



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**EL FLAVONOL (-)-EPICATEQUINA INDUCE EN RATONES SANOS  
HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN  
DE LA VÍA PI3K/Akt**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**SERGIO DE LOS SANTOS ENRIQUEZ**

TUTOR PRINCIPAL: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL:  
DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. GABRIEL DEL RÍO GUERRA  
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX , NOVIEMBRE, 2016



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

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por brindarme el espacio para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado. Beca Doctoral No. 317540.

Al Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, por el espacio para realizar mi proyecto de investigación.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Hipertrofia cardiaca	3
1.2 Vías de señalización de la HC	5
1.3 Vía de señalización de la HC patológica	6
1.4 Marcadores de HC patológica	7
1.5 Vía de señalización de la HC fisiológica	9
1.6 Flavonoides	11
1.7 Epicatequina y cardioprotección	13
2. Justificación	15
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4. Materiales y Métodos	17
4.1 Animales	17
4.2 Diseño Experimental	17
4.3 Histología	18
4.4 Western Blotting	19
4.5 Anticuerpos	20
4.6 Medición de la función cardíaca	20
4.7 Análisis estadístico	22

5. Resultados	23
5.1 Epi aumenta el peso del corazón	23
5.2 Epi aumenta el tamaño del septo y la pared libre izquierda	24
5.3 Epi induce aumento del tamaño de las fibras cardíacas	26
5.4 Epi no induce fibrosis cardíaca	27
5.5 Epi no activa la vía de Ca <sup>2+</sup> /CAMI/CaMKII	28
5.6 Epi no aumenta la expresión del ANP, BNP y $\beta$ -MHC	28
5.7 Epi activa la vía PI3K/Akt	29
5.8 Epi activa el factor de crecimiento endotelial vascular	30
5.9 Efecto de Epi sobre los parámetros hemodinámicos	31
5.10 El efecto del tratamiento con Epi en la masa cardíaca es reversible	32
5.11 Efecto de Epi en un modelo de Cardiomiopatía Dilatada	35
5.11.1 Epi activa eNOS e inhibe vasoconstricciones en el ratón KO $\delta$ -SG	35
5.11.2 Epi disminuye la fibrosis en el ratón KO $\delta$ -SG	36
5.11.3 Epi inhibe el desarrollo de CMD en el ratón KO- $\delta$ -SG	38
6. Discusión	39
7. Conclusiones	46
8. Referencias	47
9. Publicación derivada de esta tesis	55

<b>Índice de cuadros y figuras</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1. Características distintivas entre HCP e HCF	5
Cuadro 2. Efecto de Epi sobre los parámetros hemodinámicos	32
Figura 1. Formas de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica	4
Figura 2. Vías de señalización en la HC patológica e HC fisiológica	10
Figura 3. Estructura de la (-)-epicatequina, catequina y polímero de procianidina	12
Figura 4. Relación del peso del corazón y el peso corporal (HW/BW)	24
Figura 5. Comparación del espesor de las paredes ventriculares	25
Figura 6. Comparación del tamaño de la fibra cardíaca	26
Figura 7. Determinación de fibrosis	27
Figura 8. Efecto de Epi en la vía HC patológica	29
Figura 9. Efecto de Epi sobre la vía PI3K/Akt	30
Figura 10. Efecto de Epi sobre VEGF	31
Figura 11. Reversión de la relación HW/BW	33
Figura 12. Reversión del espesor de las paredes ventriculares	34
Figura 13. Reversión del tamaño de la fibra cardíaca	34
Figura 14. Epi activa eNOS e inhibe vasoconstricciones	36
Figura 15. Epi disminuye la fibrosis cardíaca	37
Figura 16. Epi incrementa el grosor de la pared del ventrículo izquierdo	39
Figura 17. (-)-Epicatequina induce hipertrofia cardíaca fisiológica	45
Figura 18. (-)-Epicatequina inhibe el desarrollo de CMD en el ratón KO $\delta$ -SG	45

## Resumen

La hipertrofia cardiaca (HC) se define como el aumento en el tamaño del corazón, en respuesta adaptativa a cambios en la presión y/o el volumen. Esto induce un aumento o reducción del espesor de las paredes ventriculares para regular el estrés al que están sometidas. Se han descrito dos tipos, la HC patológica la cual se acompaña de fibrosis intersticial, apoptosis, isquemia, sobreexpresión de genes fetales y de alteraciones en la estructura del miocardio, lo que conduce a la disfunción del corazón. En contraste, la HC fisiológica, carece de fibrosis o apoptosis y la función del corazón permanece normal o con un rendimiento mecánico mejorado, además de ser reversible. Diversas vías de transducción de señales están implicadas en la regulación de la respuesta hipertrófica; en este sentido, el flavonol (-)-epicatequina incrementa la producción de óxido nítrico a través de la vía PI3K/Akt y  $Ca^{2+}$ /CaMI/CaMKII, las cuales participan en la inducción de HC fisiológica y patológica respectivamente. Por tal motivo, en este estudio se evaluaron los efectos del flavonol (-)-epicatequina (Epi) en el miocardio de ratones sanos. Interesantemente, los resultados mostraron que el tratamiento con Epi indujo incremento en el tamaño del septo, de la pared del ventrículo izquierdo y el tamaño de las fibras cardiacas; todo esto se vio reflejado con un aumento del 18.71 % en el peso del corazón. Por otra parte, este crecimiento no se asoció con fibrosis cardiaca. Coincidentemente, el tratamiento con Epi disminuyó los niveles proteínicos de algunos marcadores de HC patológica y aumentó la fosforilación de las proteínas involucradas con la activación de HC fisiológica. La evaluación hemodinámica de los ratones tratados con Epi mostró un rendimiento mecánico del corazón similar al observado en un corazón de atleta. Interesantemente, el crecimiento adaptativo del corazón se revirtió cuatro semanas posteriores a la última dosis del flavonol.

## **Abstract**

Cardiac hypertrophy (HC) is defined as the increase in heart size as an adaptive response to stimuli such as hemodynamic overload. Remodelation of the ventricular walls regulates pressure stress. There are two types, the pathological CH which is accompanied by interstitial fibrosis, apoptosis, ischemia, overexpression of fetal genes and alterations in the structure of myocardium, leads to heart dysfunction. In contrast, the physiological CH is reversible, without apoptosis or fibrosis, and heart function is normal or enhanced. Several pathways of signal transduction activate the hypertrophic regulatory response. In this sense, the flavonol (-)-epicatechin is able to increase the production of nitric oxide through the PI3K/Akt pathway and  $Ca^{2+}$ /CAMI/CaMKII pathway. These pathways are involved in the induction of physiologic and pathologic CH, respectively. Therefore, in this study the effects of flavonol (-)-epicatechin in the myocardium of healthy mice were evaluated. The current research found that 15 consecutive days of flavonol (-)-epicatechin treatment leads to increased 18.71 % in heart weight, increased the size of the septum, the size of the left ventricular wall, the size of the cardiac fibers and it did not induce cardiac fibrosis. In addition, it decreased the protein levels of some pathological CH markers and increased the phosphorylation of the proteins involved in the activation of physiological CH. In terms of myocardial function, treatment with (-)-epicatechin showed a mechanical heart performance similar to athlete's heart. Interestingly, the morphometric parameters were similar between treated and untreated mice after 4 weeks without treatment.



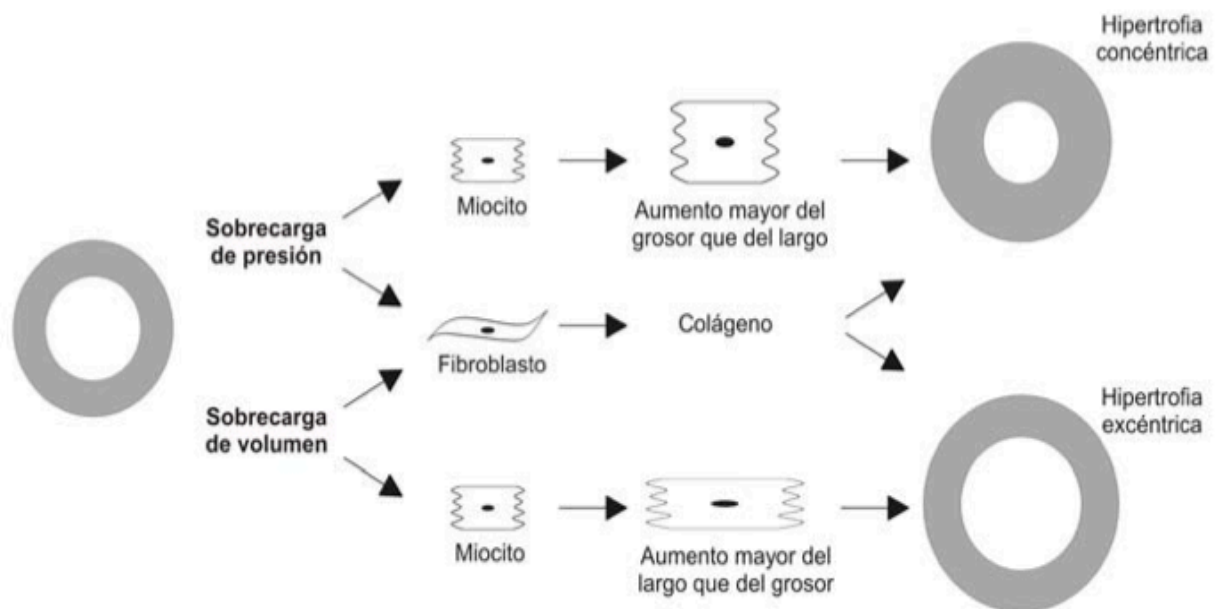
## **1. Introducción**

### **1.1 Hipertrofia cardiaca**

La hipertrofia cardiaca (HC) se define como el aumento en el tamaño del corazón, por un incremento en el volumen de los miocitos, sin ser alterado el número de células que lo conforman<sup>1</sup>. Este fenómeno se debe a que los miocitos son un tipo celular altamente diferenciado, pero con capacidad para responder a los estímulos que promueven el crecimiento<sup>2,3</sup>. La HC es considerada como una respuesta adaptativa, que cumple un papel cardioprotector y de reparación ante la sobrecarga hemodinámica (incremento de presión y/o de volumen). Estos cambios inducen un aumento o disminución en el espesor de las paredes ventriculares para regular el estrés al que son sometidas<sup>1</sup>. La HC se presenta en dos formas. La Hipertrofia Concéntrica, la cual se origina por una sobrecarga crónica de presión y en la que el aumento en el tamaño de los miocitos se da en el grosor, pero no en su longitud. Este fenómeno produce la reducción del volumen ventricular debido al aumento en el espesor de las paredes ventriculares (Figura 1). La otra forma es conocida como Hipertrofia Excéntrica, la cual resulta por una sobrecarga de volumen y en la que el aumento de los miocitos se da en su longitud, pero no en su grosor. Esta forma de hipertrofia causa dilatación y adelgazamiento de la pared del corazón (Figura 1)<sup>4</sup>.

Independientemente de la forma de HC que se desarrolle, esta es clasificada en dos tipos. Hipertrofia Cardiaca Patológica (HCP) e Hipertrofia Cardiaca Fisiológica (HCF), y en ambos casos hay un aumento en la dimensión del corazón, sin embargo, cada una tiene características distintivas (Cuadro 1)<sup>5</sup>. La HCP es considerada como una

respuesta adaptativa del miocardio a distintos tipos de enfermedades, como ejemplos se encuentran: la hipertensión, el infarto al miocardio, enfermedad cardíaca valvular y mutaciones genéticas<sup>6,7</sup>. Esta asociada con insuficiencia cardíaca y muerte prematura<sup>8</sup>. Este tipo de HC se acompaña de fibrosis intersticial, apoptosis, isquemia, sobreexpresión de genes fetales (por ejemplo,  $\beta$ -MHC) y alteraciones en la estructura del miocardio, lo que conduce a la falla cardíaca<sup>8,9</sup>. Por otro lado, el crecimiento del corazón de tipo fisiológico está asociado con el crecimiento postnatal, el embarazo y las prácticas deportivas intensas y/o crónicas. Todos estos eventos inducen una sobrecarga hemodinámica que propicia el aumento del tamaño del corazón. Este crecimiento va de la mano con el incremento en la densidad capilar, la expresión normal de genes embrionarios, el incremento proporcional de las cámaras ventriculares y carece de fibrosis intersticial. El funcionamiento del corazón es normal o con un rendimiento mecánico mejorado<sup>4,9,10</sup>.



*Figura 1.* Formas de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica. Con sobrecarga de presión se produce un aumento en el grosor de las paredes ventriculares, originando HC concéntrica. Con sobrecarga de volumen se produce aumento en el largo de los miocitos, originando HC excéntrica<sup>4</sup>.

Cuadro 1. Características distintivas entre HCP e HCF

	<b>HC Patológica</b>	<b>HC Fisiológica</b>
<b>Estímulo</b>	Sobrecarga de volumen o presión por enfermedad (HA, CMD, TSV, EA, IV, IM, etc.)	Sobrecarga de volumen o presión por ejercicio intenso, embarazo, desarrollo postnatal.
<b>Morfología</b>	Aumento del volumen de los miocitos Formación de nuevos sarcómeros Aumento en el tamaño del corazón	Aumento del volumen de los miocitos Formación de nuevos sarcómeros Aumento en el tamaño del corazón
<b>Fibrosis</b>	Presente	Ausente
<b>Apoptosis</b>	Presente	Ausente
<b>Marcadores IC</b>	Sobreexpresión de ANP, BNP, $\beta$ -MHC y $\alpha$ sk-actin	Sin cambios
<b>Función cardíaca</b>	Afectada	Normal o mejorada
<b>Reversible</b>	No	Si
<b>Asociación con IC</b>	Si	No

IC, Insuficiencia cardíaca. HA, Hipertensión arterial. CMD, Cardiomiopatía dilatada. TSV, Taquicardia supraventricular. EA, Estenosis aortica. IV, Insuficiencia valvular. IM, Infarto al miocardio.<sup>5</sup>

## 1.2 Vías de señalización de la HC

En diversos estudios, se ha reportado que la HCP o la HCF son inducidas a través de vías de señalización distintas. En este sentido, la HCP está asociada en mayor grado con la señalización de receptores acoplados a proteínas G ( $G\alpha q$ ), y en menor grado a PI3K subunidad  $p110\gamma$ , a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), a la proteína quinasa C (PKC) y D (PKD), y a la calcineurina<sup>5,9</sup>. Por otro lado, la vía del factor de crecimiento similar a la insulina 1/phosphoinositol-3-quinasa (IGF1/PI3K) es la que se encuentra asociada a la HCF; además de existir otras vías de señalización que también participan en este tipo de hipertrofia, tales como la vía  $gp130/JAK/STAT$ , la señalización de la hormona tiroidea, y la del factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1)<sup>9,10</sup>.

### 1.3 Vía de señalización de la HC patológica

La HC patológica es activada por una gran cantidad de vías de señalización siendo la de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), la más estudiada y caracterizada. Estos receptores son activados por los ligandos como la angiotensina-II (ANGII), endotelina-1 (ET-1), noradrenalina (NA) entre otros<sup>11,12,13</sup>. Las proteínas G se dividen en dos grupos; las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G monoméricas de bajo peso molecular. Las proteínas G están formadas por una subunidad  $G\alpha$  y una  $G\beta\gamma$ . La unión de un agonista al GPCR promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$  y conduce a la disociación de las subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , permitiendo la activación de vías de señalización distintas. Entre los ligandos que inducen un estímulo hipertrófico, se encuentran moléculas como ANGIO, ET-1 y NA. ANGIO o ET-1 por ejemplo, inducen la disociación de la subunidad  $\alpha$  de los GPCRs y permiten el reclutamiento de la isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C (PLC $\beta$ ) a la membrana; a su vez esta molécula hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) y se produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) así como diacilglicerol (DAG). El DAG formado facilita la activación de la proteína quinasa C (PKC) y esta a su vez activa a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Por último las MAPKs (como ERK1/2, p38 o JNK) fosforilan factores de transcripción como NFAT, MEF2 y GATA4<sup>11,14</sup>, estos factores interactúan de manera sinérgica en el núcleo y ocasionan la activación de los genes de respuesta hipertrófica (Figura 2). En el caso de la NA, se induce la activación de la adenilato ciclasa (AC) que produce acumulación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y en consecuencia produce la activación de la proteína quinasa A (PKA). PKA fosforila varias proteínas implicadas en la contracción cardíaca, incluyendo los canales de calcio de tipo L, la troponina y a fosfolamban, lo que resulta en aumento de la fuerza de

contracción<sup>15</sup>. Por otro lado, el IP3 induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es el responsable de la activación de las fosfatasas Calcineurina y la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa II (CaMKII), que a su vez también son activadas por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMI). Estos procesos desencadenan la desfosforilación del factor de transcripción NFAT en el citosol, permitiendo que éste se trasloque al núcleo e interactúe con los factores de transcripción GATA4 y MEF2<sup>16</sup>. Estos factores de transcripción estimulan el incremento de las moléculas ANP, BNP,  $\beta$ -MHC y  $\alpha$  sk-actin, los cuales son marcadores universales de HC patológica y que forman parte de la carga génica fetal que es reinducida<sup>17</sup>.

#### **1.4 Marcadores de HC patológica**

##### **Cadena pesada de miosina**

La activación del programa genético fetal, permite que se lleve a cabo la síntesis de proteínas necesarias para lograr el aumento del tamaño de los miocitos y de esta manera generar una adaptación ante la demanda energética impuesta por el incremento celular. En un estudio comparativo en donde se analizaron los perfiles de expresión génica entre corazones adultos sanos vs. corazones fetales y corazones adultos sanos vs. corazones con falla cardiaca, se encontró que el corazón adulto con falla cardiaca presenta un patrón de genes muy similar al corazón del feto. En el corazón con falla cardiaca, se observó aumento de la cadena pesada de miosina en su isoforma  $\beta$  ( $\beta$ -MHC, proteína que participa en el proceso de contracción lenta), mientras que la isoforma  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC, proteína de contracción rápida) se encontró disminuida. Estos patrones de expresión, forman parte de los primeros parámetros que indican una hipertrofia cardiaca

tanto en humanos como en modelos animales. El cambio de expresión de estas moléculas resulta importante, debido a que la miosina cardíaca, que es una proteína hexamérica, está conformada por estas dos isoformas ( $\alpha$ -MHC y  $\beta$ -MHC). Estas dos isoformas tienen una actividad enzimática distinta e influyen en gran medida en la función cardíaca. Cuando disminuye la isoforma  $\alpha$  e incrementa la isoforma  $\beta$ , la formación de puentes de actina-miosina se hace más lenta, lo que deriva en la prolongación de la eyección y la disminución del gasto energético durante la contracción. Estos cambios en la función cardíaca, provocan en un principio una mejoría en el rendimiento cardíaco, lo que representa una adaptación ante la carga de trabajo alterada. Sin embargo, el desbalance en la proporción de estas isoformas repercute en la velocidad de contracción y en el adecuado funcionamiento cardíaco<sup>18</sup>.

### **Péptidos natriuréticos**

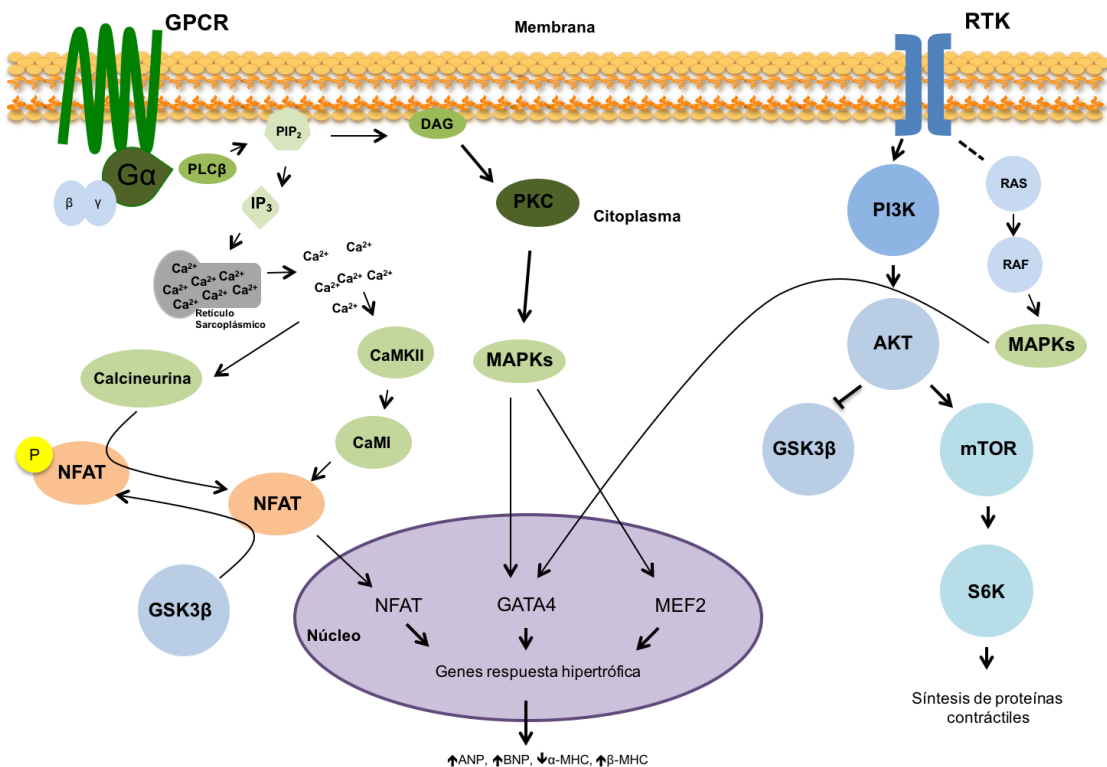
El péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético cerebral (BNP) son hormonas de origen cardíaco, que participan de manera importante en la regulación del volumen sanguíneo y del tono vascular. Se postula, que la unión de ANP o BNP a su receptor, induce la actividad de la AC y la producción del segundo mensajero guanosín monofosfato cíclico (cGMP); el cual, es activador de la proteína quinasa dependiente de cGMP-1 (PKG-1). PKG-1 participa inhibiendo los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, reduciendo el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular transitorio y bloqueando la activación de la Calcineurina. Sin embargo, sus funciones son consideradas de regulación negativa, ya que inhiben la vía Calcineurina-NFAT y parte de las vías MAPKs, estas funciones están ausentes en corazones adultos sanos y son activadas por el factor de transcripción GATA4. Este incremento es considerado parte del fenotipo de la HCP<sup>19</sup>.

## 1.5 Vía de señalización de la HC fisiológica

La HC fisiológica se produce durante procesos como el crecimiento, el embarazo y el ejercicio crónico. No tiene un efecto adverso en la función cardíaca y es reversible. A nivel molecular, la HCF está caracterizada por un aumento en la concentración de proteínas sarcoméricas. Este crecimiento del corazón después del nacimiento o en los atletas, produce un aumento en el gasto cardíaco para satisfacer las demandas metabólicas. En esta vía, la participación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) ha sido perfectamente caracterizado. Se sabe que tras la activación del IGF1-R se inducen al menos dos vías de señalización: la vía del fosfoinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt)<sup>20</sup> y en menor intensidad la vía Ras/MAPKs<sup>21</sup>. En la primera vía, IGF1R se autofosforila, y los residuos de tirosina fosforilados interaccionan con la subunidad reguladora (p85) de PI3K, mientras que la subunidad catalítica (p110 $\alpha$ ) es la encargada de transferir el grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP2), esto genera fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) y adenosín difosfato (ADP). El PIP3 recluta a la serina/treonina quinasa Akt a la membrana plasmática. En la membrana, Akt es fosforilada por la quinasa 1 dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1), resultando en su activación. Akt fosforila a la proteína quinasa blanco a Rapamicina en mamíferos (mTOR), la que a su vez activa a la proteína serina/tronina quinasa p70S6K, quien finalmente regula la síntesis de proteínas musculares (Figura 2).

Se ha propuesto, que la activación constante de la vía fisiológica también está participando como un factor que eventualmente predispone a la activación de la vía patológica, esto a través de la activación de la vía de señalización Ras/Raf/MAPKs<sup>21</sup>. Se

considera, que esta vía es diferente en intensidad y/o duración de la señal, la cual también es provocada por un receptor tirosina quinasa. Además, Akt fosforila e inactiva a la proteína quinasa 3 $\beta$  de la glucógeno sintetasa (GSK3 $\beta$ ), quien tiene acción anti-hipertrofica mediante la inhibición constitutiva de la actividad de sus blancos río abajo, entre los que destacan los miembros de la familia NFAT y el factor de transcripción GATA4<sup>22</sup>. Es importante destacar que la vía PI3K/Akt promueve la respuesta angiogénica mediante la activación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual produce una señal intracelular que conlleva al crecimiento de los miocitos con una neovascularización, un proceso esencial, ya que la pérdida del balance entre el crecimiento celular y la angiogénesis conduce a una falla contráctil y al desarrollo de insuficiencia cardíaca<sup>23,24</sup>.



*Figura 2.* Vías de señalización en la HC patológica e HC fisiológica. La activación de GPCR representa el inicio de la cascada de señalización de la HC patológica desde la membrana hasta llegar al núcleo con la activación de los factores de transcripción NFAT, GATA4 y MEF2. En la vía de la HC fisiológica la cascada inicia en la membrana con un receptor RTK hasta la síntesis de proteínas contráctiles, modificado de Ennis IL, Escudero EM<sup>4</sup>.



De esta forma se comprende que el crecimiento del miocardio es un proceso complejo, ya que diferentes condiciones pueden sobrecargar el funcionamiento cardiaco y aumentar el volumen y/o presión en el corazón, promoviendo la respuesta molecular y generar los cambios estructurales y funcionales. El incremento en el tamaño de los miocitos es la principal respuesta, sin embargo, también deben ser considerados los cambios producidos en los elementos de la matriz extracelular y en los vasos sanguíneos, ya que estos son distintos en la HC fisiológica y patológica.

El desarrollo de la HC patológica, es el paso inicial a la progresión de la insuficiencia cardiaca. Los fármacos utilizados actualmente para combatir esta patología, están dirigidos a retrasar la progresión de la misma. En este sentido, en los últimos años se ha propuesto que la activación de la vía de la HCF puede ser útil para la disminución de los procesos patológicos y que el consumo de una dieta rica en flavonoides ayuda a mejorar la función cardiaca<sup>25</sup>, a disminuir la presión arterial<sup>26</sup>, a mejorar en la respuesta inmune<sup>27</sup> y a incrementar la función del sistema antioxidante<sup>28</sup>. En este contexto, existen diversos productos de origen natural ricos en flavonoides como son: el vino, el té negro, el té verde, la manzana y en particular el cacao; estos productos son utilizados comúnmente como agentes cardioprotectores<sup>29</sup>.

## **1.6 Flavonoides**

Recientemente se ha reconocido que el consumo regular de productos naturales ricos en flavonoides mejora la función cardíaca<sup>30-33</sup>. En este sentido, la evidencia sugiere que el cacao, el cual es rico en flavonoides, tiene efectos cardioprotectores<sup>31, 32</sup>. En referencia a esto último, se ha observado que la ingesta de bebidas de cacao aumenta

el flujo sanguíneo<sup>34</sup>, así como la microcirculación<sup>35</sup>; por otro lado, reduce la presión arterial<sup>36</sup>. Otros efectos de los flavonoides implican inhibición de la adhesión de las plaquetas, inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, disminución de la inflamación, a la disminución de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inhibición de la síntesis de eicosanoides e inhibición a la resistencia a la insulina<sup>37,38</sup>. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común compuesto por dos anillos de benceno (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico (C)<sup>39</sup>. Los flavonoides se clasifican en 6 clases, siendo los flavonoles los que están presentes en un alto contenido en el chocolate negro, y se pueden encontrar en forma de monómeros. De esta clase de flavonoles, existen de manera natural dos isómeros, el isómero de configuración trans en el carbono 3 conocido como (+)-catequina y el isómero de configuración cis en el carbono 3 conocido como (-)-epicatequina (Epi)<sup>40</sup>. Estos monómeros pueden llegar a formar uniones entre los carbonos 4 y 8, lo que conlleva a la formación de dímeros, oligómeros o polímeros conocidos como procianidinas (Figura 3).

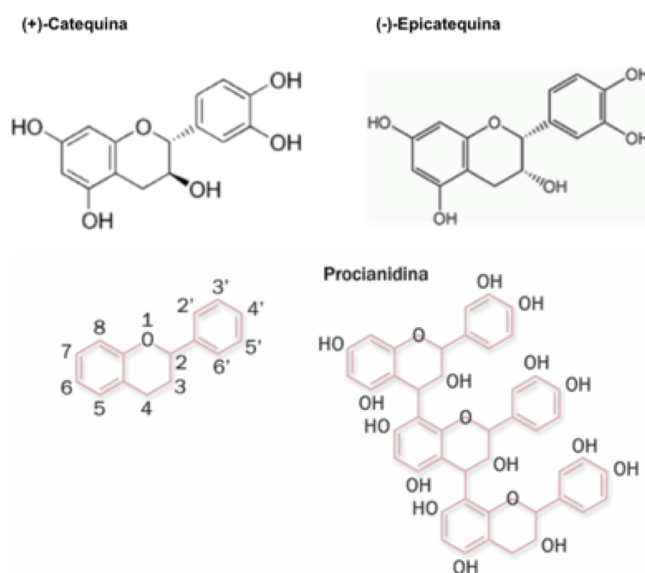


Figura 3. Estructura de la catequina, la (-)-epicatequina y el polímero de procianidina.

El interés por los beneficios asociados a estos compuestos surge a partir de un estudio realizado en los indígenas Kuna. Esta población permaneció aislada durante siglos en islas cercanas a la costa de Panamá. Entre los Kunas las enfermedades cardiovasculares y la hipertensión, son patologías que se presentan con una frecuencia menor al 5 %<sup>41</sup>. En primera instancia se pensó que era por causa de un factor de protección genético; sin embargo, esta suposición se descartó debido a que los Kunas migrantes que adquirían los hábitos alimenticios del lugar al que llegaban, presentaban de manera común enfermedades cardiovasculares como la hipertensión. Tras analizar distintos factores genéticos y ambientales entre los Kunas, se determinó que existe una relación entre la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares con un alto consumo de una bebida a base de cacao<sup>42</sup>, lo que sugiere, que éste contiene algún elemento que actúa como agente protector contra las enfermedades cardiovasculares.

### **1.7 Epicatequina y cardioprotección.**

Muchos de los efectos cardioprotectores en el cacao han sido asociados con el consumo consecuente de la Epi<sup>43</sup>. En relación a esto, se ha demostrado que el pretratamiento con Epi, reduce el tamaño de infarto en modelos animales con isquemia-reperusión o con oclusión coronaria permanente<sup>44</sup>. A pesar de que aún no se ha descrito un receptor específico para la Epi, se sabe con certeza que las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico (ON) aumentan con la administración de Epi y que su efecto desaparece cuando se inhibe directamente a la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)<sup>45</sup>. En estudios realizados con cultivos primarios de células endoteliales de arteria cardíaca humana (HCAEC's) se encontró, que la síntesis de ON inducida por Epi, se lleva a cabo por medio de la activación de eNOS mediada por la fosforilación de

los residuos Ser1177 y Ser633, además de la defosforilación de la Thr495, a través de la vía PI3K/Akt y PKA. Así mismo, en dicho estudio se observó, que la Epi es capaz de estimular la disociación de eNOS de la membrana plasmática, cuya activación está mediada por la vía  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMI/CaMKII<sup>46,47</sup>, vías que están íntimamente involucradas con el desarrollo de HCF e HCP respectivamente.

## **2. Justificación**

La hipertrofia cardiaca se define como el crecimiento del corazón, debido al aumento en el volumen de las células cardiacas. Este fenómeno corresponde a una respuesta adaptativa del corazón, como consecuencia de enfermedades o estímulos fisiológicos como el ejercicio. En diferentes modelos de patologías cardiacas, el flavonol Epi ha mostrado efectos positivos. Esto es debido en gran medida a sus propiedades antioxidantes y por su capacidad de incrementar el óxido nítrico plasmático. Sin embargo, debido a que el flavonol Epi puede inducir la activación de las vías  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMI/CaMKII y PI3K/Akt, ambas relacionadas con el desarrollo de la HCP e HCF respectivamente, es necesario poner a prueba los posibles efectos cardiorregulatorios de esta molécula en organismos sanos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

- ❖ Determinar si el tratamiento con el flavonol Epi induce hipertrofia cardiaca en ratones sanos.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- ❖ Determinar si el tratamiento con el flavonol Epi incrementa la masa cardiaca, incrementa el tamaño de las paredes ventriculares y el tamaño de las fibras cardiacas.
- ❖ Determinar si el tratamiento con el flavonol Epi induce fibrosis cardiaca. Determinar si el tratamiento con el flavonol Epi aumenta la concentración de los marcadores de hipertrofia cardiaca patológica ANP, BNP y  $\beta$ -MHC.
- ❖ Determinar si el tratamiento con el flavonol Epi es capaz de aumentar y/o activar las proteínas de la vía de señalización PI3K/Akt.
- ❖ Determinar si el tratamiento con el flavonol Epi modifica la función cardiaca, a través de la medición hemodinámica *in vivo*.
- ❖ Determinar si el efecto del tratamiento con el flavonol Epi es reversible después de suspender el estímulo.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1 Animales**

La cepa de ratones CD1 fue mantenida en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo las normas bioéticas de la UNAM y la NORMA Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Todos los residuos biológicos derivados del estudio se manejaron de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz de 12 horas y se les proporcionó agua y alimento *Ad libitum*.

### **4.2 Diseño Experimental**

Se utilizaron 52 ratones y fueron asignados en dos grupos ( $n = 26$  animales/grupo): el grupo Ctrl, tratado con el vehículo (agua) y el grupo Epi, tratado con (-)-epicatequina. Los ratones del grupo Epi fueron administrados con 1 mg/kg de peso corporal de Epi ((-)-Epicatechin  $\geq 90\%$  (-)-cis-3,3',4',5,7 Pentahydroxyflavane, (2R,3R)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol. Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) vía intragástrica dos veces al día (mañana y noche) durante 2 semanas. Después de 15 días de tratamiento, los ratones fueron anestesiados con 80 mg/kg de peso corporal de ketamina (clorhidrato de ketamina 200 mg/ml) y 10 mg/kg de peso corporal de xilazina (clorhidrato de xilazina 20 mg/ml). Posteriormente fueron sacrificados por dislocación cervical. Además, dos grupos de seis ratones cada

uno fueron tratados durante 2 semanas con Epi o vehículo y después se dejaron sin tratamiento durante 4 semanas, para evaluar si el efecto de Epi en los corazones es reversible. Los corazones de todos los animales se recogieron y se pesaron. El peso del órgano fue registrado y normalizado con respecto al peso corporal<sup>48</sup>. Posteriormente, los corazones se procesaron para análisis histológicos y bioquímicos. Otro grupo de ratones fue anestesiado con la misma dosis y se preparó para medir los parámetros hemodinámicos *in vivo*.

### 4.3 Histología

Los corazones se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en bloques con parafina. Se realizó tinción H-E y se obtuvieron dos secciones de 4  $\mu\text{m}$  del miocardio 3 mm debajo del surco atrioventricular. Se realizó la medición de las paredes ventriculares en tres sitios. Además, se cuantificó el tamaño de las fibras cardiacas, usando la metodología descrita por Kershaw et al, 2012<sup>49</sup>. Se midieron 200 fibras por ratón con una  $n = 6$  y se realizó una clasificación del tamaño de las mismas de acuerdo a las siguientes categorías: categoría 1,  $10 < 100 \mu\text{m}^2$ ; categoría 2,  $100 < 200 \mu\text{m}^2$ ; categoría 3,  $200 < 300 \mu\text{m}^2$ ; categoría 4,  $300 < 400 \mu\text{m}^2$ ; categoría 5,  $500 < 600 \mu\text{m}^2$ ; categoría 6,  $600 < 700 \mu\text{m}^2$ ; categoría 7,  $700 < 800 \mu\text{m}^2$ ; categoría 8,  $800 < 900 \mu\text{m}^2$ ; categoría 9,  $900 < 1000 \mu\text{m}^2$ ; categoría 10,  $1000 < 1100 \mu\text{m}^2$ . Asimismo, se buscó tejido fibroso con la tinción tricrómico de Masson en cinco campos microscópicos por sección con un microscopio de campo claro. Todas las mediciones fueron obtenidas con el microscopio Axiophot 2, la cámara Cannon PowerShot A75 y fueron analizadas con el software computacional AxioVision®.



#### 4.4 Western Blotting

Aproximadamente 100 mg de músculo cardiaco fue homogenizado con un Polytron en 300 µl de buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) adicionando 0.3 µl de inhibidores de proteasas y 0.3 µl de fosfatasas (P2714 y P2850, Sigma-Aldrich), suplementado con PMSF 0.15 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM y NaF 3 mM (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los homogenizados fueron sonicados durante 15 minutos a 4°C y se pasaron a través de una jeringa de insulina cinco veces, posteriormente se realizó centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contiene las proteínas se transfirió a un tubo nuevo y se cuantificó la concentración de proteína utilizando el método de Bradford. 40 µg de proteína se cargaron en geles desnaturalizantes empleando la técnica SDS-PAGE, a una concentración de 4-15%. Fueron electrotransferidos a 350 miliamperes durante 210 min a una membrana de nitrocelulosa (.45 micrones, Pierce P01-88018). Las membranas se incubaron durante 1.5 horas en solución de bloqueo (leche en polvo al 5% sin grasa en PBS más 0.1% Tween 20 (PBS-T)), seguido de una incubación de 14 horas a 4°C con anticuerpos primarios policlonales de conejo. Todos los anticuerpos primarios se diluyeron 1:1000 en leche en polvo al 5% sin grasa en PBS-T. Las membranas se lavaron (3 veces cada 5 min) con PBS-T y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo cabra anticonejo IgG ligado a HRP (Invitrogen). Las membranas se lavaron (3 veces cada 5 min) con PBS-T y la detección de las proteínas en las membranas se realizó con el kit de luminiscencia SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Las intensidades de las bandas proteicas se cuantificaron de manera digital utilizando el software LI-COR Image Studio™.

[https://www.licor.com/bio/products/imaging\\_systems/cdigit/](https://www.licor.com/bio/products/imaging_systems/cdigit/).

#### **4.5 Anticuerpos**

Todos los anticuerpos primarios se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de cada fabricante. Para evaluar la vía de la HC patológica, se utilizó anti-CAMI (sc-5537), anti-fosfo CAMI (SC-17019) (Santa Cruz Biotechnology), anti-CaMKII (# 3362), anti-fosfo CaMKII (# 3361) ( Cell Signaling Technology, Inc.), anti-ANP (sc-20158), anti-BNP (sc-20159), anti-MYH7 (sc-53090) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti Colágena III (ab7778, Abcam). Para evaluar la vía de la HC fisiológica, se utilizó anti-PI3K (# 4292), anti-PHO-PI3K Tyr458/Tyr199 (# 4228), anti-AKT (# 9272), anti- PHO-AKT Ser473 (# 4058), anti-mTOR (# 2983), anti-PHO-mTOR Ser2448 (# 5536), anti-p70S6K (# 2708), anti-PHO-p70S6K Thr389 (# 9234) (Cell Signaling Technology, Inc) y anti-VEGF (ab46154, Abcam). Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa (GAPDH) (PA1-988, ThermoFisher Scientific) se utilizó como control de carga. Se usó cabra anti-IgG de conejo ligado a HRP (65-6120, ThermoFisher Scientific) como anticuerpo secundario.

#### **4.6 Medición de la función cardíaca**

El análisis de la función cardíaca se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Pacher et al., 2008<sup>50</sup>. Los ratones fueron anestesiados con 40 mg/kg de peso corporal de ketamina y 10 mg/kg de peso corporal de xilazina vía intraperitoneal. Cuando el animal se encontraba perfectamente anestesiado, era colocado en una cama de calor ajustada a 37°C, posteriormente se afeitaba el área del cuello y el pecho. Con cuidado se colocaba un trozo de cinta a través de la punta de la boca, y se colocaba cinta alrededor para tirar de la cabeza ligeramente hacia atrás y crear tracción en la tráquea

(no se obstruyen los orificios nasales). Siguiendo la línea media de incisión en el cuello, se tiraba de la piel lejos de los músculos subyacentes y se realizaba un corte. Se tiraba de los músculos pretraqueales suavemente y se diseccionaba la parte de abajo de la tráquea para liberarla de los tejidos circundantes, procurando tener mucho cuidado de no dañar las arterias carótidas. Se pasaba sutura de seda quirúrgica debajo de la tráquea, se realizaba un pequeño corte en la superficie e insertaba la cánula de traqueotomía mediante la técnica de Seldinger y se ataba con el hilo de sutura. Se conectaba la cánula de traqueotomía al respirador proporcionando un volumen corriente de acuerdo al peso. Después de 10 minutos de estabilización se realizaba una incisión sobre el pecho y se separaba la piel de la pared torácica mediante disecciones laterales con tijeras de punta roma. Se realizaba un corte a través de la pared torácica y se movía lateralmente en ambos lados hasta que la membrana del pericardio fuese claramente visible. Con cuidado se retiraba el pericardio del corazón con unas pinzas y usando una aguja de calibre 23G, se realizaba una punción en la punta del ventrículo izquierdo. Se insertaba el catéter de presión-volumen (SPR-869, Millar Instruments, Houston, TX, EE.UU.) en el ventrículo izquierdo hasta que el electrodo proximal del catéter estuviese dentro de la pared ventricular. Después, se dejaba durante 10 min para la estabilización de la señal y posteriormente se iniciaba el registro de la función cardíaca durante 30 min. Al finalizar, se retiraba el catéter y los ratones eran sacrificados mediante dislocación cervical. Los siguientes parámetros hemodinámicos fueron monitorizados continuamente. Frecuencia cardíaca (FC), presión telesistólica del ventrículo izquierdo (PTS-VI), presión telediastólica del ventrículo izquierdo (PTD-VI), volumen telesistólico del ventrículo izquierdo (VTS-VI), volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (VTD-VI), trabajo latido (TL), volumen latido (VL), gasto cardíaco (Q), constante de tiempo de relajación (Tau), fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), variación de presión

respecto a la variación del tiempo máxima y mínima ( $dP/dt$  max y  $dP/dt$  min), el trabajo del ventrículo izquierdo por minuto (CWM) y la elastancia telesistólica (Ees). Los datos fueron registrados con el programa MPVS Ultra Foundation System (ADInstruments, Spechbach, Germany) y analizados con el software LabChart Pro10 (ADInstruments, Spechbach, Germany).

#### **4.7 Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar de por lo menos seis observaciones experimentales individuales. Fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos se probaron para distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se realizaron pruebas t de Student o Mann Whitney para determinar las diferencias entre los grupos. Las diferencias significativas fueron definidas por una  $P < 0.05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Epi aumenta el peso del corazón

Epi es capaz de aumentar la producción de ON a través de las vías PI3K/Akt y  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMI/CaMKII<sup>47</sup>, las cuales tienen relevancia fisiológica para la inducción de la HC fisiológica y patológica respectivamente<sup>5,9</sup>. Con el fin de evaluar si Epi induce HC, se analizó la morfología y el peso del corazón en los ratones que fueron tratados con Epi durante 15 días y fueron comparados con el grupo Ctrl. Se observó, mediante microscopio de campo claro, un aumento en el tamaño del corazón en los animales tratados con Epi (Figura. 4A). Posteriormente, con el fin de confirmar esta observación, se midió el peso corporal y el peso del corazón de los animales. En dicho análisis, no se encontraron diferencias significativas entre el peso corporal del grupo Ctrl y el grupo Epi ( $30.65 \pm 0.38$  grs y  $30.51 \pm 0.57$  grs, respectivamente) (Fig. 4B). Por el contrario, en los datos de normalización peso del corazón / peso corporal (HW/BW, heart weight/body weight) el grupo Epi mostró un aumento del 18.71 % en comparación con el grupo Ctrl ( $5.93 \pm 0.14$  y  $4.99 \pm 0.09$ , respectivamente), con una diferencia estadísticamente significativa. ( $P < 0.0001$ ,  $n = 20$ ) (Figura. 4C).

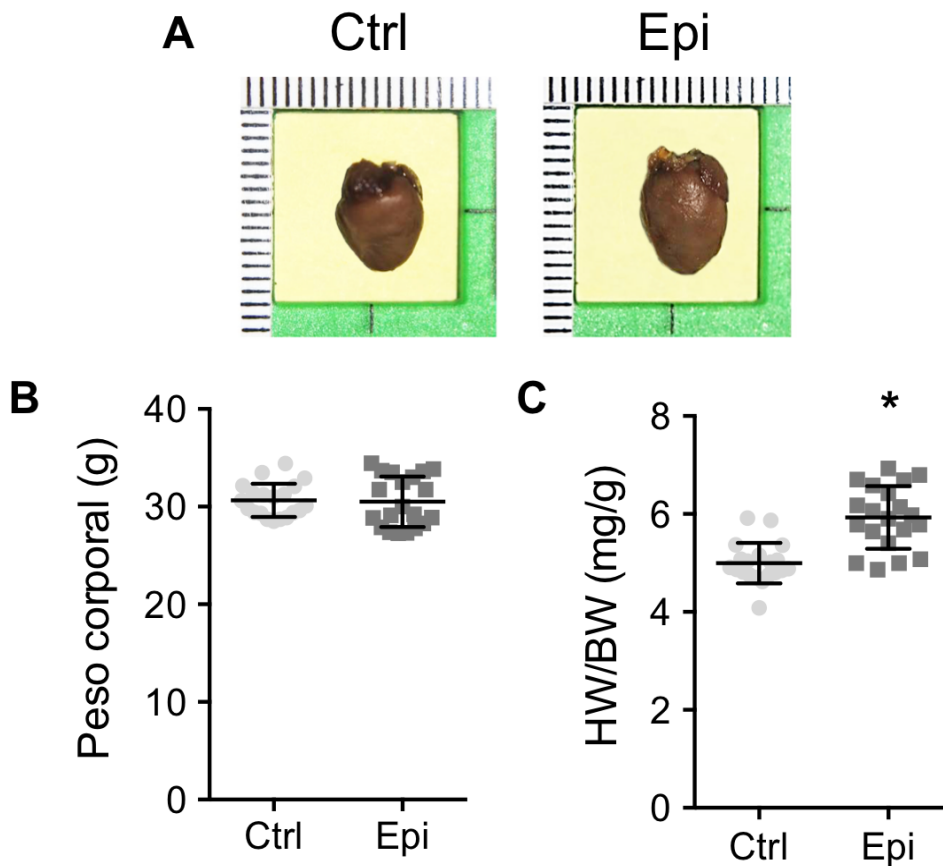
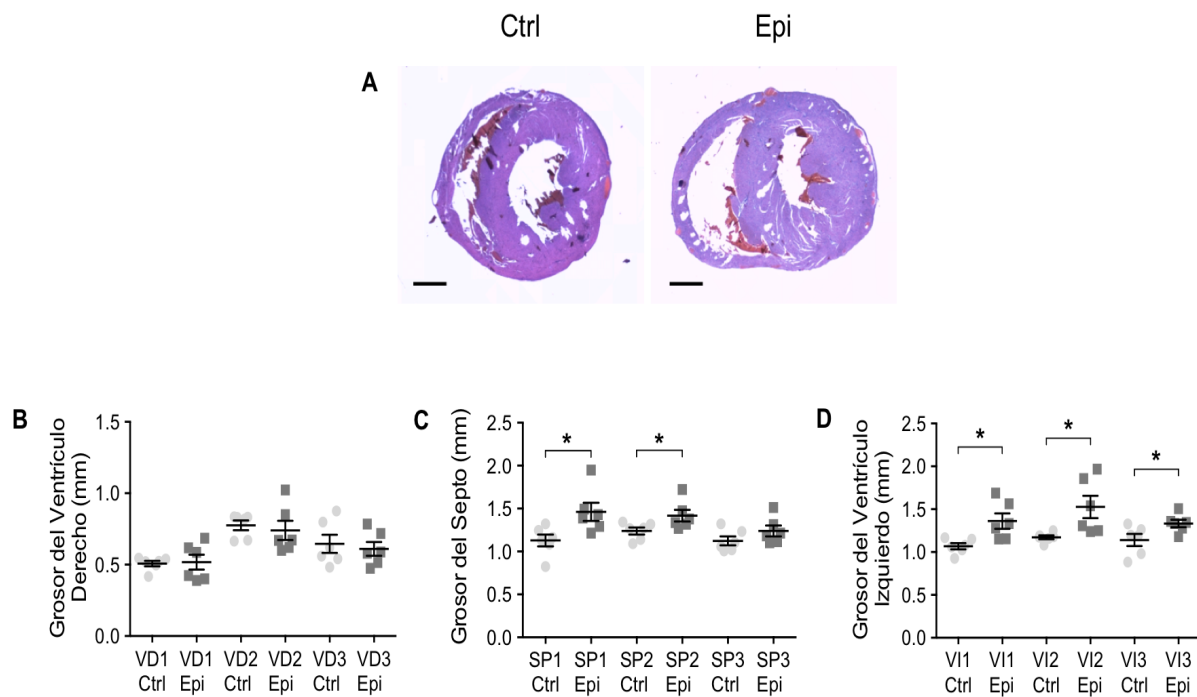


Figura 4. Relación del peso del corazón y el peso corporal (HW/BW). (A) Imágenes representativas de corazones Ctrl y Epi. (B) La dispersión del peso corporal es similar en ambos grupos. (C) La relación HW/BW muestra una deferencia significativa entre los grupos Ctrl y Epi (\* $P < 0.0001$  vs. grupo control,  $n = 20$  por grupo).

## 5.2 Epi aumenta el tamaño del septo y la pared ventricular izquierda

En general los estímulos que llevan al desarrollo de HC participan en el aumento de espesor de las paredes ventriculares. Con el fin de evaluar este parámetro en los ratones tratados con Epi, se midieron tres posiciones de cada una de las paredes ventriculares; pared del ventrículo derecho (VD1, VD2 y VD3), pared ventricular del septo (SP1, SP2 y SP3) y pared del ventrículo izquierdo (VI1, VI2 y VI3) (Figura 5<sup>a</sup>-D). El general, el espesor de estas aumentó en el grupo tratado con Epi en comparación con

el grupo Ctrl; no obstante, la pared ventricular derecha no tuvo diferencia estadísticamente significativa (Figura 5B). De manera particular, las posiciones SP1 y SP2 mostraron un aumento significativo en su espesor en un 29 % y 14 %, respectivamente ( $P<0.05$ ,  $n = 6$ ), mientras que en la posición SP3, se observó una tendencia de aumento en su espesor (Figura 5C). De forma interesante, las 3 posiciones del ventrículo izquierdo (LV1, LV2 y LV3), mostraron un aumento significativo en el grupo tratado con Epi (27.5 %, 30.2 % y 16.8 %, respectivamente;  $P<0.05$ ,  $n = 6$ ) (Figura 5D).



**Figura 5.** Comparación del espesor de las paredes ventriculares. (A) Imágenes representativas de las secciones histológicas de corazón Ctrl y Epi, barras de escala representan 1000  $\mu\text{m}$ . (B) El tratamiento con Epi no induce el engrosamiento de la pared del ventrículo derecho. (C) Epi induce el engrosamiento de la pared del septo en las posiciones SP1 y SP2. (D) Epi induce incremento en las 3 posiciones de la pared del ventrículo izquierdo. (\* $P<0.05$  vs. grupo Ctrl,  $n = 6$  por grupo).

### 5.3 Epi induce aumento en el tamaño de las fibras cardíacas

Debido a que un aumento en el tamaño de las fibras del corazón es una de las características en la HC fisiológica o la HC patológica, se evaluó si el tratamiento con Epi induce un aumento en el tamaño de la fibras. Basados en la evaluación del área de 200 fibras por ratón, una diferencia estadísticamente significativa fue encontrada entre la media de los grupos Ctrl y Epi ( $211.34 \pm 2.63 \mu\text{m}^2$  para el grupo Ctrl y  $342.62 \pm 5.04 \mu\text{m}^2$  para el grupo Epi.  $P < 0.0001$ ,  $n = 1200$ ) (Figura 6A-D).

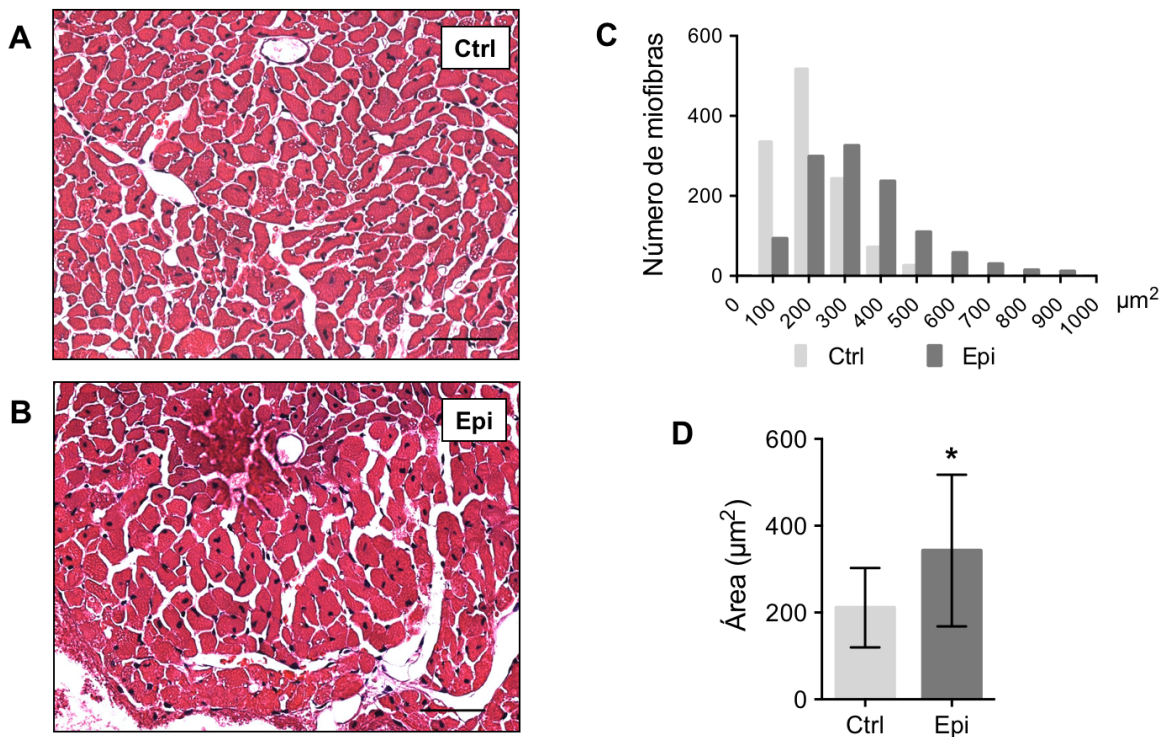
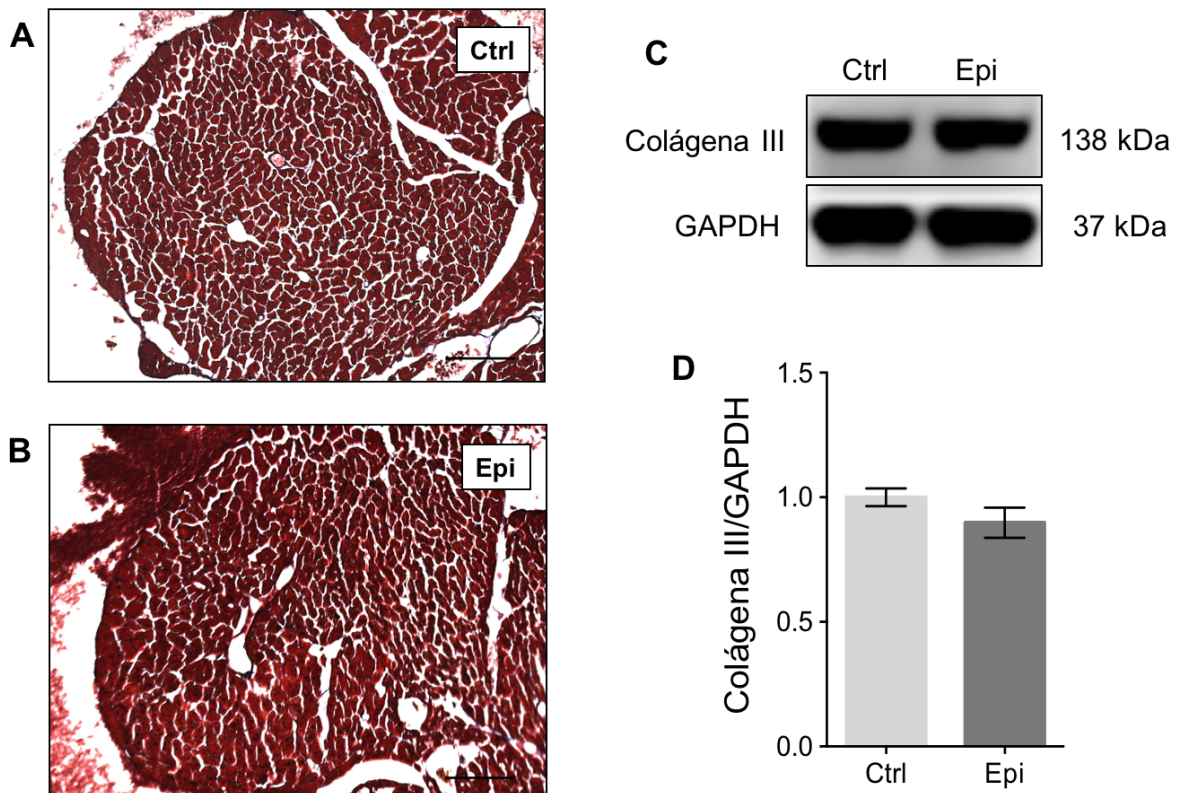


Figura 6. Comparación del tamaño de la fibra cardíaca. (A, B) Imágenes representativas de las fibras cardíacas con tinción H/E de los músculos papilares, las barras de escala representan 100  $\mu\text{m}$ . (C) El histograma de distribución de área muestra las fibras Ctrl (barras grises) y Epi (barras negras). (D) Los datos muestran aumento significativo en el tamaño de las fibras cardíacas de los ratones tratados con Epi. ( $*P < 0.0001$  vs. grupo Ctrl,  $n = 1200$ ).



#### 5.4 Epi no induce fibrosis cardíaca

La presencia de fibrosis intersticial se asocia con el fenotipo de la HC patológica<sup>51</sup>. Para determinar si existe fibrosis en los ratones tratados con Epi, cortes histológicos de músculo papilar fueron teñidos con la técnica tricrómico de Masson. El análisis histológico reveló ausencia de fibrosis en ambos grupos (n = 6) (Figura 7A-B). Este resultado fue corroborado mediante WB, donde no hubo incremento en los niveles de la proteína colágena III en ambos grupos experimentales (Figura 7 C-D) (n = 6).



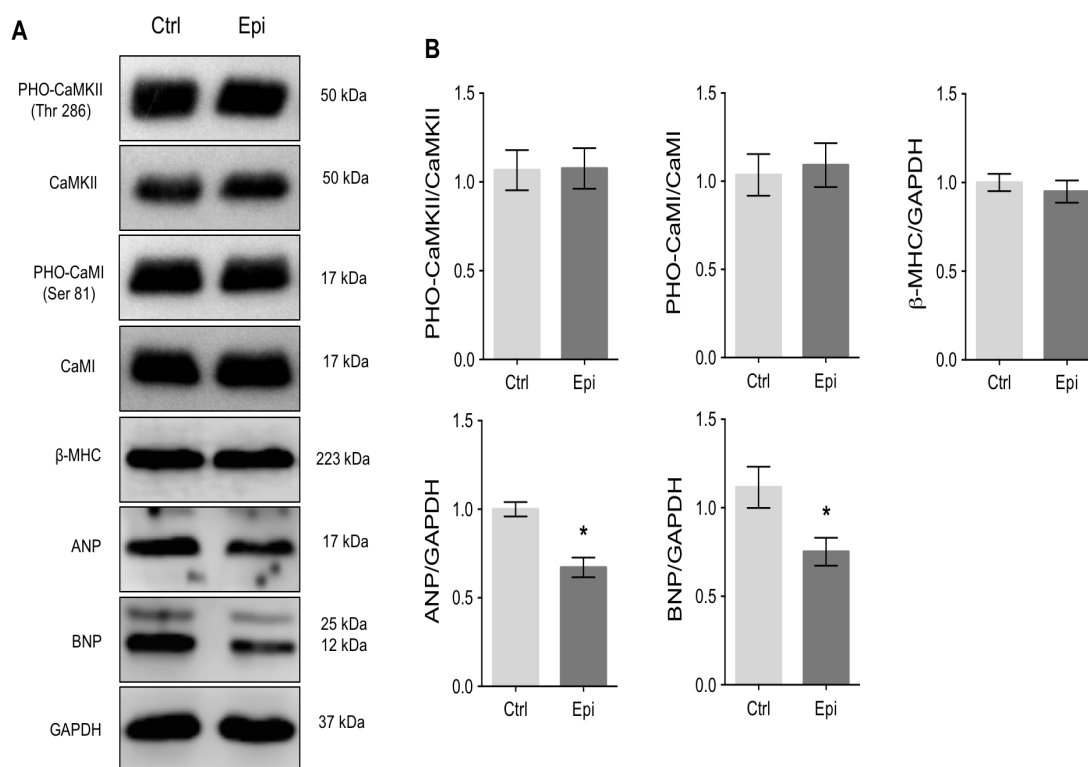
*Figura 7.* Determinación de fibrosis. (A-B) La tinción tricrómica de Masson no muestra evidencia de fibrosis en secciones de tejido de los músculos papilares. Las barras de escala representan 100  $\mu$ m. (C) Western blot representativo de Colágena III. (D) El análisis densitométrico no muestra diferencias significativas entre los grupos. (n = 6 por grupo).

### **5.5 Epi no activa la vía de Ca<sup>2+</sup>/CAMI/CaMKII**

Epi activa la vía de Ca<sup>2+</sup>/CAMI/CaMKII y aumenta la producción de óxido nítrico en las células endoteliales<sup>47</sup>. Esta vía de transducción de señales se ha asociado con HC patológica<sup>5,52</sup>. Sorprendentemente, el análisis por WB no mostró ningún aumento en las proteínas o aumento en los niveles de fosforilación de CAMI y CaMKII en los corazones tratados con Epi (n = 6) (Figura 8A-B).

### **5.6 Epi no aumenta la expresión del ANP, BNP y $\beta$ -MHC**

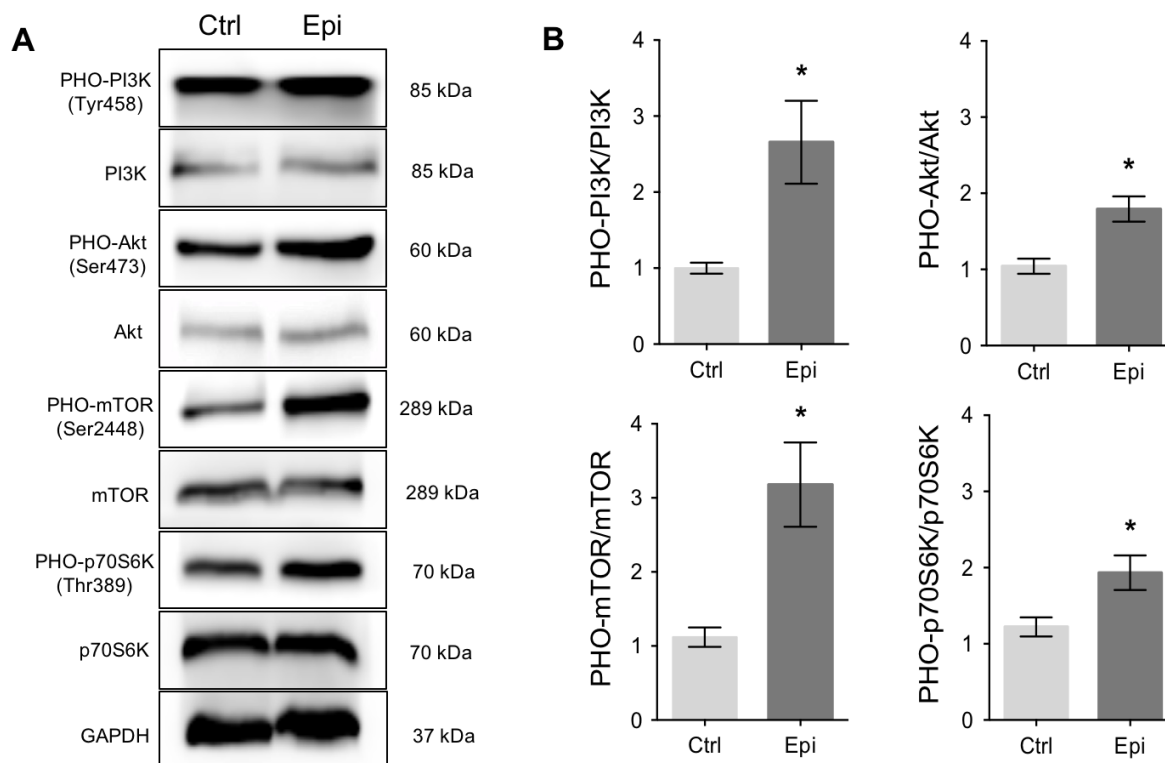
La sobreexpresión de  $\beta$ -MHC y los péptidos natriuréticos ANP y BNP son utilizados como un parámetro de HC patológica en seres humanos y en modelos animales<sup>53</sup>. Con el fin de evaluar si Epi aumenta el nivel de estas proteínas, ensayos de WB para  $\beta$ -MHC, ANP y BNP se llevaron a cabo (Figura 8A). No fue detectado ningún cambio en el nivel de la proteína  $\beta$ -MHC (Figura 8A-B). En contraste, el tratamiento con Epi indujo una reducción significativa de las proteínas ANP y BNP ( $P < 0.05$ , n = 6) (Figura 8A-B).



**Figura 8.** Efecto de Epi en la vía HC patológica. (A) Western blots representivos de PHO-CaMKII, CaMKII, PHO-CaMI, CaMI y β-MHC muestran los mismos niveles de proteína entre los grupos Ctrl y Epi. En el grupo tratado con Epi fue evidente un nivel significativamente menor de ANP y BNP. (B) Estos resultados fueron corroborados por densitometría. El análisis estadístico de las proteínas reveladas tuvo una disminución significativa de las proteínas ANP y BNP en el grupo tratado con Epi. (\* $P < 0.05$  vs. grupo Ctrl,  $n = 6$  por grupo).

## 5.7 Epi activa la vía PI3K/Akt

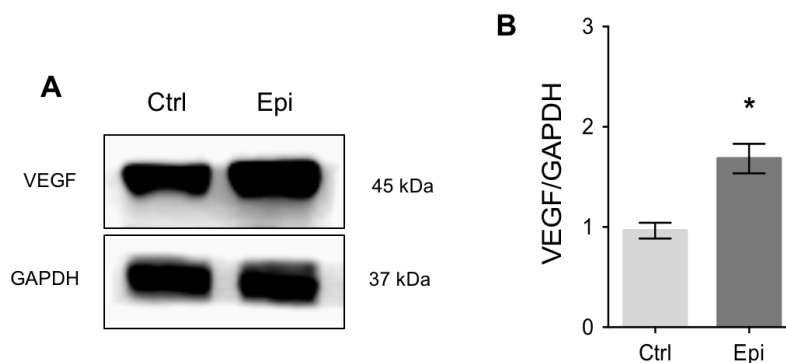
En células endoteliales, Epi induce la activación de la eNOS y aumenta la producción de óxido nítrico a través de la activación de la vía PI3K/Akt<sup>47</sup>. Se sabe que esta vía activa genes sarcoméricos, aumenta la cantidad de proteínas contráctiles y contribuye a la HC fisiológica<sup>9,54,55</sup>. En base a esto, se evaluó el efecto de Epi en esta vía. Los ensayos por WB mostraron un aumento significativo en el nivel de fosforilación de las proteínas PI3K, AKT, mTOR y p70S6K del grupo Epi ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Figura 9A-B). Por el contrario, no se detectó ninguna variación en el nivel de las proteínas totales en ambos grupos.



**Figura 9.** Efecto de Epi sobre la vía PI3K/Akt. (A) Western blots representativos muestran un incremento en el nivel de las proteínas fosforiladas (PHO-PI3K, PHO-Akt, PHO-mTOR y PHO-p70S6K) en el grupo tratado con Epi vs. grupo control pero no en las proteínas totales (PI3K, Akt, m-TOR y p70S6K). (B) El incremento se determinó por densitometría y el análisis estadístico de la relación PHO-proteína/proteína total mostró diferencia significativa entre los dos grupos. (\* $P < 0.05$  vs. grupo Ctrl,  $n = 6$  por grupo).

### 5.8 Epi activa el factor de crecimiento endotelial vascular

La respuesta angiogénica mediante la activación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es un proceso esencial en el crecimiento del corazón. Este factor de crecimiento endotelial, se activa a través de la vía PI3K/Akt<sup>23</sup>. Ensayos por WB muestran un incremento significativo en los niveles de la proteína VEGF en los ratones tratados con Epi ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Figura 10A-B).



*Figura 10.* Efecto de Epi sobre VEGF. (A) Western blot representativo muestran un incremento en el nivel de la proteína VEGF en el grupo tratado con Epi vs. grupo control. (B) Se realizó análisis por densitometría, la cual mostró una diferencia significativa entre los dos grupos. (\* $P < 0.05$  vs. grupo Ctrl,  $n = 6$  por grupo).

### 5.9 Efecto de Epi sobre los parámetros hemodinámicos

En la HC patológica, se ha descrito que la disfunción ventricular se asocia con disminución de la fracción de eyección; aunado a esto, existen anomalías en la relajación del miocardio<sup>56</sup>; mientras que en la HC fisiológica, existe una función sistólica y diastólica normal en el ventrículo izquierdo<sup>57</sup>. A través de la medición de la función ventricular izquierda *in vivo*, nuestros resultados mostraron que la FC, PTS-VI, TL, Q, dP/dt max, dP/dt min y CWM disminuyeron en el grupo Epi en comparación con el grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ). La constante de tiempo de relajación (TAU) aumentó en el grupo Epi en comparación con el grupo Ctrl ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ), mientras que otros parámetros hemodinámicos como PTD-VI, VTS-VI, VTD-VI, VL, FEVI y Ees no mostraron diferencias entre los grupos experimentales ( $n = 8$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Efecto de Epi sobre los parámetros hemodinámicos

<b>Parámetro</b>	<b>Ctrl (n = 8)</b>	<b>Epi (n = 8)</b>
FC (lpm)	418.01 ± 17.59	343.97 ± 6.34**
PTS-VI (mmHg)	76.47 ± 8.06	51.69 ± 2.93*
PTD-VI (mmHg)	7.55 ± 2.32	7.11 ± 1.33
VTS-VI (μl)	51.50 ± 3.08	47.12 ± 2.27
VTD-VI (μl)	55.59 ± 3.26	49.28 ± 2.66
TL (mmHg/μl)	351.87 ± 80.70	163.00 ± 39.53*
VL (μl)	7.57 ± 1.31	4.89 ± 1.02
Q (ml/min)	3.10 ± 0.47	1.85 ± 0.31*
Tau (ms)	15.27 ± 1.98	25.41 ± 4.00*
FEVI (%)	86.33 ± 2.05	90.40 ± 1.71
dP/dt max (mmHg/s)	4311 ± 511.60	2371 ± 294.30**
dP/dt min (mmHg/s)	-3094 ± 389.30	-1603 ± 209.00**
CWM (mmHg/s* bpm)	143582 ± 30439	55569 ± 13344*
Ees	1.508 ± 0.16	1.118 ± 0.08
HW/BW (mg/g)	4.99 ± 0.41	5.93 ± 0.64***

Datos obtenidos durante 30 min de función cardiaca (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  vs. grupo Ctrl, n = 8 por grupo) (\*\*\*) $P < 0.0001$  vs. grupo Ctrl, n = 20).

### 5.10 El efecto del tratamiento con Epi en la masa cardiaca es reversible

Con el fin de evaluar si la HC observada se revierte en ausencia de estímulo, dos grupos de seis ratones cada uno fueron tratados durante 2 semanas con Epi o vehículo, respectivamente. Posteriormente, después de un período de 4 semanas sin tratamiento se evaluó la relación de HW/BW, el espesor de las paredes ventriculares y el tamaño de las fibras cardiacas entre ambos grupos. El análisis realizado no mostró diferencias significativas en la relación HW/BW entre los grupos (Figura 11, n = 6); de igual forma, no se observaron diferencias significativas entre los tamaños de las 3 posiciones de medición en las paredes ventriculares (VD, SP y VI) (Figura 12, n = 6).

De manera interesante, al cabo de 4 semanas sin tratamiento, aún existe una diferencia significativa entre el tamaño de las fibras cardiacas de los grupos, la cual aún muestra fibras de mayor tamaño en el grupo tratado con Epi con respecto al grupo Ctrl (Figura 13). Sin embargo, es posible determinar una disminución en el tamaño de las fibras cardiacas, al comparar la significancia vista en este grupo ( $P < 0.05$ ,  $n = 1200$ ) y la observada entre el grupo Ctrl y el grupo Epi evaluada inmediatamente después de 2 semanas de tratamiento (Figura 4,  $P < 0.0001$ ,  $n = 1200$ ).

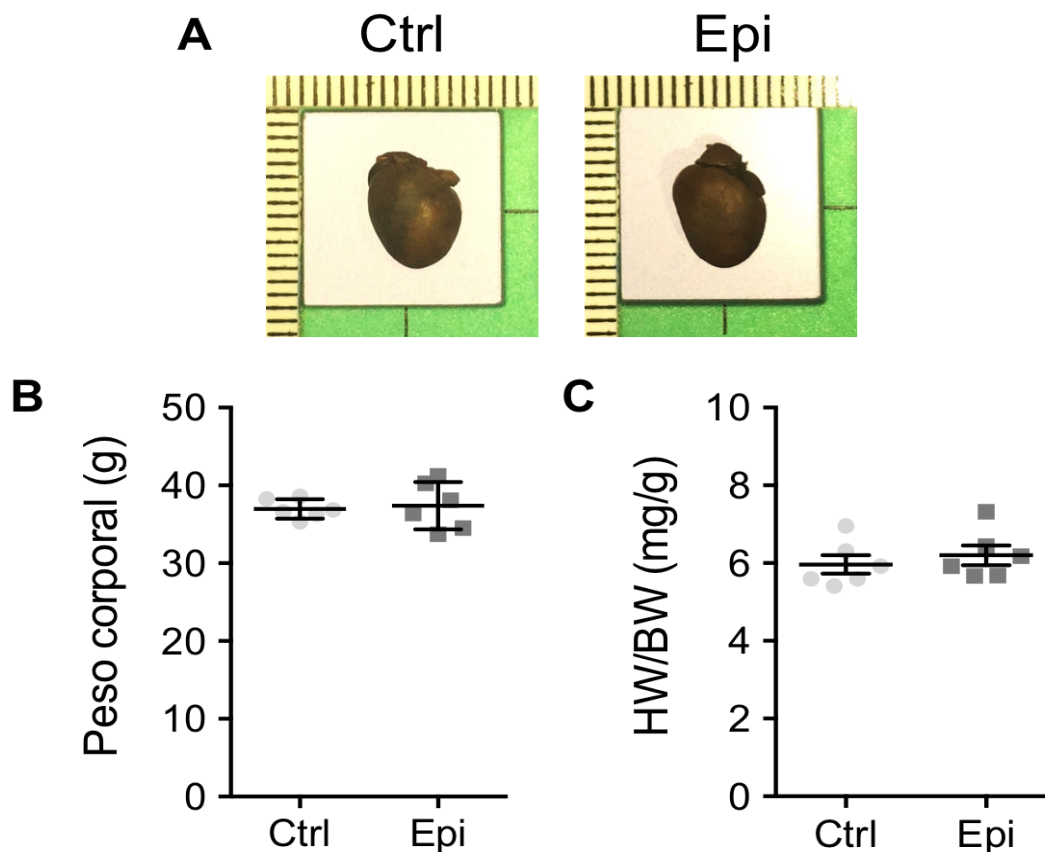


Figura 11. Reversión de la relación HW/BW. (A) El corazón muestra una inversión del tamaño después de 4 semanas sin tratamiento con Epi. Imágenes representativas del grupo Ctrl y Epi. (B) El peso corporal es similar en grupo tratado con Epi vs. ratones no tratados. (C) La relación HW/BW es similar en el grupo Epi vs. ratones no tratados ( $n = 6$  por grupo).

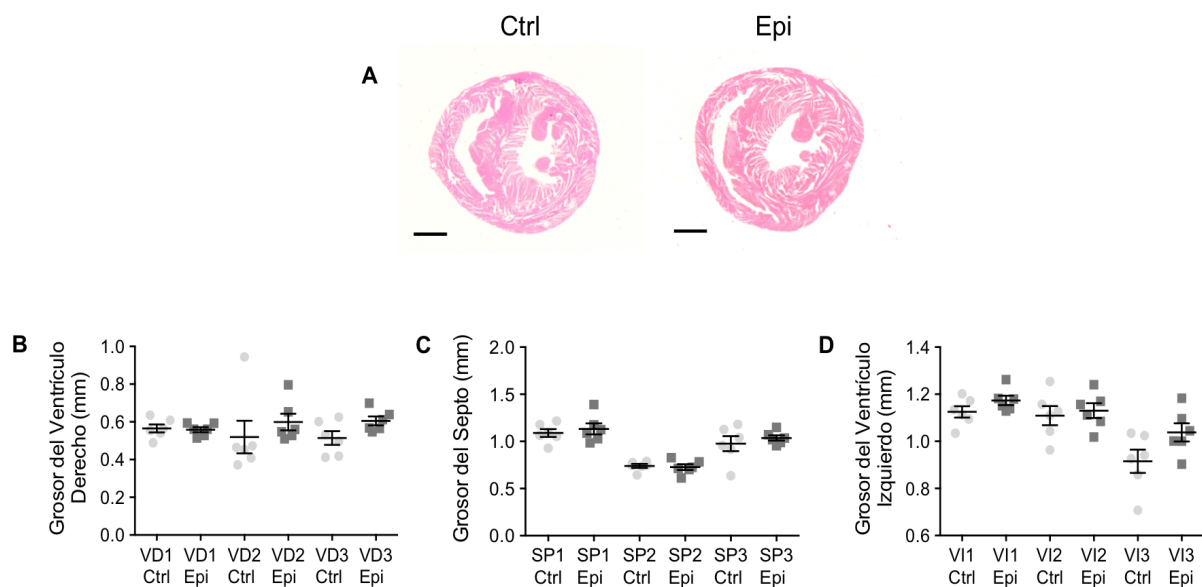


Figura 12. Reversión del espesor de las paredes ventriculares. (A) El aumento de espesor de las paredes libres del miocardio muestran una inversión después de 4 semanas sin tratamiento con Epi, barras de escala representan 1000  $\mu\text{m}$ . (B-D) El espesor de las paredes ventriculares es similar entre el grupo Epi y el grupo Ctrl ( $n = 6$  por grupo).

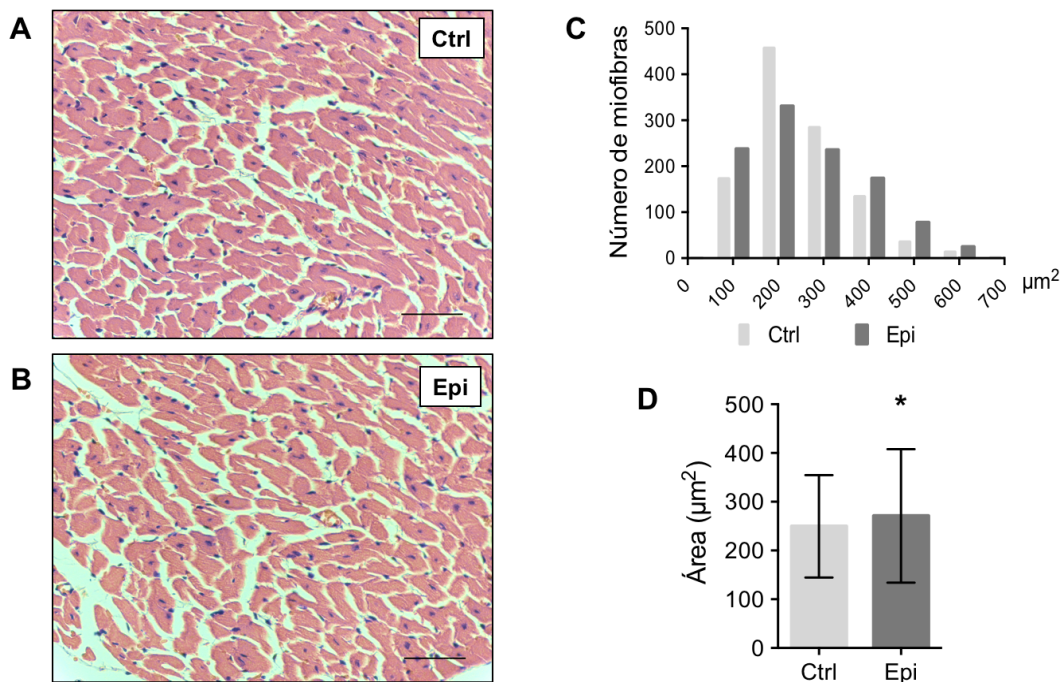


Figura 13. Reversión del tamaño de la fibra cardíaca. (A-B) El tamaño de la fibra cardíaca se evaluó mediante tinción H/E de secciones de músculo papilar, las barras de escala representan 100  $\mu\text{m}$ . (C) Histograma de área que muestra la distribución de las células del grupo Ctrl (barras grises) y del grupo Epi (barras negras). Cuatro semanas después del tratamiento, el grupo Epi muestra tamaños de fibra más grande vs. grupo Ctrl. (D) Sin embargo, la diferencia significativa fue menor ( $P < 0.05$ ,  $n = 1200$  por grupo) en comparación con la diferencia significativa observada en los ratones sacrificados inmediatamente después del tratamiento (Figura 4,  $P < 0.0001$ ,  $n = 1200$  por grupo).

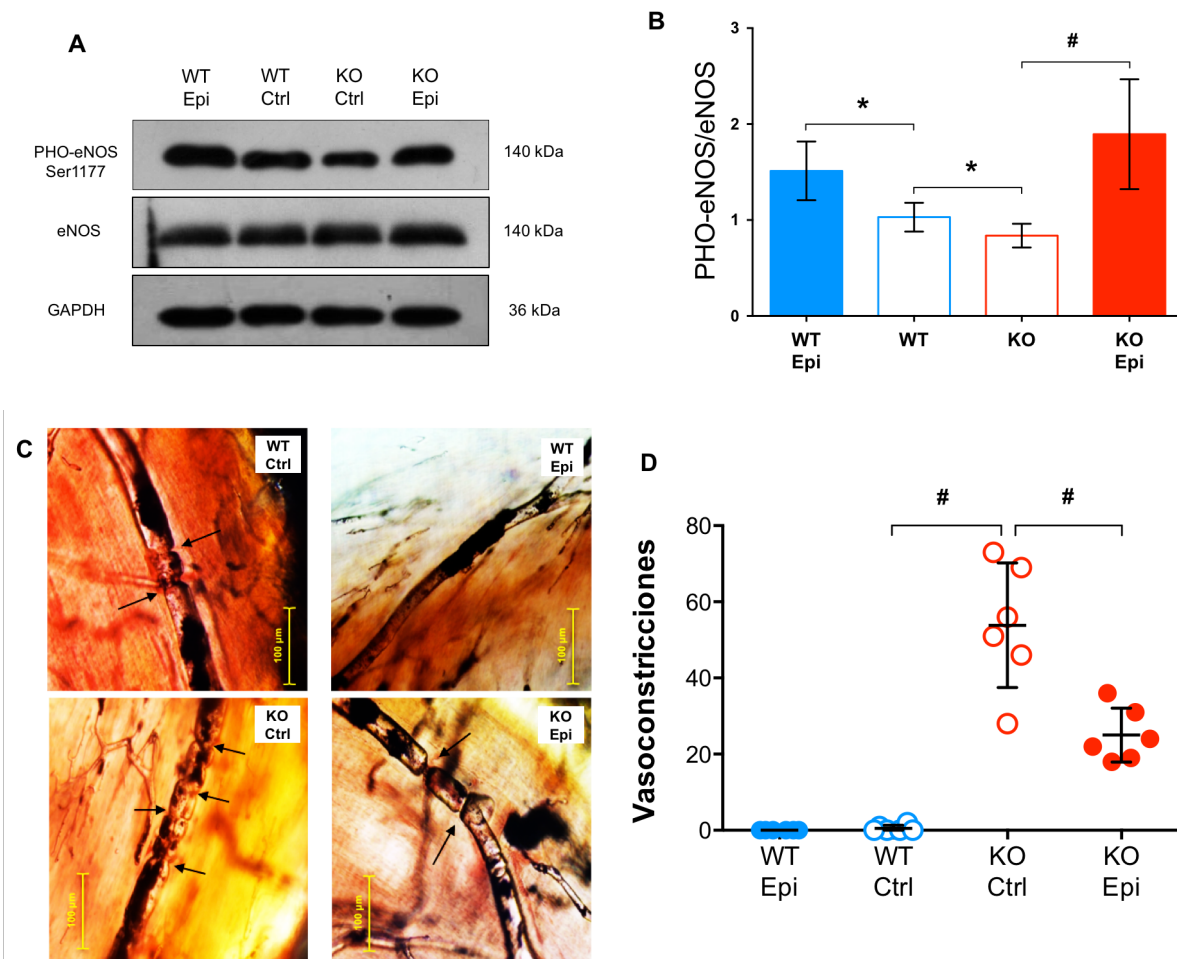


## **5.11 Efecto de Epi en un modelo de Cardiomiopatía Dilatada**

La activación de la vía de HC fisiológica se ha utilizado como estrategia terapéutica en diferentes modelos de patología cardíaca<sup>58-60</sup>. Por tal motivo y debido a los resultados positivos que obtuvimos en este trabajo, en los cuales observamos que el uso del flavonol Epi es capaz de activar la vía PI3K/Akt y de esta forma inducir HC fisiológica, resulta interesante dilucidar el posible efecto cardioprotector en un modelo murino de cardiomiopatía dilatada (CMD). Utilizamos ratones de 4 meses de edad de la cepa knockout (KO) del gen  $\delta$ -sarcoglicano ( $\delta$ -SG) que desarrolla vasoconstricciones en la arterias coronarias que conducen al desarrollo de CMD<sup>61</sup>

### **5.11.1 Epi activa eNOS e inhibe vasoconstricciones en el ratón KO $\delta$ -SG**

Nuestros resultados indican que el tratamiento con Epi incrementa la fosforilación de eNOS en la Ser1177 en los grupos tratados vs. grupos controles (Figura 14 A-B) (\* $P < 0.05$ , WT-Epi vs. WT-Ctrl, # $P < 0.01$ , KO-Epi vs. KO-Ctrl, n = 6 por grupo). La fosforilación de eNOS induce el incremento del ON, lo cual ayudaría a inhibir las vasoconstricciones en el ratón KO  $\delta$ -SG. Siguiendo la metodología descrita por Coral et al.<sup>61</sup>, las arterias coronarias fueron teñidas con una resina, posteriormente fueron diafanizadas y se observaron en microscopio de campo claro. Los resultados mostraron que el Epi disminuye significativamente el número de vasoconstricciones en el grupo KO-Epi vs. grupo KO-Ctrl (Figura 14 C-D) (# $P < 0.01$ , n = 6 por grupo).

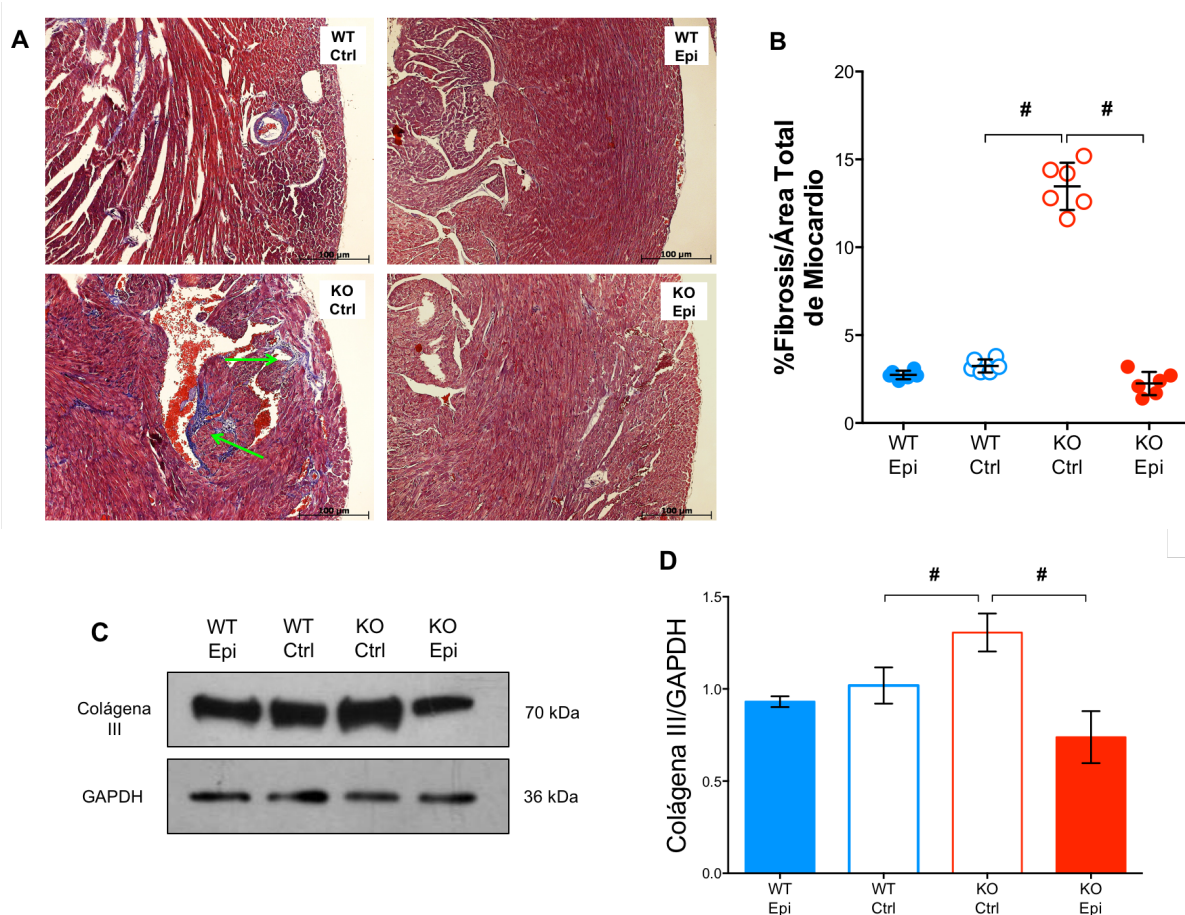


**Figura 14.** Epi activa eNOS e inhibe vasoconstricciones. (A) Western blot representativo muestran un incremento en la proteína PHO-eNOS en los grupos tratados con Epi vs. grupos controles. (B) Se realizó análisis por densitometría, la cual mostró una diferencia significativa entre los grupos tratados y los grupos controles ( $*P < 0.05$ , WT-Epi vs. WT-Ctrl,  $\#P < 0.01$ , KO-Epi vs. KO-Ctrl,  $n = 6$  por grupo). (C) Imágenes representativas de las arterias coronarias diafanizadas. (D) La cuantificación de vasoconstricciones muestra un incremento en el número de estas en el grupo KO-Ctrl, sin embargo, hay una disminución significativa en el número de vasoconstricciones cuantificadas en el grupo KO-Epi vs. grupo KO-Ctrl ( $\#P < 0.01$  vs. grupos controles,  $n = 6$  por grupo).

### 5.11.2 Epi disminuye la fibrosis en el ratón KO $\delta$ -SG

Se ha planteado que las vasoconstricciones existentes en el ratón KO  $\delta$ -SG son elementos esenciales en la progresión de la CMD en este modelo murino<sup>61,62</sup>. Estas vasoconstricciones provocan procesos de hipoxia e infarto, produciendo lesiones que dan como resultado la aparición de áreas de necrosis y fibrosis. Con el fin de lograr la determinación de fibrosis existente en los ratones KO  $\delta$ -SG tratados y no tratados con

Epi, se realizó una medición de las áreas de fibrosis y miocardio con el software AxioVision en cortes histológicos con tinción Tricrómica de Masson. Además, se realizó una validación de la fibrosis existente por medio de WB de la proteína Colágena III. El grupo KO-Ctrl muestra un promedio de 13.47 % de fibrosis con respecto al área total del miocardio, la cual se revierte en un 2.25 % en el grupo KO-Epi. Este resultado es confirmado con el WB de colágena III, los cuales, revelan una disminución significativa de colágena III en el grupo KO-Epi vs. el grupo KO-Ctrl (Figura 15) ( $\#P < 0.01$ ,  $n = 6$  por grupo).



**Figura 15.** Epi disminuye la fibrosis cardiaca. (A) Cortes histológicos con tinción Tricrómica de Masson, los depósitos de colágena en coloración son indicados con flechas. (B) Porcentaje de fibrosis respecto al área total de miocardio, la cuantificación muestra aumento significativo en el grupo KO-Ctrl vs. grupo WT-Ctrl ( $\#P < 0.01$ ,  $n = 6$  por grupo). El grupo KO-Epi revela una disminución significativa vs grupo KO-Ctrl ( $\#P < 0.01$ ,  $n = 6$  por grupo). (C) WB representativo muestra una disminución de la proteína de colágena III en el grupo KO-Epi vs. grupo KO-Ctrl. (D) El análisis densitométrico muestra una disminución significativa en el grupo KO-Epi vs. grupo KO-Ctrl ( $\#P < 0.01$ ,  $n = 6$  por grupo).

### 5.11.3 Epi inhibe el desarrollo de CMD en el ratón KO $\delta$ -SG

La CMD es una enfermedad crónica, asintomática y de lenta progresión. Se caracteriza por una dilatación ventricular y deterioro de la función sistólica, la cual es la principal causa de insuficiencia cardíaca en esta enfermedad. Estudios previos en ratones de 6 meses de edad en el modelo KO  $\delta$ -SG indican que la inhibición de los canales de calcio previene la aparición de las vasoconstricciones y favorece la inhibición de la fibrosis, pero no revierte la CMD <sup>62</sup>. En este modelo proponemos que Epi, podría inhibir la aparición de vasoconstricciones mediadas por la activación de eNOS y actuar como agente cardioprotector al inducir el crecimiento del miocardio de forma fisiológica.

Se realizó la medición de las paredes ventriculares siguiendo la metodología descrita previamente. Los resultados indican una disminución significativa en la pared ventricular izquierda en el grupo KO-Ctrl vs. grupo WT-Ctrl (Figura 16) ( $\#P < 0.01$  en las posiciones VI1 y VI3, y una  $*P < 0.05$  en la posición VI2,  $n = 6$  por grupo). De igual forma a lo observado en la cepa de ratones CD1, el grupo WT-Epi muestra un aumento significativo en el grosor de la pared ventricular izquierda vs. grupo WT-Ctrl ( $*P < 0.05$  en las posiciones VI1, VI2 y VI3,  $n = 6$  por grupo). Interesantemente, el grupo KO-Epi mostró un incremento significativo en el tamaño de la pared ventrículo izquierdo vs. grupo KO-Ctrl ( $\#P < 0.01$  en las posiciones VI1, VI2 y VI3,  $n = 6$  por grupo). Un patrón muy similar a lo observado en el ventrículo izquierdo sucede en la pared del Septo (datos no mostrados). La pared del ventrículo derecho no mostro diferencias significativas en los grupos tratados vs. grupos controles (datos no mostrados).

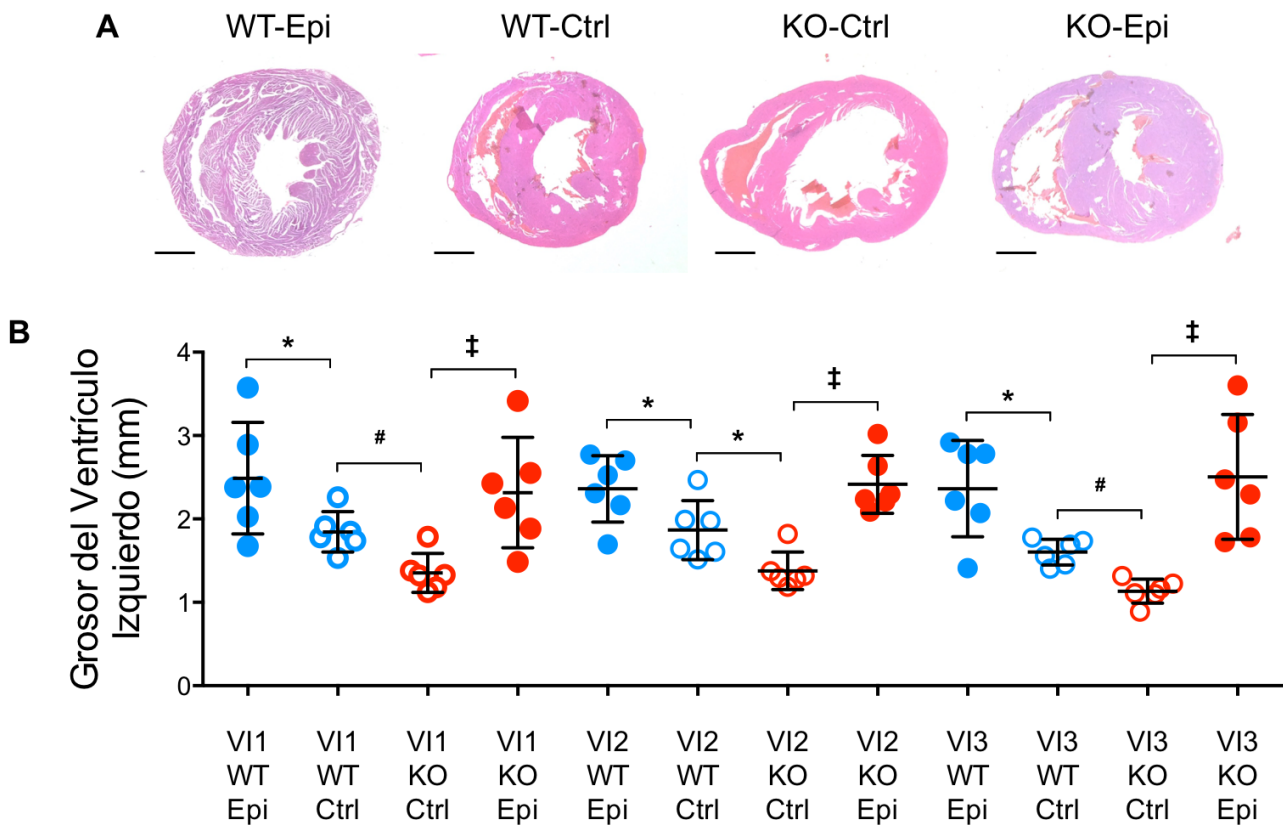


Figura 16. Epi incrementa el grosor de la pared del ventrículo izquierdo. (A) Imágenes representativas de las secciones histológicas de corazones controles y tratados con Epi, las barras de escala representan 1000  $\mu\text{m}$ . (B) Los ratones KO-Ctrl muestran una disminución en el grosor de la pared del ventrículo izquierdo ( $\#P < 0.01$  en las posiciones VI1 y VI3, y  $*P < 0.05$  en la posición VI2,  $n = 6$  por grupo). El tratamiento con Epi induce el engrosamiento del ventrículo izquierdo en los grupos tratados con Epi. (WT-Epi vs. WT-Ctrl,  $*P < 0.05$ ,  $n = 6$  por grupo) (KO-Epi vs. KO-Ctrl,  $\ddagger P < 0.001$ ,  $n = 6$  por grupo).

## 6. Discusión

Los cambios relacionados con el aumento del tamaño del corazón ya sea de tipo patológico o fisiológico son regulados por diferentes vías de señalización<sup>9</sup>. La HC patológica o no adaptativa se caracteriza por una regulación positiva de genes fetales, aparición de fibrosis y disfunción cardíaca. Por el contrario, en la HC fisiológica la estructura y función cardíaca permanecen normales<sup>10</sup>. El flavonol (-)-epicatequina (Epi) activa en células endoteliales a la eNOS a través de las vías PI3K/Akt y  $Ca^{2+}$ /CAMI/CaMKII<sup>46,47,63</sup>, las cuales se asocian con el crecimiento del corazón en forma fisiológica y patológica, respectivamente<sup>9,10,64</sup>. Además, Epi ha sido probada como una molécula con propiedades cardioprotectoras en modelos animales en condiciones patológicas, sin embargo no existen estudios que se centren en los posibles efectos que pueda tener en el corazón normal. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con Epi induce un aumento en la masa cardíaca, la cual correlaciona con el aumento en el tamaño de miofibrillas, en el grosor del septo y de la pared ventricular izquierda.

Diversos estudios, indican que la HC fisiológica es un fenómeno reversible<sup>4,9,10,64</sup>. De acuerdo a esto, se evaluó si el crecimiento cardíaco inducido por Epi sigue este patrón. Los resultados revelaron que la HC observada en el grupo tratado con Epi es reversible 4 semanas después de la administración de flavanol. Aunque aún existe un aumento significativo en el tamaño de la fibras del grupo tratado con Epi, es razonable suponer que se requiere un período más largo sin el estímulo para observar la misma distribución de tamaño de fibra cardíaca entre los grupos, tomando en cuenta que hubo una reducción en el nivel de significancia entre ambas observaciones.

A nivel de marcadores de HC, la sobreactivación de la calcineurina por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /CAMI induce la desfosforilación de los miembros de la familia del factor de transcripción NFAT en el citosol de los cardiomiocitos y aumenta su translocación al núcleo. La interacción de éste con los factores de transcripción GATA4 y MEF2<sup>65</sup>, aumenta la expresión de los péptidos natriuréticos ANP y BNP, la cadena pesada de miosina isoforma  $\beta$  ( $\beta$ -MHC) y de la  $\alpha$ -actina esquelética ( $\alpha$ -sk-actina)<sup>61</sup>, las cuales son parte de la carga génica fetal que es reinducida y los cuales son marcadores de insuficiencia cardíaca asociada a la HC. En este sentido, los cambios cardíacos observados en nuestro estudio fueron acompañados por niveles bajos de ANP y BNP, además de observar niveles similares de  $\beta$ -MHC, CAMI, CaMKII y ausencia de fibrosis. La reducción en los niveles de ANP y BNP sugiere que Epi puede regular a la baja algunos genes de la vía de señalización de la HC patológica.

Por otra parte, la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt suele ir acompañada de un incremento en los niveles de proteínas sarcoméricas durante el ejercicio intenso o durante el embarazo<sup>54</sup>. Además, su activación también se ha implicado como un mecanismo necesario para el crecimiento natural de miocardio y como un mecanismo potencial para mejorar la función cardíaca bajo condiciones patológicas<sup>60,67,68</sup>. En el presente estudio demostramos que el tratamiento con Epi induce un aumento significativo en el nivel de fosforilación de las proteínas PI3K, Akt, mTOR y p70S6K y un incremento en la proteína VEGF. Por lo tanto, nuestros datos corroboran la idea de que Epi induce un crecimiento cardíaco adaptativo o fisiológico.

Curiosamente, el crecimiento observado en los corazones de los ratones tratados con Epi muestran un patrón similar al inducido por el ejercicio. En este sentido, los análisis morfométricos mostraron que Epi induce un aumento simétrico de la pared ventricular izquierda y un engrosamiento uniforme del septo, patrón que se ha asociado con el aumento ventricular del corazón de atleta<sup>69</sup>. Por el contrario, en la HC patológica la dilatación ventricular izquierda a menudo es asimétrica con diferentes espesores a lo largo de la pared ventricular y el septo ventricular aumentado<sup>69</sup>.

Estos resultados nos llevaron a realizar un análisis de los parámetros hemodinámicos en los ratones tratados con Epi. De manera interesante, los resultados revelaron que Epi indujo cambios adaptativos similares a los observados en los atletas. En relación a esto, se observó un efecto cronotrópico negativo y un efecto lusitrópico positivo. El efecto cronotrópico negativo es asociado a contracciones de mayor intensidad de la pared ventricular izquierda, que, durante una contracción, causa un retraso en el tiempo de eyección sin modificaciones del volumen intraventricular<sup>70</sup>. Este fenómeno en el corazón de atleta también está presente y normalmente se ve acompañado de un aumento del VL y aumento del Q o en otros casos con un ligero aumento de este último<sup>71</sup>. En nuestro estudio, aunque no encontramos un cambio significativo en el VL en los ratones tratados con Epi, una reducción del Q fue evidente, que puede ser un reflejo directo del efecto vasodilatador de los flavanoles como la Epi<sup>38,47,72,73</sup>.

El efecto lusitrópico positivo en el corazón de atleta, se debe a una remodelación de adaptación que evita la rigidez ventricular (ausencia de fibrosis), permitiendo que el corazón pueda adaptarse a los cambios de volumen como consecuencia del ejercicio<sup>74</sup>.



Este efecto fue evidente en los ratones tratados con Epi que mostraron un aumento en la constante de Tau como consecuencia de la remodelación de adaptación. Además, la ausencia de rigidez, inicialmente se deduce de los datos histológicos, donde, no se observan patrones de fibrosis. Estos datos también correlacionan con la disminución de la PTS-VI, dP/dt max y dP/dt min, en donde de manera interesante se mantiene la PTD-VI, un proceso similar a los parámetros del corazón de un atleta<sup>74</sup>.

La disminución de la PTS-VI con volúmenes normales en los animales tratados pueden sugerir un proceso cardiomiopatía dilatada; sin embargo, en los ratones tratados con Epi se observa una reducción del CWM y se conserva la FEVI en relación con el grupo control. Por consiguiente, nuestros resultados apoyan la propuesta de que Epi induce la remodelación del corazón de manera similar al proceso fisiológico que es análogo a la observado en el corazón de atleta, el cual se asocia con un aumento en el espesor de la pared ventricular sin presencia de rigidez (sin fibrosis), preservando así de manera eficiente la función sistólica ventricular. Esto contrasta con la dilatación ventricular izquierda asociada con la insuficiencia cardíaca congestiva y la disfunción ventricular<sup>75,76</sup>. Sin embargo, más estudios son necesarios para analizar el efecto del flavanol Epi en tratamientos crónicos.

Por otro lado, existen diversos estudios con animales transgénicos, en los que se ha usado la activación de la vía IGF-1/PI3K/Akt como estrategia terapéutica para reducir los procesos patológicos observados en dichos animales. En estos trabajos, tanto la administración de IGF-1 como el uso de ratones con sobreexpresión de IGF-1<sup>58,77</sup> o PI3K<sup>59,60</sup> dieron como resultado la disminución de fibrosis, disminución de áreas de infarto, mejora en la función sistólica y diastólica, inhibición de Cardiomiopatía

Hipertrofica (HCP) e inhibición de CMD. El tratamiento con Epi en el ratón KO  $\delta$ -SG, tuvo efectos similares a los descritos en otros estudios; Epi disminuyó las vasoconstricciones coronarias, disminuyó la fibrosis e inhibió el desarrollo de la CMD en el ratón deficiente del gen  $\delta$ -Sarcoglicano. Así mismo, se observó un incremento en el tamaño del septo y de la pared del ventrículo izquierdo, logrando el mismo efecto hipertrófico observado en la cepa de ratones CD-1. Aún faltan otros parámetros por ser explorados en la cepa KO  $\delta$ -SG, como realizar la medición de los marcadores de IC (ANP y BNP) y en particular investigar como se encuentra el funcionamiento cardiaco, así como confirmar la activación de la vía PI3K/Akt por WB.

En resumen, este trabajo proporciona evidencia de que el flavonol (-)-epicatequina es capaz de inducir hipertrofia cardiaca fisiológica en ratones sanos a través de la vía PI3K/Akt (Figura 17) e inhibir el desarrollo de CMD en los ratones deficientes del gen  $\delta$ -Sarcoglicano (Figura 18). Además, en ratones sanos, tras suspender el estímulo por 4 cuatro semanas, los corazones de los ratones tratados con Epi vuelven a su estado basal, reforzando la idea de que Epi es una molécula que produce un efecto similar al ejercicio. Aunado a esto, el uso de Epi puede desencadenar la activación de vías de señalización relacionadas con la adaptación cardiovascular que se produce en respuesta a una mayor demanda de oxígeno durante el ejercicio. Finalmente todos nuestros resultados sugieren que el flavonol (-)-epicatequina puede tener posibles usos terapéuticos en patologías cardiovasculares.

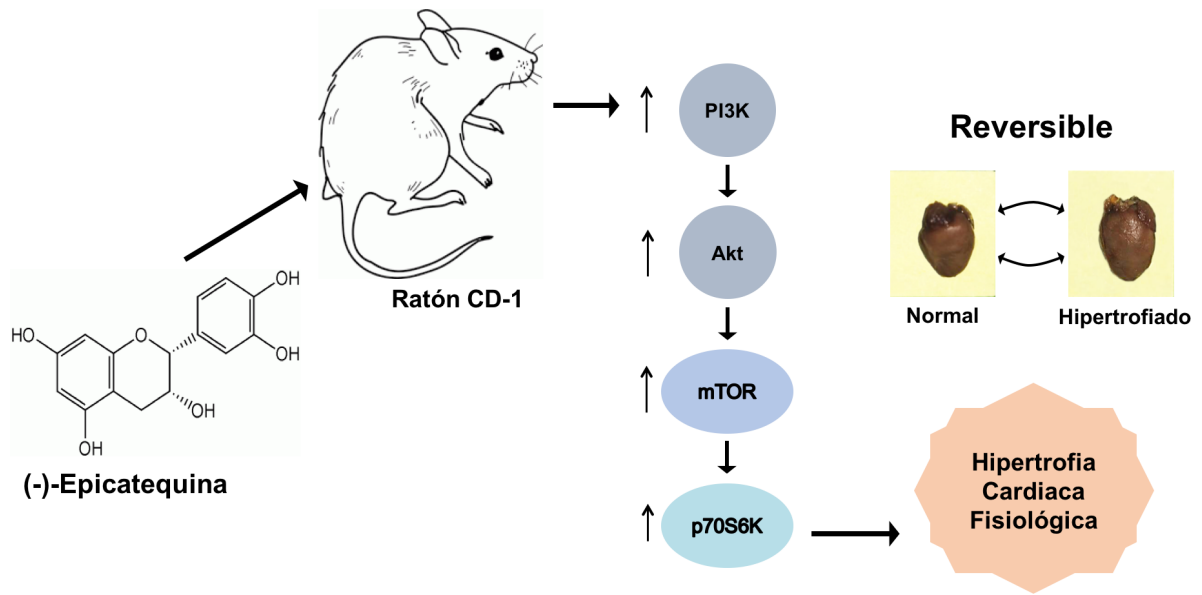


Figura 17. (-)-Epicatequina induce hipertrofia cardíaca fisiológica. La administración de este flavonol induce un crecimiento fisiológico cardíaco por activación de la vía de señalización PI3K/Akt. Además, este crecimiento se revierte al detener la administración del flavonol.

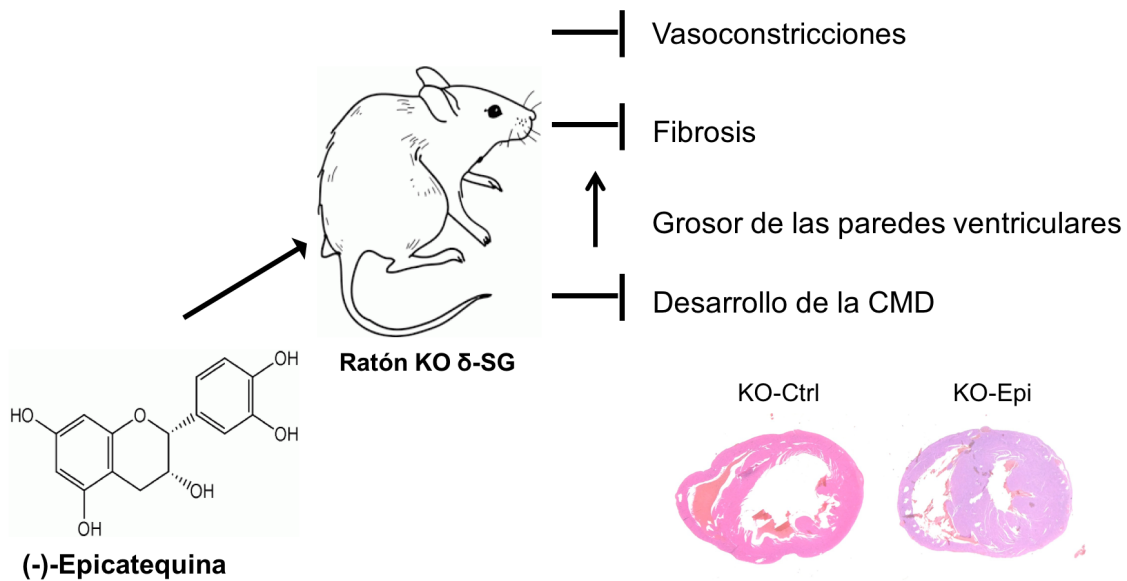


Figura 18. (-)-Epicatequina inhibe el desarrollo de CMD en el ratón KO  $\delta$ -SG. La administración de este flavonol inhibe vasoconstricciones coronarias, inhibe la fibrosis e induce un crecimiento cardíaco de tipo fisiológico.

## 7. Conclusiones

- El tratamiento con el flavonol Epi incrementa la masa cardiaca, incrementa el tamaño de las paredes ventriculares y el tamaño de las fibras cardiacas, además de no presentar fibrosis.
- El tratamiento con el flavonol disminuye la concentración de los marcadores de hipertrofia cardiaca patológica ANP y BNP, y es capaz de aumentar la fosforilación de las proteínas PI3K/Akt/mTOR/p70S6K.
- El tratamiento con el flavonol Epi modifica el perfil hemodinámico de forma similar a lo que se observa en el corazón de atleta.
- Al suspender el tratamiento con el flavonol Epi, el fenotipo del miocardio regresa a valores similares a los del grupo control.
- El tratamiento con el flavonol Epi inhibe la formación de vasoconstricciones, inhibe la fibrosis y el desarrollo de CMD, en el ratón deficiente en el gen  $\delta$ -Sarcoglicano.

## 8. Referencias

1. Sadoshima, J. & Izumo, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 551–571 (1997).
2. Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M. & Field, L. J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am. J. Physiol.* 271, H2183-2189 (1996).
3. Urbanek, K. et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10440–10445 (2003).
4. Ennis IL, Escudero EM. Hipertrofia cardiaca. En *Tratado de Cardiología de la Federación Argentina de Cardiología. Sección Hipertensión arterial. Edición electrónica.*
5. McMullen, J. R. & Jennings, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 255–262 (2007).
6. Schwartzkopff, B., Motz, W., Vogt, M. & Strauer, B. E. Heart failure on the basis of hypertension. *Circulation* 87, IV66-72 (1993).
7. Seidman, J. G. & Seidman, C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104, 557–567 (2001).
8. Norton, G. R. et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 664–671 (2002).
9. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 128, 191–227 (2010).

10. Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L. & McMullen, J. R. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol.* 89, 1401–1438 (2015).
11. Salazar, N. C., Chen, J. & Rockman, H. A. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1006–1018 (2007).
12. Geenen, D. L., Malhotra, A. & Buttrick, P. M. Angiotensin receptor 1 blockade does not prevent physiological cardiac hypertrophy in the adult rat. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 81, 816–821 (1996).
13. Yamazaki, T., Komuro, I. & Yazaki, Y. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am. J. Cardiol.* 83, 53H–57H (1999).
14. Molkenin, J. D. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* 63, 467–475 (2004).
15. Markou, T., Hadzopoulou-Cladaras, M. & Lazou, A. Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 1001–1011 (2004).
16. Wilkins, B. J. et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 94, 110–118 (2004).
17. Thum, T. et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 116, 258–267 (2007).
18. Tardiff, J. C. et al. Expression of the beta (slow)-isoform of MHC in the adult mouse heart causes dominant-negative functional effects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H412-419 (2000).
19. Rosenkranz, A. C., Woods, R. L., Dusting, G. J. & Ritchie, R. H. Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc. Res.* 57, 515–522 (2003).

20. Tanaka, N. et al. Effects of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. *Am. J. Physiol.* 275, H393-399 (1998).
21. Aksamitiene, E., Kiyatkin, A. & Kholodenko, B. N. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 139–146 (2012).
22. Antos, C. L. et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 907–912 (2002).
23. Walsh, K. & Shiojima, I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. *J. Clin. Invest.* 117, 3176–3179 (2007).
24. Hilfiker-Kleiner, D., Landmesser, U. & Drexler, H. Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, A56–A66 (2006).
25. Akhlaghi, M. & Bandy, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 309–317 (2009).
26. Schroeter, H. et al. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1024–1029 (2006).
27. Williams, R. J., Spencer, J. P. E. & Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36, 838–849 (2004).
28. Ramirez-Sanchez, I. et al. (-)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic  $\delta$ -sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J.* 281, 5567–5580 (2014).
29. Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K. & Lüscher, T. F. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 119, 1433–1441 (2009).

30. Hertog, M. G. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155, 381–386 (1995).
31. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet Lond. Engl.* 342, 1007–1011 (1993).
32. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. & Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 312, 478–481 (1996).
33. Joshipura, K. J. et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 134, 1106–1114 (2001).
34. Heiss, C. et al. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 290, 1030–1031 (2003).
35. Neukam, K., Stahl, W., Tronnier, H., Sies, H. & Heinrich, U. Consumption of flavanol-rich cocoa acutely increases microcirculation in human skin. *Eur. J. Nutr.* 46, 53–56 (2007).
36. Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F. J. & Kromhout, D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch. Intern. Med.* 166, 411–417 (2006).
37. Engler, M. B. & Engler, M. M. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr. Rev.* 64, 109–118 (2006).
38. Nijveldt, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425 (2001).
39. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J. & Tuñón, J. M. C. y M. a J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17, (2002).



40. Adamson, G. E. et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4184–4188 (1999).
41. K Hollenberg, N. Vascular action of cocoa flavanols in humans: the roots of the story. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 Suppl 2, S99-102-121 (2006).
42. McCullough, M. L. et al. Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 Suppl 2, S103-109-121 (2006).
43. Ried, K., Sullivan, T. R., Fakler, P., Frank, O. R. & Stocks, N. P. Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008893 (2012).
44. Yamazaki, K. G. et al. Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H761-767 (2008).
45. Heiss, C. et al. Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 Suppl 2, S128-135-176 (2006).
46. Ramirez-Sanchez, I., Aguilar, H., Ceballos, G. & Villarreal, F. (-)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT. *Mol. Cell. Biochem.* 370, 141–150 (2012).
47. Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G. & Villarreal, F. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* 55, 1398–1405 (2010).
48. Gray, H. Heart-Weight and Body-Weight in Rodents. *J. Mammal.* 26, 285–299 (1945).
49. Kershaw, O., Heblinski, N., Lotz, F., Dirsch, O. & Gruber, A. D. Diagnostic value of morphometry in feline hypertrophic cardiomyopathy. *J. Comp. Pathol.* 147, 73–83 (2012).

50. Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S. & Kass, D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc.* 3, 1422–1434 (2008).
51. Teekakirikul, P. et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- $\beta$ . *J. Clin. Invest.* 120, 3520–3529 (2010).
52. Zhang, T. & Brown, J. H. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 63, 476–486 (2004).
53. Barry, S. P., Davidson, S. M. & Townsend, P. A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2023–2039 (2008).
54. McMullen, J. R. et al. Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6231–6240 (2004).
55. Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C. N. & Singh, R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res.* 61, 269–280 (2010).
56. Levy, D., Murabito, J. M., Anderson, K. M., Christiansen, J. C. & Castelli, W. P. Echocardiographic left ventricular hypertrophy: clinical characteristics. The Framingham Heart Study. *Clin. Exp. Hypertens. A.* 14, 85–97 (1992).
57. Lorell, B. H. & Carabello, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102, 470–479 (2000).
58. Welch, S. et al. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ. Res.* 90, 641–648 (2002).

59. Rigor, D. L. et al. Phosphoinositide 3-kinase Akt signaling pathway interacts with protein kinase Cbeta2 in the regulation of physiologic developmental hypertrophy and heart function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H566-572 (2009).
60. McMullen, J. R. et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 612–617 (2007).
61. Coral-Vazquez, R. et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98, 465–474 (1999).
62. Cohn, R. D. et al. Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J. Clin. Invest.* 107, R1-7 (2001).
63. Moreno-Ulloa, A., Romero-Perez, D., Villarreal, F., Ceballos, G. & Ramirez-Sanchez, I. Cell membrane mediated (-)-epicatechin effects on upstream endothelial cell signaling: evidence for a surface receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 2749–2752 (2014).
64. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac plasticity. *N. Engl. J. Med.* 358, 1370–1380 (2008).
65. Dirx, E., da Costa Martins, P. A. & De Windt, L. J. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 2414–2424 (2013).
66. Caforio, A. L. et al. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85, 1734–1742 (1992).
67. McMullen, J. R. et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12355–12360 (2003).
68. Shioi, T. et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 19, 2537–2548 (2000).

69. Cheng, T. O. Hypertrophic cardiomyopathy vs. athlete's heart. *Int. J. Cardiol.* 131, 151–155 (2009).
70. Baggish, A. L. & Wood, M. J. Athlete's heart and cardiovascular care of the athlete: scientific and clinical update. *Circulation* 123, 2723–2735 (2011).
71. Nottin, S., Doucende, G., Schuster-Beck, I., Dauzat, M. & Obert, P. Alteration in left ventricular normal and shear strains evaluated by 2D-strain echocardiography in the athlete's heart. *J. Physiol.* 586, 4721–4733 (2008).
72. Galleano, M. et al. (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB Life* 65, 710–715 (2013).
73. Jiménez, R., Duarte, J. & Perez-Vizcaino, F. Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8823–8830 (2012).
74. Fagard, R. Athlete's heart. *Heart Br. Card. Soc.* 89, 1455–1461 (2003).
75. Konstam, M. A. et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dilatation in patients with asymptomatic systolic dysfunction. SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction) Investigators. *Circulation* 88, 2277–2283 (1993).
76. Cintron, G., Johnson, G., Francis, G., Cobb, F. & Cohn, J. N. Prognostic significance of serial changes in left ventricular ejection fraction in patients with congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 87, VI17-23 (1993).
77. Li, Q. et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 100, 1991–1999 (1997).

## RESEARCH ARTICLE

# (–)-Epicatechin induces physiological cardiac growth by activation of the PI3K/Akt pathway in mice

Sergio De los Santos<sup>1</sup>, Viridiana García-Pérez<sup>1</sup>, Sauri Hernández-Reséndiz<sup>2</sup>, Carlos Palma-Flores<sup>1,5</sup>, Carlos J. González-Gutiérrez<sup>1</sup>, Cecilia Zazueta<sup>2</sup>, Patricia Canto<sup>3,4</sup> and Ramón M. Coral-Vázquez<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Subdirección de Enseñanza e Investigación, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, San Lorenzo 502, México City, México

<sup>2</sup> Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, I. Ch. Juan Badiano No. 1, México City, México

<sup>3</sup> Unidad de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

<sup>4</sup> Clínica de Obesidad, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán,” Vasco de Quiroga 15, México City, México

<sup>5</sup> Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, México City, Mexico

**Scope:** The flavanol (–)-epicatechin (Epi) has cardioprotective effects and improves physical capacity in normal mice. In addition, Epi increases nitric oxide (NO) production by activation of both PI3K/Akt or Ca<sup>2+</sup>/CaMI/CaMKII (where Akt is protein kinase B; PI3K is phosphoinositide 3-kinase; CaMI is calmodulin; CaMKII is Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II) signaling pathways, which have been associated with physiological and pathological cardiac hypertrophy, respectively. Notwithstanding all this information, few studies have been carried out that aimed to determine the potential beneficial effects that Epi may have in normal heart.

**Methods and results:** Mice were treated by oral gavage with the flavanol Epi. The treatment induced a significant increase in heart weight, size of the free walls, and size of the cardiac fibers. Also, no evidence of cardiac fibrosis was revealed. Furthermore, the phosphorylation level of PI3K/Akt/mTOR/p70S6K (where mTOR is mammalian target of rapamycin; p70S6K is ribosomal protein S6 kinase beta-1) proteins was significantly higher in the heart of Epi-treated animals. In contrast, a significantly decreased level of pathological cardiac hypertrophy markers atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide was observed along with no modification in the level of  $\beta$  myosin heavy chain beta, calmodulin, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II proteins. Hemodynamic parameters indicated an improvement in mechanical heart performance after Epi treatment. Interestingly, morphometric parameters were similar between treated and untreated mice after 4 wk without treatment.

Received: April 19, 2016  
Revised: August 23, 2016  
Accepted: September 5, 2016

**Correspondence:** Ramón M. Coral-Vázquez

**E-mail:** rmcoralv@gmail.com

**Abbreviations:**  $\beta$ -MHC,  $\beta$  myosin heavy chain beta; Akt, protein kinase B; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; BW, body weight; CaMI, calmodulin; CaMKII, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II; CH, cardiac hypertrophy; CO, cardiac output; Ctrl, control; dP/dt max, the maximal change in rate of left ventricular pressure rise; dP/dt min, the minimal change in rate of left ventricular pressure rise; EF, ejection fraction; Epi, (–)-epicatechin; HR, heart rate; HW, heart weight;

LV, left ventricle; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVESP, left ventricular end-systolic pressure; LVWMM, left ventricular work minute; mTOR, mammalian target of rapamycin; NO, nitric oxide; p70S6K, ribosomal protein S6 kinase beta-1; PBS-T, PBS plus 0.1% Tween 20; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; RV, right ventricle; SP, septum wall; SV, stroke volume; tau, relaxation time constant  $\tau$

**Conclusion:** These findings indicate that Epi treatment induced physiological cardiac growth in healthy mice by activation of the PI3K/Akt pathway.

**Keywords:**

Cardiac hypertrophy / (–)-Epicatechin / Mouse heart / PI3K/Akt pathway



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

## 1 Introduction

It has recently been recognized that regular consumption of natural products rich in flavonoids improves heart function [1–4]. In this context, evidence suggests that cocoa, which is rich in flavonoids, has cardioprotective effects [2, 3]. The cocoa plant has one of the highest contents of flavonoids, with the flavanol subclass (–)-epicatechin (Epi) and catechin being the most abundant [5]. In this regard, it has been observed that intake of cocoa beverages increases blood flow [6] and microcirculation [7] and reduces blood pressure [8]. Other effects of flavanols involve inhibition of platelet adhesion, low-density lipoprotein oxidation, inflammation, reactive oxygen species generation, eicosanoid synthesis, and insulin resistance [9, 10]. Many of these effects have been associated with the presence of Epi in cocoa [11]. In relation to this, it has been shown that Epi pretreatment reduced infarct size in animal models with ischemia-reperfusion or with permanent coronary occlusion [12]. Furthermore, in human coronary artery endothelial cells, Epi was capable of inducing the production of nitric oxide (NO) via transient activation of PI3K/Akt [13] and  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKII (where Akt is protein kinase B; PI3K is phosphoinositide 3-kinase; CaM is calmodulin; CaMKII is  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II) signaling pathways [14].

Various studies have demonstrated that the PI3K/Akt pathway participates in processes such as cardiomyocyte size, survival, angiogenesis, and inflammation in both physiological and pathological cardiac hypertrophy (CH) [15]. Likewise,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKII signaling pathways have been associated with pathological CH and heart failure [16]. CH is defined as an increment in heart mass due to the increase in myocyte size but without differences in number [17, 18]. CH may be induced as an adaptive response to pressure or volume stress [18, 19] and includes both pathological and physiological heart growth [17, 20]. Pathological CH is an adaptive response of the myocardium to diseases such as hypertension, myocardial infarction, ischemia, valvular heart disease, and genetic mutations [21, 22] and has been associated with heart failure and premature death [23]. Other attributes of pathological CH are interstitial fibrosis, apoptosis, ischemia, and overexpression of fetal genes [17, 24]. Meanwhile, physiological growth of the heart has been related to pregnancy, normal postnatal development, and intense athletic practices. This growth is accompanied by increased capillary density, proportional chamber enlargement, absence of interstitial fibrosis, and normal or enhanced heart performance [20]. Interestingly, a study by

Nogueira et al., [25] proposed that Epi may be a mimetic of exercise because mice treated with flavanol showed an increased exercise capacity associated with an increase in the number of capillaries in the muscle of the hind limb and a greater amount of striated muscle mitochondria and mitochondrial biogenesis signaling. However, to date there are no studies aimed at determining the potential beneficial effects of Epi in normal heart. In order to test this, using Western blot we evaluated the PI3K/Akt signaling pathway in the healthy hearts of Epi-treated mice. Additionally, morphometric analysis of the mouse heart was performed and we evaluated the presence of interstitial fibrosis. We also analyzed pathological and physiological CH canonical markers in addition to the measurement of hemodynamic parameters.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animal model

Twelve-week-old male CD-1 mice were used for all experiments. All procedures were performed in accordance with the ethics code of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and the U.S. Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources (<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>) approved in Mexico by the National Academy of Medicine and in accordance with the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. In addition, the procedures were approved by the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (No. CICAL-04/15-08-2014) of the School of Medicine, National Polytechnic Institute of Mexico.

### 2.2 Experimental design and approach

In order to examine the effects of Epi on mice heart, 52 mice were allocated into two groups ( $n = 26$  animals/group): water-treated (control, Ctrl) and Epi-treated (Epi). Mice were provided with either vehicle (water) or 1 mg/kg body mass of Epi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) by oral gavage twice daily (morning and evening) for 2 wk. After 15 days of treatment, mice were sacrificed by cervical dislocation after 80 mg/kg body weight (BW) of ketamine (ketamine hydrochloride 200 mg/mL) and 10 mg/kg BW of xylazine (xylazine

hydrochloride 20 mg/mL) injected i.p. In addition, two groups of six mice each were treated for 2 wk with Epi or vehicle, respectively, and then were left untreated for 4 wk. Hearts of all animals were collected and weighed. Tissue weight was recorded and normalized to BW and analyzed as previously described [26]. The organs were then harvested and used for histological and biochemical analyses. Other mice were anesthetized with the same dosage and prepared to measure the hemodynamic parameters.

### 2.3 Histological analysis

In order to evaluate the thickness of the ventricles and septum walls (SPs) and the area of 200 cardiac muscle fibers of papillary muscle, the hearts were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin blocks. Four-micrometer cross sections were obtained 3 mm below the atrioventricular groove and stained with hematoxylin and eosin. Thickness of the left and right ventricle (RV) free walls and SP were measured at three different sites (left ventricle (LV) 1, LV2, LV3, RV1, RV2, RV3, SP1, SP2, and SP3, respectively) as previously reported by Kershaw et al. [27]. The area of the papillary muscle fibers was classified according to the following categories: category 1,  $10 < 100 \mu\text{m}^2$ ; category 2,  $100 < 200 \mu\text{m}^2$ ; category 3,  $200 < 300 \mu\text{m}^2$ ; category 4,  $300 < 400 \mu\text{m}^2$ ; category 5,  $500 < 600 \mu\text{m}^2$ ; category 6,  $600 < 700 \mu\text{m}^2$ ; category 7,  $700 < 800 \mu\text{m}^2$ ; category 8,  $800 < 900 \mu\text{m}^2$ ; category 9,  $900 < 1000 \mu\text{m}^2$ ; and category 10,  $1000 < 1100 \mu\text{m}^2$  [27]. Furthermore, possible areas of heart fibrosis were observed by Masson's trichrome staining of 4- $\mu\text{m}$  serial sections. All evaluations were performed with the Axiophot 2 microscope, Cannon PowerShot A75 camera and AxioVision software.

### 2.4 Western blotting

Approximately 50 mg of heart muscle was homogenized with a Polytron in 500  $\mu\text{L}$  RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) with protease and phosphatase inhibitors (P2714 and P2850, Sigma-Aldrich) and supplemented with 0.15 mM PMSF, 5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 3 mM NaF (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Homogenates were passed five times through an insulin syringe, sonicated for 30 min at 4°C and centrifuged at 14 000 rpm for 10 min. The supernatant containing total protein was transferred to a new tube and the protein concentration was quantified by the Bradford method. Then, 40  $\mu\text{g}$  of protein was loaded onto a 4–15% denaturing SDS-PAGE gel and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$ , Pierce, P01-88018). Membranes were incubated for 1.5 h in blocking solution (5% powdered skim milk PBS plus 0.1% Tween 20 (PBS-T)) followed by incubation for 14 h at 4°C with appropriate rabbit polyclonal primary antibody. All primary antibodies were diluted 1:1000 in 5% powdered skim milk PBS-T. Then, membranes were washed

( $3 \times 5$  min) with PBS-T and detection of interest proteins was done with SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate kit (34095, Thermo Scientific). Band intensities were digitally quantified using LI-COR Image Studio software ([http://www.licor.com/bio/products/software/image\\_studio\\_lite/](http://www.licor.com/bio/products/software/image_studio_lite/)).

### 2.5 Antibodies

All primary antibodies were obtained from commercial sources and used according to the manufacturer's recommendations. To evaluate the pathological CH pathway, we used anti-CaMI (sc-5537), anti-phospho CaMI (sc-17019) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CaMKII (#3362), anti-phospho CaMKII (#3361) (Cell Signaling Technology, Inc.), anti-ANP (sc-20158) (where ANP is atrial natriuretic peptide), anti-BNP (sc-20159) (where BNP is brain natriuretic peptide), anti-MYH7 (sc-53090) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and anti-Collagen III (ab7778, Abcam). To evaluate physiological CH pathway, we used anti-PI3K (#4292), anti-phospho-PI3K Tyr458/Tyr199 (#4228), anti-AKT (#9272), anti-phospho-AKT Ser473 (#4058), anti-mTOR (#2983) (where mTOR is mammalian target of rapamycin), anti-phospho-mTOR Ser2448 (#5536), anti-p70S6K (#2708) (where p70S6K is ribosomal protein S6 kinase beta-1), and anti-phospho-p70S6K Thr389 (#9234) (Cell Signaling Technology, Inc.). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (PA1-988, ThermoFisher Scientific) was used as a loading Ctrl. Secondary antibody was HRP-goat anti-rabbit IgG (65-6120, ThermoFisher Scientific).

### 2.6 Evaluation of hemodynamics

Hemodynamic parameters were analyzed in the Epi-treated group and compared with Ctrl mice. Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 80 mg/kg BW of ketamine and 10 mg/kg BW of xylazine. Hemodynamic measurements were performed according to the protocol described by Pacher et al. [28] with modifications. An incision along the midline of the neck was made followed by a tracheotomy by the Seldinger technique using a 19-gauge angiocatheter needle. Mice were maintained at 37°C and mechanically ventilated with room air, supplemented with low-flow oxygen using a small animal ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, MA) at a tidal volume according to BW and a respiratory ratio 1:3. After 10 min of stabilization, an incision was made in the chest, and the skin was separated from it. Using a 25–30 gauge needle, a wound was made near the apex of the heart and the needle was removed. A pressure–volume catheter was then inserted (SPR-869, Millar Instruments, Houston, TX, USA) into the LV until the proximal electrode on the catheter was just inside the ventricular wall. After 10 min stabilization of the signal, the cardiac parameters were recorded for 30 min. At the conclusion of

the experiment, the catheter was removed and the animal was euthanized by cervical dislocation. The following hemodynamic parameters were monitored continuously: heart rate (HR), left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular end-systolic volume, left ventricular end-diastolic volume, stroke work, stroke volume (SV), cardiac output (CO), relaxation time constant ( $\tau$ ), ejection fraction (EF), maximal and minimal change in rate of left ventricular pressure rise ( $dP/dt$  max and  $dP/dt$  min), left ventricular work minute (LVWM), and end-systolic elastance. Data acquisition was recorded with the MPVS Ultra Foundation System (ADInstruments, Spechbach, Germany) and analyzed with the LabChart Pro Software (ADInstruments).

## 2.7 Statistical analyses

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. All data were analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). Data distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. Two-tailed Student *t*-test and Mann–Whitney *U* test were used to determine differences between groups when appropriate; *p* value < 0.05 was accepted as statistically significant.

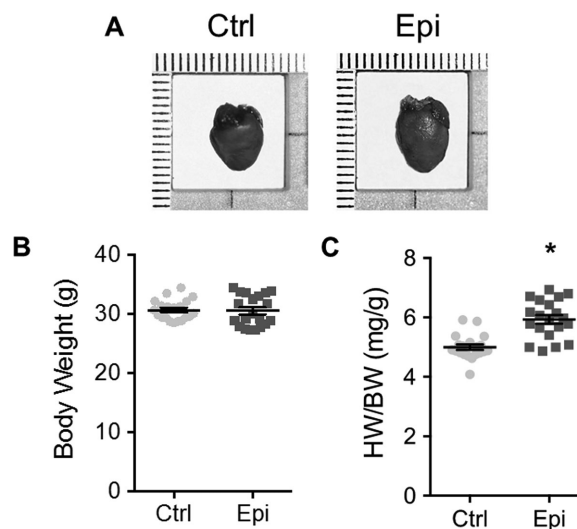
## 3 Results

### 3.1 Epi increases heart weight in healthy mice

It has been reported that Epi increases NO production through the PI3K/Akt and  $Ca^{2+}$ /CaMI/CaMKII pathways [14], which have physiological relevance for the induction of physiological and pathological CH, respectively [20]. Consequently, we analyzed the increase in heart weight (HW) in Epi-treated mice in 15 days. Initially, using simple light microscopy, we observed an enlargement of the hearts of animals treated with Epi (Fig. 1A). To confirm this observation, we measured the BW and HW of the animals. No significant differences were detected in BW in Ctrl group versus Epi group ( $30.65 \pm 0.38$  g and  $30.51 \pm 0.57$  g) (Fig. 1B). In contrast, HW/BW increased 18.7% ( $p < 0.0001$ ,  $n = 20$ ) in the Epi group in comparison with the Ctrl group ( $5.93 \pm 0.14$  and  $4.99 \pm 0.09$ , respectively) (Fig. 1C).

### 3.2 Epi increases the size of the septum and the left free wall in healthy mice

Most of the stimulus leading to CH concurs with free wall thickness increase. To evaluate this parameter in Epi-treated mice, three positions for the right and left free wall and three for the septum were measured (Fig. 2A–D). The thickness of these structures was increased in the Epi group compared with the Ctrl group although the right free wall increase had



**Figure 1.** Comparison of HW and BW (HW/BW) ratio in Ctrl and Epi-treated mice. Representative heart images of Ctrl and Epi group (A). BW is similar in both groups (B), whereas HW/BW ratio shows a significant difference between Ctrl and Epi-treated mice (C). Dispersion plots shown as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.0001$  versus Ctrl group by two-tailed Student *t*-test ( $n = 20$  per group).

no statistical significance (Fig. 2B). Particularly, SP1 and SP2 positions of the septum showed a significant increase of thickness of 29 and 14%, respectively ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), whereas in position SP3 there was a slight increase in thickness (Fig. 2C). Moreover, LV1, LV2, and LV3 positions of the LV showed a significant increase of wall thickness (27.5, 30.2, and 16.8%, respectively;  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 2D).

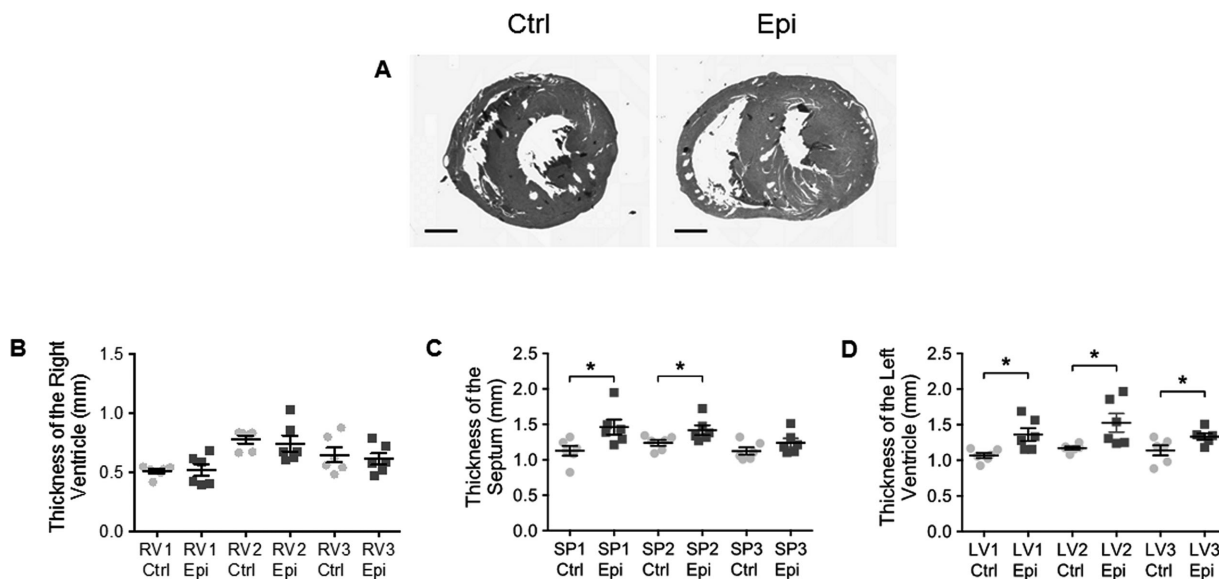
### 3.3 Epi increases the size of cardiac fibers in healthy mice

Because an increase in size of the heart fibers is one of the hallmarks in physiological or pathological CH, we assessed whether Epi treatment induces an increase of fiber size. Based on the evaluation of the area of 200 fibers per papillary muscle, a statistically significant difference was revealed in the median area between groups ( $211.34 \pm 2.63 \mu\text{m}^2$  for the Ctrl group and  $342.62 \pm 5.04 \mu\text{m}^2$  for the Epi group;  $p < 0.0001$ ,  $n = 1200$ ) (Fig. 3A–D).

### 3.4 Effect of Epi treatment in cardiac mass is reversible

In order to assess whether the observed CH was reversed in the absence of stimulus, two groups of six mice each were treated for 2 wk with Epi or vehicle, respectively. After a 4-wk period without treatment we evaluated the HW/BW ratio, thickness of the ventricular walls, and size of the papillary



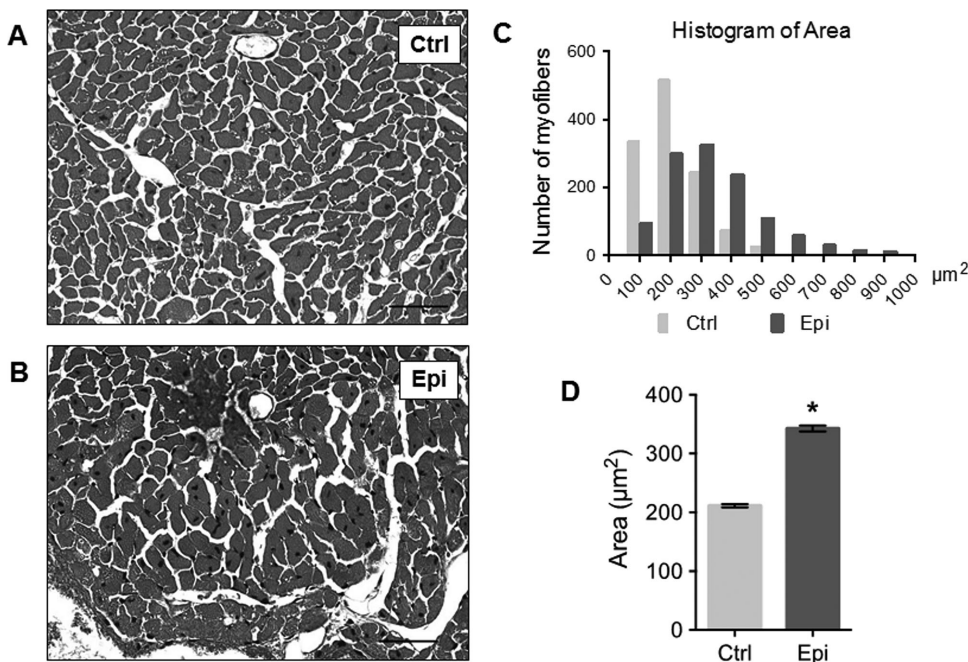


**Figure 2.** Comparison of myocardium free wall thickness in Ctrl and Epi-treated mice. Morphometric analysis of histological heart sections of Ctrl and Epi-treated mice (A) was carried out according to Section 2. Scale bars = 1000  $\mu\text{m}$ . Epi treatment does not induce thickening of the RV walls (B) although it induces thickening of SP in the SP1 and SP2 positions (C) and left ventricular wall in all positions (D). Dispersion plots shown as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus Ctrl group by two-tailed Student  $t$ -test ( $n = 6$  per group).

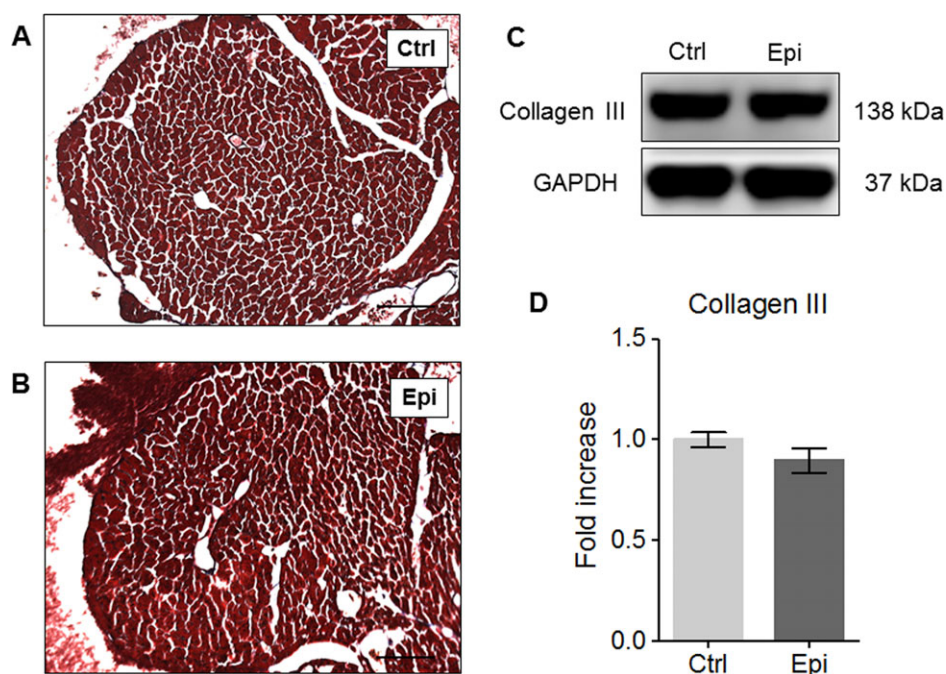
cardiac fibers. The analysis showed no significant differences in HW/BW ratio between groups (Supporting Information Fig. 1) nor in RV, LV, and SP wall thickness at any position (Supporting Information Fig. 2).

Although there was a significant difference in cardiac fiber size of the two groups, a tendency was observed toward the

reduction of the size of the area of the Epi-treated mice fibers (Supporting Information Fig. 3). This was consistent with the reduction in the significance of this difference ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) as compared to the significance observed between the Ctrl and the Epi-treated group evaluated immediately after 2 wk of treatment (Fig. 3,  $p < 0.0001$ ,  $n = 6$ ).



**Figure 3.** Comparison of cardiac fiber size in Ctrl and Epi-treated mice. Size of cardiac fiber area was evaluated in H/E staining of papillary muscles (A, B). Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ . Histogram of area shows the distribution of cells in Ctrl (gray bars) and Epi group (black bars) (C). Comparison data are plotted as mean  $\pm$  SEM (D). Note the significant increase of the size in the cardiac fibers of Epi-treated mice. \* $p < 0.0001$  versus Ctrl group by Mann–Whitney  $U$  test ( $n = 1200$ ).



**Figure 4.** Histological and Western blot analysis in Ctrl and Epi-treated mice. Masson's trichrome staining shows no evidence of fibrosis in tissue sections of papillary muscles of the heart (A, B). Scale bars = 100  $\mu$ m. Western blot (C) and densitometry (D) analysis revealed a similar level of the collagen III fibrosis marker in both groups. Bar graphs show densitometric analysis as protein/GAPDH. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Nonsignificant differences between groups after two-tailed Student *t*-test ( $n = 6$  per group).

### 3.5 Epi does not induce cardiac fibrosis in healthy mice

The presence of interstitial fibrosis in histological sections of hearts is associated with pathological CH [29]. To determine its presence in Epi-treated mice, sections of papillary muscle were stained with Masson's trichrome. Histological analysis from treated and untreated heart mice revealed no evidence of fibrosis ( $n = 6$ ) (Fig. 4A–B), which was observed in the hearts of mice with dilated cardiomyopathy (data not shown). It was in accordance with no increment of the relative levels of collagen III (Fig. 4C and D).

### 3.6. Epi does not activate the $Ca^{2+}$ /CaMI/CaMKII pathway

Epi has the potential to activate the  $Ca^{2+}$ /CaMI/CaMKII pathway and to increase NO production in endothelial cells [14]. In addition, this signal transduction pathway has been associated with pathological CH [16]. Remarkably, immunoblot analysis showed no increase in the protein or phosphorylation levels of CaMI/CaMKII in the hearts of Epi-treated mice ( $n = 6$ ) (Fig. 5A and B).

### 3.7 Epi does not increase expression of ANP, BNP, and $\beta$ -MHC

Overexpression of  $\beta$  myosin heavy chain beta ( $\beta$ -MHC) and the natriuretic peptides ANP and BNP has been used as a pa-

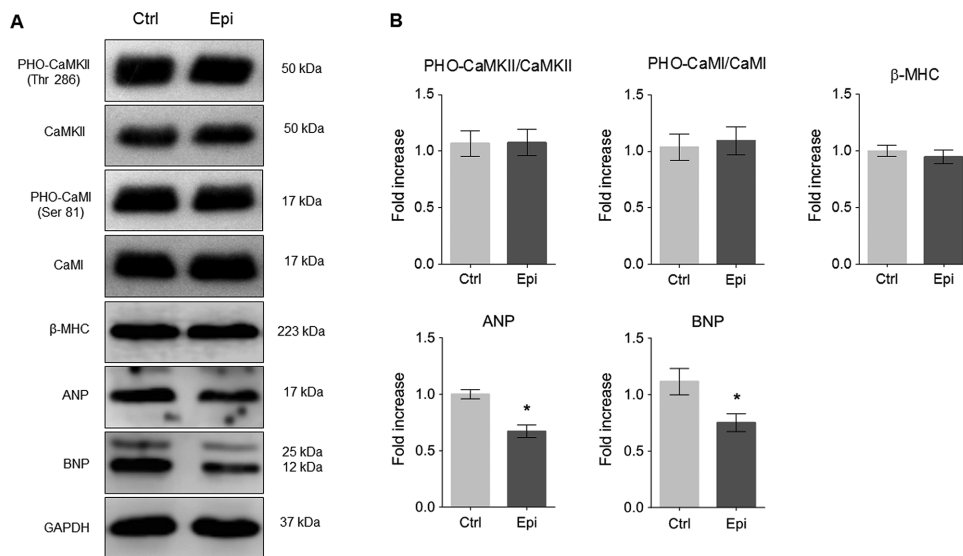
rameter of pathological CH in humans and in animal models [30]. In order to assess whether Epi increased the level of these proteins, Western blot assays for  $\beta$ -MHC, ANP, and BNP were carried out (Fig. 5A). No modification in the  $\beta$ -MHC level was detected (Fig. 5A–B). In contrast, Epi treatment induced a significant reduction of ANP and BNP levels (Fig. 5A–B) ( $p < 0.05$  versus Ctrl,  $n = 6$ ).

### 3.8 Epi activates the PI3K/Akt pathway

In endothelial cells, Epi induces activation of eNOS as well as increases NO production by activation of the PI3K/Akt pathway [15]. It is known that this pathway activates sarcomeric genes, increases the amount of contractile proteins and contributes to physiological CH [20, 31, 32]. Based on this, we evaluated the effect of Epi on this signal transduction pathway. Western blot assays showed a significant increase in the phosphorylation level of PI3K, AKT, mTOR, and p70S6K of the Epi-treated animal hearts ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 6A–B). In contrast, no variation in total protein level was detected in both groups.

### 3.9 Effect of Epi on cardiac hemodynamic parameters in healthy mice

In pathological CH, it has been described that ventricular dysfunction is associated with decreased left ventricular systolic function (EF) [33] and abnormalities in myocardial relaxation, whereas adaptive hypertrophy is consistent with normal left ventricular systolic and diastolic function [34]. Our results



**Figure 5.** Effect of Epi on pathological CH pathway. Immunoblotting analysis shows a similar level of PHO-CaMKII, CaMKII, PHO-CaMI, CaMI, and β-MHC in Ctrl and Epi-treated mice; contrary, in the Epi-treated group was evident a significantly lower level of ANP and BNP (A). These results were more evident by the densitometry and statistical analysis of the revealed proteins (B). Bar graphs show densitometry analysis of protein/GAPDH or PHO-protein/total protein. Data are expressed as mean ± SEM. \* $p < 0.05$  versus Ctrl group by two-tailed Student *t*-test ( $n = 6$  per group).

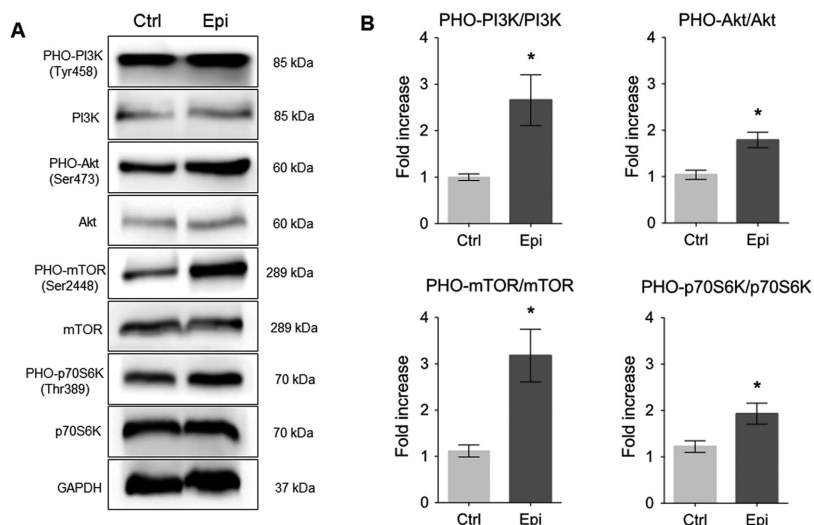
showed that HR, LVESP, stroke work, CO, dP/dt max and dP/dt min, and LVWM decreased in the Epi group in comparison with Ctrl group ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). The tau increased in the Epi group in comparison with Ctrl group ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), whereas other hemodynamic parameters such as LVEDP, left ventricular end-systolic volume, LVEDV, SV, EF, and end-systolic elastance did not change between groups ( $n = 6$ ) (Table 1).

## 4 Discussion

Both pathological and physiological changes are associated with increased heart mass although they are regulated by different signaling pathways [20]. Pathological hypertrophy is characterized by upregulation of fetal genes, fibrosis, and cardiac dysfunction. In contrast, in physiological hypertro-

phy, cardiac structure and function remain normal. The flavanol Epi activates endothelial cells eNOS via PI3K/Akt and  $Ca^{2+}$ /CaMI/CaMKII signaling pathways [13, 14, 35], which have been associated with physiological and pathological heart growth, respectively [17, 20, 24]. Additionally, Epi has been tested as a molecule with cardioprotective properties in animal models under pathological conditions; however, there are no studies focused on the potential beneficial effects that this flavanol may have on the normal heart. Our results showed that Epi treatment induces an increase in cardiac mass, which correlated with augmented myofiber size and thickness of the septum and left ventricular wall.

Several reports indicate that physiological CH is a reversible phenomenon [17, 20, 24]. According to this, we evaluated whether cardiac Epi-induced growth follows this pattern. Results revealed that CH was reversible 4 wk after the administration of flavanol. The only parameter that



**Figure 6.** Effect of Epi on PI3K/Akt pathway. Immunoblotting analysis shows an increment in the level of all phosphorylated proteins (PHO-PI3K, PHO-Akt, PHO-mTOR, and PHO-p70S6K) in the Epi-treated group versus Ctrl group but not of the total proteins (PI3K, Akt, mTOR, and p70S6K) (A). Significance of this increment was determined by densitometry and statistical analysis of PHO-protein/total protein ratio in both groups (B). Data are expressed as mean ± SEM. \* $p < 0.05$  versus Ctrl group by two-tailed Student *t*-test ( $n = 6$  per group).

**Table 1.** Effect of Epi on cardiac hemodynamic parameters

Parameter	Ctrl ( <i>n</i> = 8)	Epi ( <i>n</i> = 8)
HR (bpm)	418.01 ± 17.59	343.97 ± 6.34**
LVESP (mmHg)	76.47 ± 8.06	51.69 ± 2.93*
LVEDP (mmHg)	7.55 ± 2.32	7.11 ± 1.33
LVESV (μL)	51.50 ± 3.08	47.12 ± 2.27
LVEDV (μL)	55.59 ± 3.26	49.28 ± 2.66
SW (mmHg/μL)	351.87 ± 80.70	163.00 ± 39.53*
SV (μL)	7.57 ± 1.31	4.89 ± 1.02
CO (mL/min)	3.10 ± 0.47	1.85 ± 0.31*
tau (ms)	15.27 ± 1.98	25.41 ± 4.00*
EF (%)	86.33 ± 2.05	90.40 ± 1.71
dP/dt max (mmHg/s)	4311 ± 511.60	2371 ± 294.30**
dP/dt min (mmHg/s)	−3094 ± 389.30	−1603 ± 209.00**
LVWM (mmHg/s* bpm)	143582 ± 30439	55569 ± 13344*
Ees	1.508 ± 0.16	1.118 ± 0.08
HW/BW (mg/g)	4.99 ± 0.41	5.93 ± 0.64***

Data are expressed as mean ± SEM (*n* = 8 per group). Data obtained during 30 min of cardiac function,

\**p* < 0.05,

\*\**p* < 0.001,

\*\*\**p* < 0.0001 versus Ctrl group with two-tailed Student *t*-test.

LVESV, left ventricular end-systolic volume; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; SW, stroke work; Ees, end-systolic elastance.

showed a significant difference between groups was the fiber area. It is reasonable to assume that a longer period without the stimulus is required to observe the same distribution in cardiac fiber size.

Remarkably, cardiac changes observed in our study were accompanied by lower levels of the pathological CH universal markers ANP and BNP as well as with unaltered levels of β-MHC, CaMI, CaMKII, and absence of fibrosis. Reduction in the levels of ANP and BNP suggests that Epi may downregulate some genes of the signaling pathway for pathological CH.

Overactivation of calcineurin by the Ca<sup>2+</sup>/CaMI complex induces dephosphorylation of NFAT transcription factor family members in the cytosol of cardiomyocytes and their translocation to the nucleus. By interacting with GATA4 and MEF2 transcription factors [36], expression of natriuretic peptides ANP and BNP, universal markers of hypertrophy-associated heart failure, was stimulated. This process has been associated with overexpression of the fetal β-MHC and α skeletal actin (α-sk-actin) genes [37], ventricular dysfunction and pathological CH. On the other hand, activation of the myocardium PI3K/Akt signaling pathway is usually accompanied by an increment in the levels of sarcomeric protein during intense exercise or during pregnancy [31]. Furthermore, its activation has also been implicated as a necessary pathway for the natural growth of myocardium and as a potential mechanism to improve cardiac function under pathological conditions [38–40]. We demonstrated here that Epi treatment induced a significant increase in the phosphorylation level of PI3K, Akt, mTOR, and p70S6K proteins. Hence, our data substantiate the concept that Epi induces an adaptive cardiac growth.

Similar to what occurs as a result of intense exercise, in skeletal muscle Epi treatment increases the expression level of PGC1-α, mitochondrial biogenesis, and protein energy production as well the oxidative capacity and fatigue resistance [25, 41, 42]. Interestingly, Epi-treated mouse hearts showed a similar exercise-induced growth. Morphometric analysis showed that Epi induced a symmetrical increase of the left ventricular free wall and uniform thickening of the septum, a pattern associated with ventricular enlargement of athlete's heart with physiological CH [43]. On the contrary, in pathological CH the left ventricular enlargement is often asymmetrical with different thicknesses along the ventricular wall and larger ventricular septum [43]. Another feature of pathological CH is a decrease of the left ventricular cavity, which results in a lower blood load in the ventricular cavity [44].

These results prompted us to analyze hemodynamic parameters in Epi-treated mice. Remarkably, the results revealed that Epi induced adaptive changes similar to those observed in athletes. In this regard, a negative chronotropic and a positive lusitropic effect was observed. The negative chronotropic effect has been associated with increased left ventricular wall contraction which, during a contraction, causes a delay in ejection time without modifications of intra-ventricular volume [45]. This phenomenon is also present in athlete's heart accompanied by an increase of SV and CO or is maintained with a slight increase [46]. In our study, although we did not find an SV change in Epi-treated mice, a reduction of CO was evident, which may be a direct reflection of the vasodilator effect of the flavanol Epi [10, 14, 47, 48].

The positive lusitropic effect on the athlete's heart is a consequence of the absence of fibrosis during the remodeling process. Instead, there is an adaptive remodeling that avoids ventricular stiffness, allowing the heart to adjust to volume changes as a consequence of the exercise [49]. This effect was evident in Epi-treated mice that showed an increase in the tau constant as a consequence of the adaptive remodeling. Absence of stiffness, initially inferred from the histological data, also correlates with decrease in the LVESP, dP/dt max, and dP/dt min and maintains the LVEDP, similar to the parameters of an athlete's heart [49]. A decrease in the LVESP with normal volumes in the treated animals may suggest a dilated cardiomyopathy process; however, LVWM was decreased and EF remained preserved in relation to the Ctrl group. Consequently, our findings support the proposal that Epi induces adaptive heart remodeling, similar to that observed in athlete's heart with an increased ventricular wall thickness working efficiently to preserve ventricular systolic function without rigidity. This contrasts with the left ventricular dilatation associated with congestive heart failure and pump dysfunction [50, 51]. Nevertheless, further studies will be necessary to analyze the effect of Epi in chronic treatments.

In summary, our study provides evidence that Epi may trigger signal pathways related to the cardiovascular adaptation that occurs in response to increased oxygen demand during exercise and suggests potential cardiovascular therapeutic uses of this flavanol.

R. M. C. V. and S. D. S. designed the research. S. D. S., V. G. P., S. H. R., C. P. F., C. J. G. G., C. Z., and P. C. conducted the research. S. D. S., P. C., and R. M. C. V. analyzed data and performed statistical analyses. R. M. C. V., S. D. S., and P. C. wrote the paper.

Sergio de los Santos Enriquez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship #317540 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, Grant (CB-2014-01-243134). The authors thank MVZ Gerardo Arrellín Rosas, Facultad de Ciencias, Universidad Panamericana, for advice on the use and handling of animals for the development of this work.

Sharon Morey, Executive Editor, Scientific Communications, reviewed the English grammar.

The authors have declared no conflict of interest.

Ethical standards. All authors in this study gave their informed consent prior to their inclusion in the study. The manuscript described animal studies that were approved by the Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (No. CICAL-04/15-08-2014) of the School of Medicine of the National Polytechnic Institute of Mexico.

## 5 References

- [1] Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H. et al., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 1995, *155*, 381–386.
- [2] Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. et al., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993, *342*, 1007–1011.
- [3] Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996, *312*, 478–481.
- [4] Joshipura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J. et al., The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 2001, *134*, 1106–1114.
- [5] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. et al., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, *79*, 727–747.
- [6] Heiss, C., Dejam, A., Kleinbongard, P., Schewe, T. et al., Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 2003, *290*, 1030–1031.
- [7] Neukam, K., Stahl, W., Tronnier, H., Sies, H. et al., Consumption of flavanol-rich cocoa acutely increases microcirculation in human skin. *Eur. J. Nutr.* 2007, *46*, 53–56.
- [8] Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F. J., Kromhout, D., Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch. Intern. Med.* 2006, *166*, 411–417.
- [9] Engler, M. B., Engler, M. M., The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr. Rev.* 2006, *64*, 109–118.
- [10] Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G. et al., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, *74*, 418–425.
- [11] Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P. et al., (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, *103*, 1024–1029.
- [12] Yamazaki, K. G., Romero-Perez, D., Barraza-Hidalgo, M., Cruz, M. et al., Short- and long-term effects of (–)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008, *295*, H761–H767.
- [13] Ramirez-Sanchez, I., Aguilar, H., Ceballos, G., Villarreal, F., (–)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT. *Mol. Cell. Biochem.* 2012, *370*, 141–150.
- [14] Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., Villarreal, F., (–)-Epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* 2010, *55*, 1398–1405.
- [15] Aoyagi, T., Matsui, T., Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Curr. Pharm. Des.* 2011, *17*, 1818–1824.
- [16] Zhang, T., Brown, J. H., Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2004, *63*, 476–486.
- [17] Hill, J. A., Olson, E. N., Cardiac plasticity. *N. Engl. J. Med.* 2008, *358*, 1370–1380.
- [18] Sadoshima, J., Izumo, S., The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 1997, *59*, 551–571.
- [19] Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., Hill, J. A., Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004, *109*, 1580–1589.
- [20] Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., McMullen, J. R., Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 2010, *128*, 191–227.
- [21] Drazner, M. H., The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 2011, *123*, 327–334.
- [22] Seidman, J. G., Seidman, C., The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001, *104*, 557–567.
- [23] Norton, G. R., Woodiwiss, A. J., Gaasch, W. H., Mela, T. et al., Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002, *39*, 664–671.
- [24] Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L., McMullen, J. R., Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol.* 2015, *89*, 1401–1438.
- [25] Nogueira, L., Ramirez-Sanchez, I., Perkins, G. A., Murphy, A. et al., (–)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J. Physiol.* 2011, *589*, 4615–4631.

- [26] Gray, H., Heart-weight and body-weight in rodents. *J. Mammal.* 1945, *26*, 285–299.
- [27] Kershaw, O., Heblinski, N., Lotz, F., Dirsch, O. et al., Diagnostic value of morphometry in feline hypertrophic cardiomyopathy. *J. Comp. Pathol.* 2012, *147*, 73–83.
- [28] Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Bátkai, S. et al., Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc.* 2008, *3*, 1422–1434.
- [29] Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R. et al., Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- $\beta$ . *J. Clin. Invest.* 2010, *120*, 3520–3529.
- [30] Barry, S. P., Davidson, S. M., Townsend, P. A., Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008, *40*, 2023–2039.
- [31] McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O. et al. Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* 2004, *24*, 6231–6240.
- [32] Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C. N., Singh, R., Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol. Res.* 2010, *61*, 269–280.
- [33] Levy, D., Murabito, J. M., Anderson, K. M., Christiansen, J. C. et al., Echocardiographic left ventricular hypertrophy: clinical characteristics. The Framingham Heart Study. *Clin. Exp. Hypertens. A* 1992, *14*, 85–97.
- [34] Lorell, B. H., Carabello, B. A., Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 2000, *102*, 470–479.
- [35] Moreno-Ulloa, A., Romero-Perez, D., Villarreal, F., Ceballos, G., Ramirez-Sanchez, I., Cell membrane mediated (–)-epicatechin effects on upstream endothelial cell signaling: evidence for a surface receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, *24*, 2749–2752.
- [36] Dirx, E., da Costa Martins, P. A., De Windt, L. J., Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1832*:2414–2424.
- [37] Caforio, A. L., Grazzini, M., Mann, J. M., Keeling, P. J. et al., Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992, *85*, 1734–1742.
- [38] McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O. et al., Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, *100*, 12355–12360.
- [39] Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J. et al., The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 2000, *19*, 2537–2548.
- [40] McMullen, J. R., Amirahmadi, F., Woodcock, E. A., Schinke-Braun, M. et al., Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, *104*, 612–617.
- [41] Ramirez-Sanchez, I., De los Santos, S., Gonzalez-Basurto, S., Canto, P. et al., (–)-Epicatechin improves mitochondrial-related protein levels and ameliorates oxidative stress in dystrophic  $\delta$ -sarcoglycan null mouse striated muscle. *FEBS J.* 2014, *281*, 5567–5580.
- [42] Ramirez-Sanchez, I., Nogueira, L., Moreno, A., Murphy, A. et al., Stimulatory effects of the flavanol (–)-epicatechin on cardiac angiogenesis: additive effects with exercise. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2012, *60*, 429–438.
- [43] Cheng, T. O., Hypertrophic cardiomyopathy vs athlete's heart. *Int. J. Cardiol.* 2009, *131*, 151–155.
- [44] Maron, B. J., Pelliccia, A., The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation* 2006, *114*, 1633–1644.
- [45] Baggish, A. L., Wood, M. J., Athlete's heart and cardiovascular care of the athlete: scientific and clinical update. *Circulation* 2011, *123*, 2723–2735.
- [46] Nottin, S., Doucende, G., Schuster-Beck, I., Dauzat, M. et al., Alteration in left ventricular normal and shear strains evaluated by 2D strain echocardiography in the athlete's heart. *J. Physiol.* 2008, *586*, 4721–4733.
- [47] Galleano, M., Bernatova, I., Puzserova, A., Balis, P. et al., (–)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB Life* 2013, *65*, 710–715.
- [48] Jiménez, R., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J. Agric. Food Chem.* 2012, *60*, 8823–8830.
- [49] Fagard, R., Athlete's heart. *Heart Br. Card. Soc.* 2003, *89*, 1455–1461.
- [50] Konstam, M. A., Kronenberg, M. W., Rousseau, M. F., Udelson, J. E. et al., Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dilation in patients with asymptomatic systolic dysfunction. *Circulation* 1993, *88*:2277–2283.
- [51] Cohn, J. N., Johnson, G. R., Shabetai, R., Loeb, H. et al., Prognostic significance of serial changes in left ventricular ejection fraction in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993, *87*, V15–V116.