseca) como las IAPs que inactivan a las caspasas, o activar genes anti-apoptóticos como el Bcl2 de la vía intrínseca, que impide la liberación del citocromo c de la mitocondria. Recientemente, se ha visto en corazones infartados una disminución en la expresión de algunos genes anti-apoptóticos como FLIP, A20 Y GADD45 β que pueden ser activados por el NF- κ B.

Abreviaturas:

Cinasa del inhibidor de I κ B (IKK), Inhibidor κ B α (I κ B α), Rel A unido a p50 (NF- κ B), Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAP), Proteína de Células de Linfoma B Tipo 2 (Bcl2), Proteína Inhibidora de FLICE (FLIP), Proteína inductora de Daño al ADN y Detención del Crecimiento (GADD45), Proteína Anti-apoptótica (A20), Caspasa (Proteasa Cistein-Aspartato), Mitocondria (mit), Proteínas Anti-apoptóticas (Bcl2, Bclx, Bclw), Proteínas Pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bid), Citocromo c (Cit c), Factor Activador de la Proteasa Apoptótica (Apaf 1), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Ligando de Fas (Fas L), Proteína que Interactúa con el Receptor (RIP), Receptor de TNF Asociado a Dominios de Muerte (TRADD), Factores asociados al TNFR (Trafs), Dominio de Muerte Asociado a FAS (FADD).

to.¹ En este caso, el NF- κ B no pareciera jugar un papel protector, ya que estaría transcribiendo genes de citocinas y moléculas de adhesión (ICAM1, VCAM y ELAM1),²¹ que más bien tienen que ver con procesos de tipo inflamatorio, que son activados en el área donde se localizan los endotelios que transportan el flujo sanguíneo y no tanto por los cardiocitos. No obstante los avances en citoprotección, durante las rutinas de cirugía y trasplante, la I/R inevitablemente provoca disfunción cardíaca. Los esfuerzos por minimizar el daño por I/R se han enfocado a la administración de bloqueadores de canales de calcio, agentes de adhesión, antineutrófilos, antioxidantes²² y recientemente se han usado inhibidores del proteosoma o vectores virales que codifican péptidos con sitios de unión para NF- κ B.²³ Así mismo, se ha utilizado la introducción de fragmentos de ADN de doble cadena como señuelos para unir los dímeros activos del NF- κ B.^{23,24} El uso de estas secuencias *ex vivo* bloquea la expresión de moléculas de adhesión, el daño por re-

perfusión, el rechazo y sobre todo prolonga la supervivencia de un injerto de arterias coronarias en ratas.²⁵

Una isquemia aguda seguida de una reperfusión prolongada ha mostrado inducir apoptosis en cardiocitos. Sin embargo, Maulik y colaboradores demostraron que la adaptación del miocardio a la isquemia inducida en periodos cortos, seguida por breves periodos de reperfusión, reduce la apoptosis y disminuye la expresión de los genes Bcl2, AP1 y NF- κ B.²⁶

III.2 La precondition isquémica

Algunos trabajos han permitido la identificación de un potente mecanismo cardioprotectivo endógeno contra la I/R llamado precondition isquémica (IP).²⁷ Este fenómeno representa una respuesta cardio-adaptativa a la I/R y permite al corazón ser más tolerante a periodos prolongados de daño por isquemia. Aunque el fenómeno de IP es bien conocido, los mecanismos moleculares que lo median son controvertidos. Hay re-

sultados que sugieren que el NF- κ B juega un papel esencial en la respuesta de adaptación del miocardio a la isquemia. Morgan y colaboradores demostraron en corazones de conejo que el NF- κ B se activa en la IP y se inhibe durante una I/R posterior.²² Se ha demostrado que la adaptación del miocardio a la isquemia podría estar controlada a nivel molecular al dispararse una vía de señalización regulada por las cinasas p38 MAP y MAPKAP2.²⁶ Sin embargo, no está claro y aún queda por definirse si durante el daño de I/R se activa el NF- κ B en los cardiocitos y si realmente esta activación en el cardiocito contribuye al deterioro de las células, ya que parece existir una confusión conceptual en cuanto al tipo celular en el que se activa el NF- κ B, pues todo parece indicar que su activación ocurre en las células del endotelio, lo que nos deja la impresión de que las moléculas características de la reacción inflamatoria (como selectina E, ICAM1 o VCAM1) son las que se asocian al daño al miocardio. El papel que podría estar jugando el NF- κ B en la I/R y en la I/P se esquematiza en la *Figura 2*, que al parecer dependería de la intensidad del estímulo inducido por el estrés oxidativo, intenso o moderado respectivamente.

La cardioprotección también puede simularse mediante estrés oxidativo causado por hiperoxia como lo muestra el trabajo de Tahepold y cols.²⁸ Ellos reportan que la exposición de corazones de rata a hiperoxia (sometidos a una atmósfera de oxígeno del 95% durante una hora, y después a una isquemia global de 25 minutos y 60 minutos de reperfusión), genera la protección del corazón contra daños producidos por la isquemia y que los efectos citoprotectores de la hiperoxia dependen de la activación del NF- κ B.

III.3 Hipertrofia

La hipertrofia cardíaca es otra condición donde el NF- κ B se ha visto involucrado, participando activamente en el incremento del tamaño celular, no obstante, en condiciones normales los cardiocitos son células terminalmente diferenciadas que difícilmente llegan a proliferar en el corazón.²⁹ En respuesta a varios estímulos extracelulares, los cardiocitos pueden crecer de manera hipertrofica, un evento que es caracterizado por el incremento de tamaño celular, incremento en el contenido de proteínas contráctiles como las miosinas, así como también la expresión de genes embrionarios como el factor de crecimiento natriurético atrial (ANF).^{16,30} Purcell y colabora-

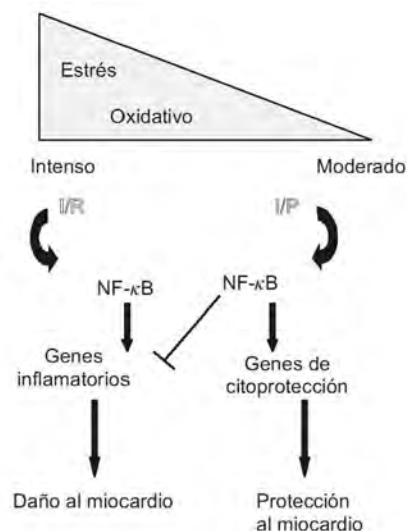


Fig. 2. Efecto paradójico en la activación del NF- κ B. En la Isquemia Reperfusión (I/R) hay un estímulo intenso generado por estrés oxidativo que permite la transcripción de proteínas pro-inflamatorias en las células endoteliales y causa daño al miocardio. Si por el contrario se da un estímulo moderado como el que sucede en la Isquemia Pre-condicionada I/P, NF- κ B activa genes anti-apoptóticos y el miocardio recibe protección. Adicionalmente en la I/P el NF- κ B puede inhibir la activación de los genes inflamatorios que en la I/R ocasionan daño al miocardio.

dores fueron los primeros en demostrar que la activación de NF- κ B es necesaria y suficiente para inducir una respuesta hipertrofica a través de proteínas G acopladas a receptores en cardiocitos aislados.¹⁶ De igual manera, Higuchi y colaboradores han demostrado que la inducción de hipertrofia por el TNF α en cardiocitos en cultivo es dependiente de la activación de NF- κ B.¹⁷ A pesar de que la hipertrofia es una respuesta de naturaleza adaptativa y compensatoria cuando el corazón es sometido a exceso de trabajo, una hipertrofia cardíaca sostenida puede llevar a ocasionar fallas cardíacas.³⁰ Algo que ha impedido el avance del estudio *in vivo* de la hipertrofia es la carencia de modelos experimentales, es por ello que aún muchos estudios no son concluyentes en cuanto a la relación que existe entre el NF- κ B y la hipertrofia cardíaca; y por lo tanto, los mecanismos responsables de la hipertrofia y la transición hacia las fallas cardíacas son pobremente entendidas.

III.4 La aterosclerosis

Durante la patogénesis de la aterosclerosis, también se ha involucrado al factor NF- κ B.^{31,34} La

aterosclerosis es una enfermedad crónica inflamatoria de las arterias, provocada por múltiples factores que incluyen la hipertensión, la diabetes, el consumo de cigarro y los desórdenes metabólicos de las lipoproteínas,³⁵ que puede terminar con la vida del paciente con un ataque al corazón o una insuficiencia cardíaca. La aterosclerosis actualmente se considera como una respuesta exagerada de daño producida en la pared de los vasos que se caracteriza por la presencia de procesos inflamatorios y proliferación fibrocelular.³³ En corazones humanos con aterosclerosis, se ha visto al NF- κ B activo, está presente en las áreas fibrosas y ateromatosas de lesiones ateroscleróticas mientras que en áreas de vasos que carecen de aterosclerosis hay poco o está inactivado.³⁴

El NF- κ B puede ser activado por diversos estímulos pro-aterogénicos (citocinas inflamatorias, lipopolisacáridos, estrés oxidativo y tensión mecánica). La producción de múltiples citocinas y moléculas de adhesión, que en parte son controladas por la activación del NF- κ B son importantes en la formación temprana de lesiones por la aterosclerosis y la generación de señales de supervivencia podría ser determinante para la progresión de la lesión.¹¹

III.5 Los infartos

En experimentos con corazones de rata y humanos con alteraciones del ventrículo izquierdo donde el miocardio ha sufrido una remodelación por infarto, el NF- κ B y el API están crónicamente activados. Estos hallazgos son importantes porque involucran rutas de activación del NF- κ B y el API *in vivo* durante los procesos de remodelación cardíaca.³⁵

En estudios recientes se ha analizado la expresión de genes por micro-arreglos y se han visto cambios en corazones con isquemia e infartos y en corazones normales. Los resultados muestran una disminución en la expresión de genes anti-apoptóticos: GADD 45 β (growth arrest and DNA damage-inducible), FLICE (FLIP inhibitory protein) y el gen de la proteína A20, los cuales son inducidos por el TNF α a través de la activación de la vía del NF- κ B (*Fig. 1*). Los resultados también muestran incrementos en la expresión de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), así como también decrementos en la expresión del receptor 1 del TNF α , el cual activa el NF- κ B,³⁶ lo cual sugiere un papel importante de este factor de transcripción en infartos al miocardio.

IV. Perspectivas

Las enfermedades cardíacas son la primera causa de muerte a nivel mundial, prácticamente todas terminan con un infarto al miocardio. De muchas de ellas se conocen las causas, pero se desconoce a profundidad cuáles pueden ser los mecanismos moleculares que las originan. Es importante entender estos mecanismos, en particular los que dependen de la activación de factores de transcripción como NF- κ B que le permiten al cardiocito activar, por medio de diferentes estímulos, programas genéticos que traen consigo una amplia gama de posibilidades de respuesta.

El NF- κ B es un factor de transcripción que parece jugar un papel clave en patologías cardíacas, por lo que mantenerlo inactivo en el citoplasma con el uso de drogas o por la transferencia de genes en las enfermedades donde se encuentra muy activo, ha ayudado a impedir que éstas progresen. Sin embargo, este efecto es transitorio ya que en el momento que desaparece el mecanismo que mantiene inactivo al NF- κ B, éste nuevamente se vuelve a activar.

Dado que son múltiples las vías a través de las cuales el NF- κ B puede actuar, sería importante identificar a cada una de ellas de forma independiente con la finalidad de bloquear de manera selectiva el paso de la señal del estímulo que provoca una alteración cardíaca, donde la participación del NF- κ B es activa. Por ejemplo, una posibilidad interesante consiste en conocer más a fondo los mecanismos de activación de NF- κ B que regulan la expresión de proteínas anti-apoptóticas para desarrollar estrategias donde se puedan encender estas vías en los cardiocitos en camino de apoptosis.

En los próximos años sin lugar a dudas, la tarea más fuerte será entender los procesos celulares de las interacciones que ocurren en una misma área cardíaca entre células del músculo liso, endoteliales, fibroblastos y cardiocitos, en donde la comunicación por señales paracrinas es fundamental. Quizá esto podría ayudarnos a entender porqué a veces el NF- κ B activa genes anti-apoptóticos y en otras ocasiones promueve la expresión de genes pro-inflamatorios, o la correlación que existe entre la alta actividad del NF- κ B y la aterosclerosis y el progreso de la enfermedad. La pregunta será ¿La actividad del NF- κ B en otras poblaciones celulares afecta directamente a los cardiocitos? no se sabe, pero al final la consecuencia en el corazón como órgano en su conjunto es la misma, la presencia de la patología cardíaca.

Referencias

1. VALEN G, YAN Z, HANSSON G: *Nuclear Factor Kappa-B and the Heart*. J Am Coll Cardiol 2001; 38(2): 307-314.
2. SEN R, BALTIMORE D: *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. Cell 1986; 47(6): 921-928.
3. BALDWIN AS: *The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol 1996; 14: 649-681.
4. MIYAMOTO S, VERMA IM: *Rel/NF-kappa B/I kappa B story*. Adv Cancer Res 1995; 66: 255-292.
5. BALLARD DW, DIXON EP, PEPPER NJ, BOGERD H, DOERRE S, STEIN B, ET AL: *The 65-kDa subunit of human NF-kappa B functions as a potent transcriptional activator and a target for v-Rel-mediated repression*. PNAS 1992; 89(5): 1875-1879.
6. CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X, DEMERS LM: *New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases*. Clin Chem 1999; 45(1): 7-17.
7. GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB: *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol 1998; 16: 225-260.
8. BAEUERLE PA, HENKEL T: *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol 1994; 12: 141-179.
9. BOURS V, BONIZZI G, BENTIRES-ALJ M, BUREAU F, PIETTE J, LEKEUX P, ET AL: *NF-kappaB activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment*. Toxicol 2000; 153(1-3): 27-38.
10. BARNES PJ, ADCOCK IM: *NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy*. Trends Pharmacol Sci 1997; 18(2): 46-50.
11. THURBERG BL, COLLINS T: *The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol 1998; 9(5): 387-396.
12. CRAIG R, WAGNER M, MCCARDLE T, CRAIG AG, GLEMBOTSKI CC: *The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B*. J Biol Chem 2001; 276(40): 37621-37629.
13. MUSTAPHA S, KIRSHNER A, DE MOISSAC D, KIRSHENBAUM L: *A direct requirement of nuclear factor κ B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279: H939-H945.
14. BERGMANN MW, LOSER P, DIETZ R, HARSDFOR R: *Effect of NF- κ B inhibition on TNF α induced apoptosis and downstream pathway in cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 1223-1232.
15. DE MOISSAC D, SHENG H, KIRSHENBAUM L: *A Linkage of the BH4 domain of Bcl-2 and the Nuclear Factor κ B signaling pathway suppression of apoptosis*. J Biol Chem 1999; 274 (41): 29505-29509.
16. PURCELL N, TANG G, YU C, MERCURIO F, DIDONATO J, LIN A: *Activation of NF- κ B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes*. PNAS 2001; 98(12): 6668-6673.
17. HIGUCHI Y, OTSU K, NISHIDA K, HIROTANI S, NAKAYAMA H, YAMAGUCHI O, ET AL: *Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol 2002; 34(2): 233-240.
18. LI C, BROWDER W, KAO RL: *Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfused rat heart*. Am J Physiol 1999; 276: H543-H552.
19. CHANDRASEKAR B, FREEMAN GL: *Induction of nuclear factor κ B and activation protein-1 in post-ischemic myocardium*. FEBS Lett 1997; 401: 30-34.
20. SHIMIZU N, YOSHIYAMA M, OMURA T, HANATANI A, KIM S, TAKEUCHI K: *Activation of mitogen activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats*. Cardiovasc Res 1998; 38: 116-124.
21. SUN B, FAN H, HONDA T, FUJIMAKI R, LAFOND-WALKER A, MASUI Y, ET AL: *Activation of NF kappa B and expression of ICAM-1 in ischemic-reperfused canine myocardium*. J Mol Cell Cardiol 2001; 33(1): 109-119.
22. MORGAN E, BOYLE E, YUN W, GRISCAVAGE-ENNIS J, FARR AL, CANTY T, ET AL: *An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia*. Ann Thorac Surg 1999; 68(2): 377-382.
23. PYE J, ARDESHIRPOUR F, MCCAIN A, BELLINGER DA, MERRICKS E, ADAMS J, ET AL: *Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 284(3): H919-H926.
24. YAMASAKI K, ASAI T, SHIMIZU M, AOKI M, HASHIYA N, SAKONJO H, ET AL: *Inhibition of NFkappaB activation using cis-element decoy of NFkappaB binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model*. Gene Ther 2003; 10(4): 356-364.
25. FEELEY BT, MINIATI D, PARK AK, HOYT EG, ROBINS RC: *Nuclear factor-KappaB transcription factor decoy treatment inhibits graft coronary artery disease after cardiac transplantation in rodents*. Transplant 2000; 15: 70(11): 1560-1568.
26. MAULIK N, SATO M, PRICE BD, DAS DK: *An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial*

- dial adaptation to ischemia.* FEBS Lett 1998; 16: 429(3): 365-369.
27. MELDRUM DR: *Mechanisms of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning.* J Surg Res 1997; 73(1): 1-13.
 28. TAHEPOLD P, VAAGE J, STARKOPF J, VALEN G: *Hyperoxia elicits myocardial protection through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism in the rat heart.* J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 125(3): 650-660.
 29. MORGAN HE, GORDON E, KIRA E, CHUA B, RUSSO L, PETERSON CJ, ET AL: *Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy.* Annu Rev Physiol 1987; 49: 533-543.
 30. CHIEN KR, KNOWLTON KU, ZHU H, CHIEN S: *Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response.* FASEB J 1991; 5: 3037-3046.
 31. BRAND K, PAGE S, ROGIER G, BARTSH A, BRAND R, KNUECHEL R: *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion.* J Clin Invest 1996; 97(7): 1715-1722.
 32. COLLINS T, CYBULSKY MI: *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* J Clin Invest 2001; 107(3): 255-264.
 33. ROSS R: *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature 1993; 362: 801-808.
 34. BRAND K, PAGE S, WALLI AK, NEUMEIER D, BAEUERLE PA: *Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis.* Exp Physiol 1997; 82(2): 297-304.
 35. FRANTZ S, FRACCAROLLO D, WAGNER H, BEHR TM, JUNG P, ANGERMANN CE, ET AL: *Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure.* Cardiovasc Res 2003; 57(3): 749-756.
 36. STEENBERGEN C, AFSHARI C, PETRANKA J, COLLINS J, MARTIN K, BENNETT L, ET AL: *Alteration in apoptotic signalling in human idiopathic cardiomyopathic hearts in failure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H266-H276.