



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DEL COMPUESTO IFC-305 SOBRE LAS PROTEÍNAS QUE  
PARTICIPAN EN LA REMODELACIÓN CARDIACA DESPUÉS DE UN  
INFARTO AL MIOCARDIO INDUCIDO POR ISOPROTERENOL EN  
RATAS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**BRENDA ELIZABETH MIRANDA HERNÁNDEZ**

**ASESORA: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA Y HAZAS**

**CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Efecto del compuesto IFC-305 sobre las proteínas que participan en la remodelación cardiaca después de un infarto al miocardio inducido por Isoproterenol en ratas.**

Que presenta la pasante: **Brenda Elizabeth Miranda Hernández**  
Con número de cuenta: **308243464** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Abril de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                                | FIRMA |
|----------------------|---------------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dra. Victoria Eugenia Chagoya y Hazas |       |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. Luisa Martínez Aguilar           |       |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dra. Jazmín Flores Monroy             |       |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | L.F. Raúl Sampieri Cabrera            |       |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | L.B.D. Diego Lezama Martínez          |       |

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

LMCF/cga\*

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.**

El presente trabajo fue elaborado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el laboratorio de la doctora Victoria Chagoya Hazas del departamento de biología celular y del desarrollo con los apoyos de DGAPA-UNAM IN208915 y CONACyT 240315. Se agradece el apoyo de ayudante de investigador brindado por el CONACyT; CVU: 716575.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por abrirme sus puertas y con ello brindarme la oportunidad de acceder al mundo del conocimiento, desde hace 10 años.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) por aprender de sus profesores dentro de sus aulas y sus laboratorios.

Al Instituto de Fisiología Celular, particularmente al laboratorio 305 sur por brindarme la oportunidad de seguir formándome, y muy en especial a la Doctora titular del laboratorio Victoria Chagoya Hazas por haberme asesorado a lo largo de este trabajo.

Agradezco de manera especial al M. en C. Jesús Rafael Rodríguez Aguilera por su asesoría a lo largo de este proyecto y apoyo a durante los experimentos, también por el enriquecimiento de sus observaciones y comentarios sobre el escrito de la tesis.

Se agradece la ayuda técnica proporcionada por la Dra. Nora Gabriela Velasco Loyden, la Dra. Mariana Domínguez López, la M. en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca y el Psic. Gabriel Carmona Rosas.

Agradezco al Doctor Alberto Fraustro Aranda, Jefe del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología y a los técnicos Olga Pérez Reyes, Ana Beatriz Martínez Cervantes, Benito Salvador Chávez Rentería y Pablo Antonio Pérez Carillo por haber colaborado en la realización de los cortes histológicos, así como de su análisis.

También se agradece el apoyo brindado a lo largo de este proyecto a mis compañeros del laboratorio: al Dr. Enrique Chávez, a la M. en C. María Guadalupe Lozano Rosas, a la Biól. Nuria Guerrero Celis y al estudiante de B.E. Alejandro Rusbel Aparicio Cadena.

Se reconoce el trabajo del laboratorista Jesús Salgado Cortés y de las secretarías Rosario Villaseñor Ávila y Gabriela Valdés Silva.

Finalmente se agradece a los miembros del Jurado que revisaron y enriquecieron este trabajo con sus observaciones y comentarios:

Presidente: Dra. Victoria Eugenia Chagoya y Hazas

Vocal: Dra. Luisa Martínez Aguilar

Secretario: Dra. Jazmín Flores Monroy

1er suplente: L.F. Raúl Sampieri Cabrera

2do suplente: L.B.D. Diego Lezama Martínez

*Jesús fijando en ellos su mirada, les dijo: Para los hombres esto es imposible, pero para Dios todo es posible.*

*Mateo 19:26*

*In memoriam*

*A los animales de experimentación que dieron lugar a este trabajo.*

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS.**

A Dios, por darme la oportunidad de recorrer ese camino tan maravilloso y misterioso llamado vida.

A mis padres (Amada y Jorge) , por siempre estar al pendiente de mi hermano y de mí, esforzándose todos los días por sacarnos adelante, por su tiempo, sus cuidados, por apoyarnos, por su ejemplo, por sus consejos tan acertados y llenos de experiencia, por su sexto sentido, los quiero mucho.

A mi hermano Jorge Ricardo, por los buenos momentos en la niñez y por los buenos momentos ahora al lado de la familia, porque a su corta de edad me ha enseñado más de lo que podía pensar, siempre puedo aprender algo de él todos los días, te quiero.

A Ceci, porque hemos sabido conservar la amistad durante muchos años, gracias por tu apoyo (en especial cuando me enfermé), por estar al pendiente no solamente de mi si no de mi familia, por tus buenos consejos y por esos buenos recuerdos estudiantiles, te quiero amiga.

A la M.F.C Ma. Eugenia R. Posada Galarza por su amistad, por los buenos momentos en la facultad, sus clases de farmacología fueron las mejores para mí, la estimo mucho maestra.

A Jesús, por su tiempo, su paciencia, por esos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, pero sobre todo por su sincera amistad, aprendí mucho de su persona, te quiero Chucho.

A Lupita, Agustín y Darío, por su guía, por su amistad y por todo lo que está más allá de las palabras... los quiero.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....  | 9         |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | 11        |
| ÍNDICE DE GRAFICAS.....  | 12        |
| ÍNDICE DE TABLAS.....  | 12        |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>14</b> |
| 1.1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA.....   | 14        |
| 1.2 MORFOLOGÍA.....  | 14        |
| 1.2.1 Cámaras cardíacas y vascularización.....   | 14        |
| 1.2.3 Capas de la pared cardíaca.....  | 17        |
| 1.3 HISTOLOGÍA DEL CORAZÓN.....  | 18        |
| 1.4 INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.....  | 19        |
| 1.4.1 Prevalencia.....   | 20        |
| 1.4.2 Causas del infarto agudo al miocardio.....   | 20        |
| 1.4.3 Formas de diagnóstico en la clínica.....   | 22        |
| 1.5 REMODELACIÓN CARDIACA.....   | 23        |
| 1.5.1 Consecuencias de la remodelación.....  | 23        |
| 1.6 PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA REMODELACIÓN CARDIACA.....  | 26        |
| 1.6.1 Colágena.....  | 26        |
| 1.6.2 Receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR).....  | 28        |
| 1.6.3 Mecanismo de acción de los PPAR.....   | 29        |
| <b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>4. HIPÓTESIS.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>  | <b>44</b> |
| 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....  | 44        |
| <b>6. MÉTODOS.....</b>   | <b>44</b> |
| 6.1 Inducción de infarto con isoproterenol.....  | 44        |
| 6.2 Evaluación histopatológica de cortes transversales de corazón.....   | 45        |
| 6.3 Validación del modelo por medio de la evaluación de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) y creatina cinasa fracción MB (CK-MB)..... | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.4 Determinación cuantitativa de Lactato Deshidrogenasa (LDH).....  | 47        |
| 6.5 Determinación cuantitativa de creatina cinasa fracción MB (CK-MB) .....  | 49        |
| 6.6 Obtención de proteínas totales.....  | 50        |
| 6.7 Cuantificación de proteínas por método de Bradford.....  | 50        |
| 6.8 Western Blot.....  | 51        |
| <b>7. ANALISIS ESTADÍSTICO .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>8. RESULTADOS.....</b>  | <b>55</b> |
| 8.1 Tabla 4 Características macroscópicas de los corazones de cada condición en la etapa de remodelación cardiaca.....   | 55        |
| 8.2.1 Resumen de la descripción de los cortes transversales de corazón de rata tratados con Isoproterenol, de cada una de las condiciones en la etapa de remodelación cardiaca. ....       | 56        |
| 8.2.2 Esquema y micrografía de un corazón control, histologías teñidas con tricrómica de Masson. ....  | 57        |
| 8.2.3 Esquema y micrografías de un corazón tratado con Isoproterenol, histologías teñidas con tricrómica de Masson en la etapa de remodelación cardiaca. ....                              | 58        |
| 8.2.4 Esquema y micrografías de un corazón tratado con Isoproterenol más cuatro dosis de IFC-305, histologías teñidas con tricrómica de Masson, en la etapa de remodelación cardiaca. .... | 59        |
| 8.2.5 Esquema y micrografías de un corazón tratado con cuatro dosis de IFC-305, histologías teñidas con tricrómicas de Masson.....   | 60        |
| 8.2.6 Acercamientos de cortes histológicos de cada condición, gráfica que muestra el porcentaje de la zona infartada en la etapa de remodelación cardiaca.....                             | 61        |
| 8.3 Evaluación enzimática de CK-MB y LDH en la etapa de infarto.....   | 62        |
| 8.4 Evaluación de la cantidad de Colágena I y PPAR- $\gamma$ en la etapa de remodelación cardiaca. ....  | 64        |
| <b>9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>10. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>11 .PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>12 REFERENCIAS.....</b>   | <b>75</b> |
| Apéndice 1: Preparación de soluciones .....  | 79        |
| Anexo .....  | 81        |

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

| Abreviatura      | Significado   |
|------------------|---|
| ATP              | Trifosfato de Adenosina                                       |
| AMPc             | Adenosín Monofosfato cíclico                                  |
| ANF              | Factor Natriurético Atrial                                    |
| <i>Col1a1</i>    | Gen que codifica a la cadena alfa 1 de la colágena I          |
| <i>Col3a1</i>    | Gen que codifica a la cadena alfa 1 de la colágena 3          |
| CCl <sub>4</sub> | Tetracloruro de carbono                                       |
| CK-MB            | Creatina Fosfoquinasa fracción MB                             |
| DNA              | Ácido Desoxirribonucleico                                     |
| cDNA             | Ácido Desoxirribonucleico complementario                      |
| DNMT             | DNA metiltransferasa  |
| ECG              | Electrocardiograma  |
| EDTA             | Ácido etilendiaminotetracético                                |
| GAPDH            | Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa                      |
| GDP              | Difosfato de guanosina  |
| GTP              | Trifosfato de guanosina                                       |
| Gs               | Proteína G activada   |
| H                | horas   |
| HEPES            | Acido 2-[4-(2-hidroxiethyl) piperazina-1] etanosulfónico.     |
| HRP              | Peroxidasa de rábano  |
| IAM              | Infarto Agudo al Miocardio                                    |
| IFC-305          | Aspartil adenosina  |
| IgG              | Inmunoglobulina G   |
| Iso              | Isoproterenol   |
| i.p.             | Intraperitoneal   |
| KDa              | Kilo Dalton   |
| LDH              | Lactato Deshidrogenasa  |
| MEC              | Matriz Extracelular   |
| MnSOD            | Manganeso Superóxido Dismutasa                                |
| mM               | Milimolar   |
| NADPH            | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)    |
| NADP             | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma oxidada)     |
| Nm               | nanómetros  |
| Ng               | nanogramos  |
| OMS              | Organización Mundial de la Salud                              |
| PPAR             | Receptores Activados por Proliferador de Peroxisoma           |
| PPAR-γ           | Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisoma subtipo γ |
| PPAR-α           | Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisoma subtipo α |
| PPAR-δ           | Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisoma subtipo δ |
| <i>Pparg</i>     | Gen que codifica para el subtipo PPAR-γ                       |
| PBS              | Buffer de fosfatos  |
| PKA              | Proteína quinasa A  |

|              |  |
|--------------|--|
| PPER         | Elementos de Respuesta del Proliferador de Peroxisoma                      |
| PVDF         | Di- fluoruro depolivinilideno  |
| RER          | Retículo Endoplásmico Rugoso   |
| RNA          | Ácido Ribonucleico   |
| mRNA         | Acido Ribonucleico mensajero   |
| RT-qPCR      | Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa |
| RXR          | Receptor del ácido 9-cis retinoico   |
| s.c.         | Subcutáneo   |
| SS           | Solución salina  |
| TTBS         | Solución salina amortiguada con Tris-Tween 20                              |
| TGF- $\beta$ | Factor de Crecimiento Transformante $\beta$                                |
| UI           | Unidad Internacional   |
| $\mu$ L      | microlitro   |
| $\mu$ g      | microgramo   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|           |   |
|-----------|---|
| Figura 1  | Localización anatómica  |
| Figura 2  | Esquema de las cavidades cardíacas  |
| Figura 3  | Esquema de las arterias coronarias  |
| Figura 4  | Válvulas cardíacas  |
| Figura 5  | Micrografía de corte transversal de corazón de rata teñido con tricrómica de Masson             |
| Figura 6  | Representación de un electrocardiograma   |
| Figura 7  | Esquema que ejemplifica una oclusión de arteria coronaria                                       |
| Figura 8  | Esquema que representa las principales fases de daño cardíaco y remodelación después de un IAM. |
| Figura 9  | Esquema que representa la síntesis de colágena  |
| Figura 10 | Estructura de PPAR y sus procesos de transactivación y transrepresión                           |
| Figura 11 | Cambios in vivo de la frecuencia cardíaca y presión arterial inducido por Isoproterenol         |
| Figura 12 | Cambios secuenciales electrofisiológicos durante el infarto inducido por Isoproterenol          |
| Figura 13 | Mecanismo de acción de Isoproterenol  |
| Figura 14 | Evaluación de RNAm de $\alpha$ -actina y ANF, marcadores de hipertrofia cardíaca                |
| Figura 15 | Corazón control vs corazón knockout y cortes histológicos de corazón                            |
| Figura 16 | Modelo de Isoproterenol para evaluar la remodelación cardíaca                                   |
| Figura 17 | Esquema representativo para el análisis de las zonas de infarto                                 |
| Figura 18 | Modelo de Isoproterenol para evaluar la actividad enzimática en la etapa de infarto             |
| Figura 19 | Tejido cardíaco de rata fijado en paraformaldehído teñido con tricrómica de Masson.             |
| Figura 20 | Esquema y micrografías de un corazón control  |
| Figura 21 | Esquema y micrografías de un corazón tratado con ISO+4SS  |
| Figura 22 | Esquema y micrografías de un corazón tratado con ISO+4IFC                                       |
| Figura 23 | Esquema y micrografías de un corazón tratado con 4IFC.  |
| Figura 24 | El compuesto IFC-305 reduce un 50% el área de infarto provocado por Isoproterenol               |
| Figura 25 | Cortes transversales de un corazón  |
| Figura 26 | Mecanismo por el cual PPAR- $\gamma$ regula la expresión de Colágena I                          |

## ÍNDICE DE GRAFICAS

|           |  |
|-----------|--|
| Gráfica 1 | Evaluación de la actividad enzimática de LDH y CK-MB a las 12h |
| Gráfica 2 | Niveles de RNAm y proteína de colágena I                       |
| Gráfica 3 | Análisis de expresión de <i>Col1a1</i> mediante RT-q PCR       |
| Gráfica 4 | Análisis de expresión de <i>Pparg</i> mediante RT-q PCR        |
| Gráfica 5 | Relación peso corazón/peso corporal de los ratones             |
| Gráfica 6 | Evaluación de la actividad enzimática de CK-MB a las 12h       |
| Gráfica 7 | Evaluación de la actividad enzimática de LDH a las 12 h        |
| Gráfica 8 | Evaluación de la proteína colágena I por Western Blot          |
| Gráfica 9 | Evaluación de la proteína PPAR- $\gamma$ por Western Blot      |

## ÍNDICE DE TABLAS

|         |   |
|---------|---|
| Tabla 1 | Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de expresión de proteínas                      |
| Tabla 2 | Anticuerpos secundarios utilizados para la determinación de expresión de proteínas                    |
| Tabla 3 | Características macroscópicas de los corazones de cada condición en la etapa de remodelación cardiaca |

## RESUMEN.

El infarto agudo al miocardio (IAM) es una de las principales causas de muerte en el país, ocasionado principalmente por una oclusión en las arterias coronarias y una falta de irrigación sanguínea del corazón, provocando una alteración primordialmente en la zona apical del ventrículo izquierdo. Para estudiar esta patología el grupo de la Doctora Chagoya caracterizó un modelo de infarto inducido con Isoproterenol (Iso) que es un análogo de la epinefrina. En dicho modelo se provoca una isquemia funcional y con ello muerte celular, acompañada de eventos fisiológicos, bioquímicos e histológicos. Esta investigación dividió a la patología en preinfarto de cero a 12 h después de la administración de Iso, infarto de 12-24 h, y postinfarto de 24-96 h. Estudios previos en el laboratorio demostraron que en la etapa de postinfarto se observa un aumento tanto en el transcrito como en la proteína de colágena I, que es la principal proteína profibrogénica, además se evaluó el efecto de un derivado de adenosina (IFC-305) sobre la expresión del gen *Col1a1*, así como de su correpresor *Pparg*, observándose que recuperan los niveles normales. Por lo anterior decidimos investigar el efecto del IFC-305 sobre estas proteínas, ya que están involucradas en la etapa de remodelación cardiaca. Las ratas Wistar fueron tratadas con Isoproterenol vía subcutánea entre las 8 y 9 h del día, para inducir infarto, una hora después se les administró IFC-305 vía intraperitoneal. Para validar el modelo se midió la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) y creatincinasa fracción MB (CK-MB) obteniendo suero las 12 h posterior a la administración con Iso (etapa de infarto). También se hicieron estudios histopatológicos de cortes transversales de corazones de rata en la etapa de remodelación cardiaca teñidas con tricrómica de Masson. Para evaluar los niveles de proteínas, después del infarto, a las ratas se les trató con IFC-305 subsecuentemente cada 24 h durante 4 días, posteriormente se recuperó el corazón y se preservó zona apical del ventrículo izquierdo del cual se extrajeron proteínas para realizar Western Blot. El modelo experimental analizado a lo largo del trabajo fueron ratas a las cuáles se les indujo el infarto con Iso y ratas infartadas tratadas con el compuesto IFC-305. Se encontró que la actividad de LDH aumentó, además de que histopatológicamente los cortes presentan fibrosis y una disminución del 50% del área infartada tras ser tratadas con IFC-305. Por otro lado se encontró que el IFC-305 disminuye los niveles de colágena I, observándose una relación inversa con de la proteína PPAR- $\gamma$ , lo que nos permite proponer que el IFC-305 posee propiedades cardioprotectoras y antifibróticas en el corazón.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA.

El corazón late unas 100,000 veces por día, lo que suma 35 millones de latidos por un año y 2500 millones de veces en toda la vida. El lado izquierdo del corazón bombea sangre hacia unos 120,000 km de vasos sanguíneos, que es el equivalente a viajar 3 veces alrededor del mundo (Tortora, 2015).

Además de ser el principal órgano del sistema cardiovascular, el corazón mide alrededor de 12 cm de largo, 9 cm en su punto más ancho y 6 cm de espesor, este se apoya en el diafragma cerca de la línea media de la cavidad torácica y se encuentra en el mediastino (Figura 1), una masa de tejido que se extiende desde el esternón hasta la columna vertebral (Silverthom, 2009).

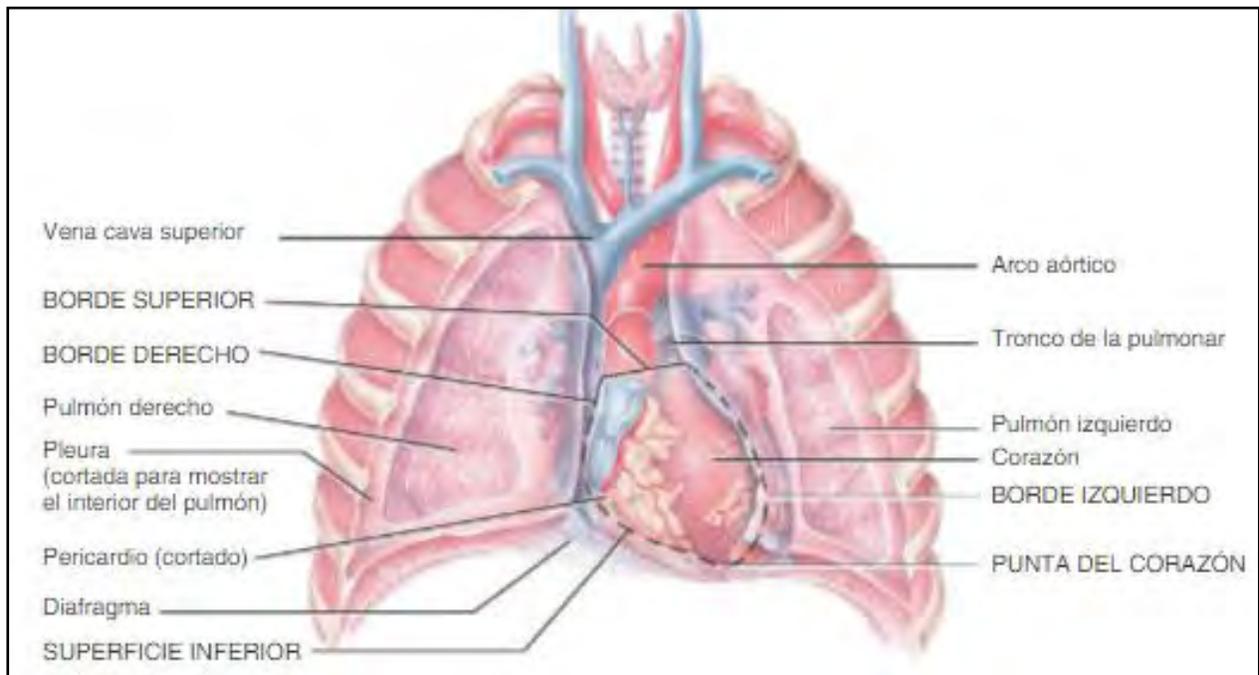


Figura 1. **Localización anatómica.** El corazón se encuentra en el mediastino, con las dos terceras partes de su masa a la izquierda de la línea media (Tortora, 2015).

## 1.2 MORFOLOGÍA.

### 1.2.1 Cámaras cardiacas y vascularización.

El corazón posee cuatro cámaras. Las cámaras superiores son las aurículas (atrios) y los dos inferiores ventrículos (Silverthom, 2009).

La aurícula derecha (atrio derecho) recibe sangre de tres venas: la vena cava superior, la vena cava inferior y el seno coronario. La aurícula izquierda forma la mayor parte del corazón, recibe sangre proveniente de los pulmones por medio de cuatro venas pulmonares (Figura 2)(Tortora, 2015). Las aurículas se hallan divididas por un tabique interauricular; así mismo el tabique que separa ambos ventrículos se denomina interventricular (Silverthom, 2009).

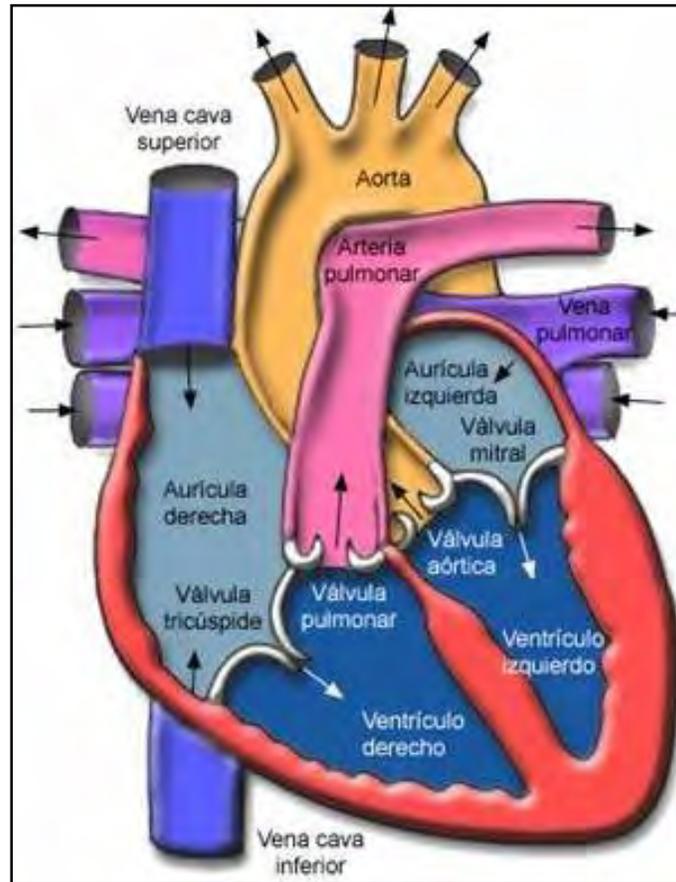


Figura 2. **Esquema de las cámaras cardíacas.** El corazón posee cuatro cámaras, dos aurículas y dos ventrículos, la aurícula y ventrículo derecho están divididos por una válvula denominada tricúspide, la aurícula y ventrículo izquierdo están divididos por la válvula mitral (Devlin, 2000).

El corazón posee arterias que se sitúan alrededor de él, denominadas arterias coronarias que son las encargadas de llevar sangre oxigenada al corazón, también posee venas coronarias que tienen la función contraria (Gerhard Thews, 1983). El corazón posee 2 principales arterias que lo rodean una en posición izquierda y otra a la derecha (Figura 3) (Silverthom, 2009).

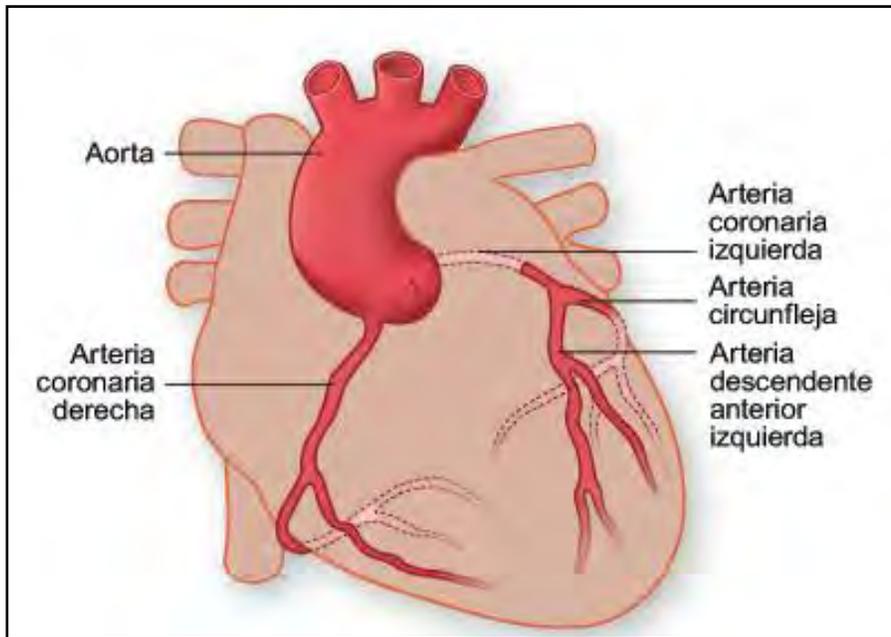


Figura 3. **Esquema de las arterias coronarias.** Las arterias coronarias que inervan el corazón, provienen de la arteria aorta de las cuales salen dos arterias tanto del lado izquierdo como del derecho (Gerhard Thews, 1983).

### 1.2.2 Las válvulas cardiacas

Las válvulas situadas en los orificios que comunican las aurículas con los ventrículos son la tricúspide y la mitral. La válvula mitral es la que divide la aurícula del ventrículo izquierdo y la válvula tricúspide es la que divide la aurícula del ventrículo derecho (Tortora, 2015).

Estas válvulas constan de un anillo que las sujeta al orificio situado entre la aurícula y el ventrículo, desde el anillo salen unas finas prolongaciones denominadas cuerdas tendinosas que se insertan en la musculatura del ventrículo. Estas cuerdas tienen la función de regular el cierre y abertura de las válvulas para permitir el paso de la sangre hacia los ventrículos, dichas cuerdas pueden tensarse o relajarse gracias a que están embebidas en los músculos papilares (Figura 4)(Gerhard Thews, 1983). El ventrículo izquierdo tiene la pared más gruesa de las cuatro cámaras y forma el vértice o ápex del corazón (Tortora, 2015).

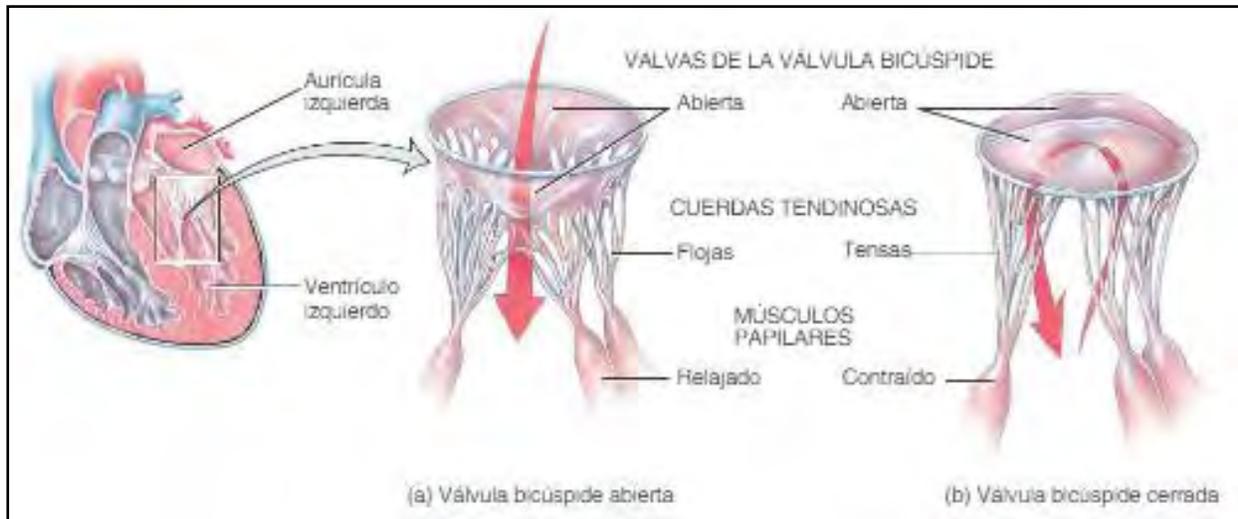


Figura 4. **Válvulas cardiacas.** Las válvulas tienen la función de regular el flujo de sangre, para que haya una regulación de apertura y cierre, para ello existen unas estructuras denominadas cuerdas tendinosas que a su vez están reguladas por músculos papilares (Tortora, 2015).

### 1.2.3 Capas de la pared cardiaca.

El corazón se encuentra dentro de una bolsa denominada pericardio. La bolsa pericardica tiene dos hojas: una interna sobre la superficie cardiaca y otra externa que está fijada a los grandes vasos que salen del corazón. La pared cardiaca se divide en tres capas: el epicardio (capa externa), el miocardio (capa media) y el endocardio (capa interna) (Figura 5). El epicardio está compuesto por dos planos tisulares el más externo es una lámina delgada formada por mesotelio, que es la membrana que forma el recubrimiento de todas las cavidades corporales (epitelio de recubrimiento del corazón) (Figura 5) (Tortora, 2015).

El miocardio es un tejido muscular, confiere volumen al corazón y es responsable de la contracción. Representa el 95% de la pared cardiaca, las fibras musculares al igual que las del músculo estriado esquelético, están envueltas y rodeadas por tejido conectivo (Figura 5) (Tortora, 2015).

La capa más interna (el endocardio) es una capa fina de endotelio que se encuentra sobre una capa delgada de tejido conectivo, formando una pared lisa que tapiza las cámaras y las válvulas cardiacas (Figura 5). El endotelio minimiza la superficie de fricción cuando la sangre pasa por el corazón (Tortora, 2015).

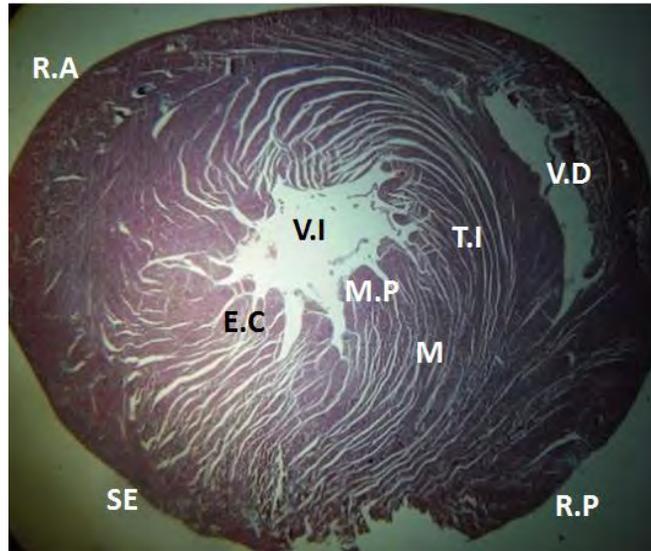


Figura 5. **Micrografía de corte transversal de corazón de rata teñido con tricrómica de Masson:** R.A; Región anterior, R.P; Región posterior, V.I; Ventrículo Izquierdo, V.D; Ventrículo Derecho, SE; Subepicardio, M; Miocardio; E.C; Endocardio, M.P; Músculo Papilar, T.I; Tabique Interventricular (Resultado sin publicar).

### 1.3 HISTOLOGÍA DEL CORAZÓN.

El miocardio consta de dos compartimientos histológicos diferentes(Tortora, 2015):

- a) Compartimiento miocítico muscular: El miocito es una fibra muscular fusiforme, y multinucleada con capacidad contráctil y de la cual está compuesto el tejido muscular, cada fibra consta de membrana o sarcolema, aparato contráctil o miofibrillas, sistema T o túbulos transversales, sistema tubular del retículo sarcoplasmático, un número elevado de mitocondrias y núcleo(Suárez, 1998). La unidad contráctil o sarcómero está entre dos bandas Z. El aparato contráctil de una célula consta aproximadamente 300 a 700 miofibrillas las cuales están ordenadas paralelamente al eje longitudinal de las fibras musculares. Cada una de ellas a su vez está formada por los miofilamentos de actina y miosina. Todos estos elementos le confieren la estriación característica (Suárez, 1998).
- b) Compartimiento intersticial no miocítico: Está compuesto por una variedad de componentes que integran el tejido conjuntivo, tales como fibroblastos, fibras de colágena y sustancias fundamentalmente constituidas por mucopolisacáridos (Suárez, 1998).

#### 1.4 INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.

El infarto agudo al miocardio consiste en una necrosis isquémica (necrosis coagulativa) producida por una insuficiencia grave del flujo coronario que genera una serie de complicaciones fisiológicas (presión arterial baja y frecuencia cardiaca alta que resultan en una hipoxia prolongada), bioquímicas (función mitocondrial disminuida, elevación específica de enzimas marcadoras de daño miocárdico) e histológicas (necrosis coagulativa, presencia de fibroblastos y formación de fibras de colágena,) que pueden ser estudiadas de manera integrativa para poder entender mejor esta patología (Chagoya de Sanchez et al., 1997).

Desde el punto de vista clínico, el infarto agudo al miocardio reúne todos los requisitos para ser considerado una verdadera urgencia médica. Las manifestaciones del infarto aparecen de manera súbita, y el riesgo de muerte o complicaciones graves a corto plazo es elevado. Además la eficacia del tratamiento va a depender, en gran medida del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta su tratamiento. Una técnica muy utilizada en la clínica es el electrocardiograma (ECG), la cual consiste en un registro de la actividad eléctrica del corazón que se produce en cada latido cardiaco, cuando ocurre un infarto ocurre una elevación del segmento ST que es un indicativo de disfunción contráctil y aneurisma ventricular, que permite evaluar la viabilidad miocárdica (Figura 6). Esta alteración representa la lesión isquémica aguda que aparece inmediatamente en el músculo cardiaco tras la interrupción de irrigación sanguínea, esta elevación suele mantenerse durante varias horas o hasta conseguir la recanalización eficaz de la arteria coronaria ocluida (Santaló Bel Miguel, 2003).

La clasificación clínica de los diferentes tipos del infarto al miocardio es la siguiente (Thygesen K, 2007):

- Tipo I: Infarto al miocardio espontáneo relacionado a isquemia, debido a un evento coronario primario tal como erosión de una placa y/o rotura, fisura o disección.
- Tipo II: Infarto al miocardio secundario a isquemia debido a un incremento del consumo de oxígeno o disminución del aporte, por ejemplo espasmo coronario, embolismo coronario, anemia, arritmias, hipotensión e hipertensión.
- Tipo III: Muerte súbita cardiaca inesperada, incluyendo paro cardiaco menudo con síntomas sugestivos de isquemia miocárdica, acompañado de elevación del segmento ST debido a una oclusión por trombo fresco en una arteria coronaria documentada por autopsia.
- Tipo IVa: Infarto al miocardio asociado a angioplastia coronaria.
- Tipo IVb: Infarto al miocardio asociado a trombosis del *stent* documentado por angiografía coronaria

- Tipo V: Infarto al miocardio asociado a cirugía de revascularización coronaria.



Figura 6. **Representación de electrocardiograma.** Este esquema hace referencia a los principales parámetros del ECG, en donde P es la activación auricular y QRST representa la activación ventricular (Hamm, 2007).

#### 1.4.1 Prevalencia

Las enfermedades cardiovasculares han incrementado progresivamente su presencia en el mundo, de tal modo que ha llegado a ser la primera causa de mortalidad entre los países de altos ingresos y los de medianos y bajos ingresos, según se desprende de los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Martínez, Ríos, 2014).

México sufre también los cambios epidemiológicos actuales; las enfermedades cardiovasculares son, en su conjunto, la primera causa de muerte en nuestro país. De ellas la cardiopatía isquémica ocupa un lugar preponderante, y su prevalencia se extiende a todas las regiones y estratos sociales de la población (Martínez Ríos, 2014).

### 1.4.2 Causas del infarto agudo al miocardio.

La arteriosclerosis avanzada en las arterias coronarias, es la causa principal por la cual se induce un infarto agudo al miocardio.

El músculo cardíaco necesita constantemente de un abundante suministro de sangre rica en oxígeno para llevar a cabo la tarea del bombeo de sangre, suministro que le llega a través de las arterias coronarias. Cuando se erosiona o se rompe una placa de ateroma en la pared de una arteria coronaria, rápidamente se forma sobre ella un trombo o coagulo que puede llegar a obstruir de forma completa y brusca la luz de la arteria interrumpiendo el flujo sanguíneo y dejando una parte del músculo cardíaco sin irrigación. Si el músculo cardíaco carece de oxígeno y nutrientes durante demasiado tiempo, normalmente más de 20 minutos, el tejido de esa zona muere, desarrollándose así un infarto agudo al miocardio (Santaló Bel Miguel, 2003; Spadaro, 2009).

La formación del trombo que ocluye la luz de las arterias coronarias suele ser independiente del grado de obstrucción que la placa de ateroma haya provocado previamente en dicha luz. Esto explica por qué muchos pacientes no presentan síntomas antes de sufrir de forma aguda o inesperada un ataque al corazón. Las placas de ateroma que no obstruyen de manera significativa la luz coronaria pueden pasar durante años inadvertidas y la enfermedad aterosclerótica puede pasar desapercibida, hasta el momento brusco de la rotura de la placa y la oclusión completa del vaso, con la subsecuente aparición del infarto agudo de miocardio (Figura 7) (Tortora, 2015)(Cotrán,2012).

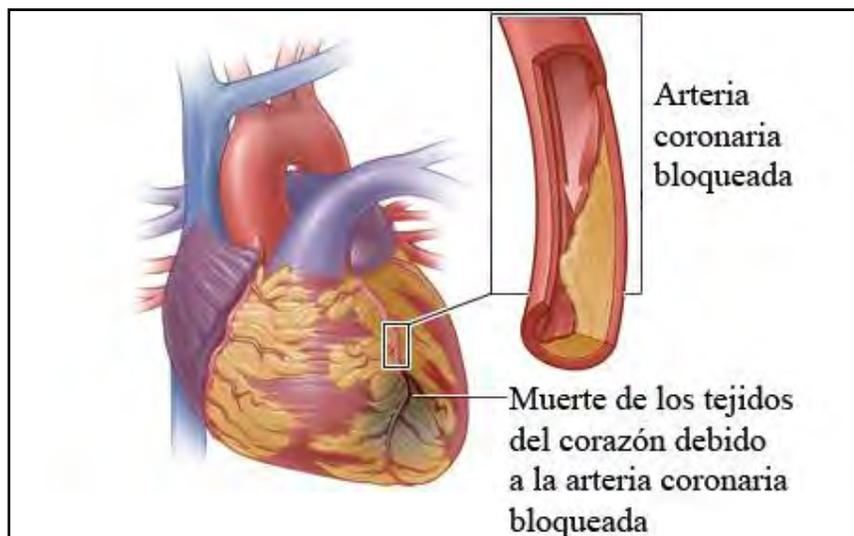


Figura 7. **Esquema en dónde se representa una oclusión de arteria coronaria:** La principal causa de un infarto agudo al miocardio es la arterioesclerosis (Fuster, 1997).

Además de la arteriosclerosis y la trombosis de las arterias coronarias, otras causas de infarto agudo al miocardio son extremadamente raras. También se han descrito casos de oclusión aguda de las arterias coronarias por inflamación de la pared coronaria.

### **1.4.3 Formas de diagnóstico en la clínica.**

Existen una serie de pruebas que sirven de herramientas cuando se requiere diagnosticar un infarto agudo de miocardio.

Otra prueba sumamente importante es la evaluación del incremento de la actividad de enzimas marcadoras de daño miocárdico, estas enzimas pueden ser: creatincinasa fracción MB (CK-MB) y Lactato Deshidrogenasa (LDH). Ambas son enzimas que se liberan al torrente sanguíneo, tras la rotura de la membrana plasmática de las células miocárdicas muertas (necrosis), se utilizan como confirmación diagnóstica definitiva (Yáñez- Maldonado, 2009).

La creatincinasa isoforma CK-MB es una isoenzima cardiaca compuesta por dos subunidades, la subunidad M expresada en el músculo y la subunidad B expresada en células nerviosas, esta enzima se encuentra tanto en el núcleo como en la mitocondria, cataliza la formación de ATP así como la fosforilación reversible de creatina, con el ATP como grupo donador de fosfato. Esta enzima se encuentra en concentraciones bajas, se incrementa como consecuencia de infarto de miocardio y después desciende a niveles normales (Pesce, 1984).

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima oxidorreductasa cuya actividad es necesaria para la reacción reversible mediante la cual se efectúa la interconversión de piruvato y lactato, específicamente es importante en la vía de la glucólisis. Por lo tanto, esta reacción in vivo desempeña un papel importante en los tejidos que utilizan glucosa. El nivel de LDH en suero está elevado en pacientes con enfermedades del hígado, infartos de miocardio, alteraciones renales, distrofias musculares y anemias, por lo que la hace un marcador de diagnóstico inespecífico (Burtis A et al, 1999).

## **1.5 REMODELACIÓN CARDIACA.**

El proceso de remodelación se caracteriza por un aumento en la cavidad ventricular, se ha estudiado en humanos principalmente en los casos de infarto al miocardio y en muchos modelos animales por la oclusión de la arteria coronaria, en las que se ha encontrado un incremento en el volumen y masa del ventrículo (Martínez-Pérez, 2004).

Después del comienzo del infarto al miocardio, el ventrículo izquierdo sufre continuos cambios a nivel molecular y celular que resultan en un adelgazamiento de la pared, dilatación y disfunción.

La remodelación ventricular desempeña un papel fundamental en la fisiopatología de la disfunción del ventrículo. Al reaccionar a la agresión, las alteraciones genéticas, estructurales y bioquímicas de ese proceso resultarán en un deterioro de la capacidad funcional del corazón y como consecuencia una aparición de las señales de insuficiencia cardíaca. La remodelación, por lo tanto, está asociada a un pronóstico desalentador, por lo que el entendimiento de este proceso es crítico, pues la evolución de la remodelación se puede cambiar por medio de diversas intervenciones terapéuticas (Spadaro, 2009).

Simultáneamente a la necrosis de las células cardíacas, hay la desintegración del colágena interfibrilar. La pérdida de ese tejido de sustentación convierte a la región en más propensa a la distensión y consecuentemente más susceptible a deformaciones, se observa que en corazones infartados, consecuentemente a la expansión, el ventrículo pierde su forma elíptica normal, asumiendo una configuración esférica (Spadaro, 2009).

### **1.5.1 Consecuencias de la remodelación.**

Los miocitos representan sólo el 30% del número total de células miocárdicas, hay una compleja y organizada red de colágena que circunda e interconecta todas esas estructuras. Las fibras de colágena encontradas en el intersticio son predominantemente de los tipos I y III (el 95% del colágena total). Las principales funciones de esa red son: regular la apoptosis; resistir a deformaciones patológicas, mantener el alineamiento de las estructuras, además de proveer soporte y elasticidad al órgano. La colágena, por lo tanto, es un importante modulador tanto de la función cardíaca sistólica como diastólica (Weber, 1989)(Jack P.M. Cleujens; Monique J.A. Verluyten, 1995).

Con relación a los aspectos funcionales, debemos tomar en consideración que tras un IAM, en consecuencia de la pérdida de tejido muscular, es común el descenso del volumen, con aumento del volumen sistólico final y diastólico final del ventrículo izquierdo (Spadaro, 2009).

Sin embargo, el proceso de remodelación ventricular desempeña un papel fundamental en la fisiopatología funcional, que resultarán en el deterioro de la capacidad funcional del corazón a largo plazo, y el consecuente apareamiento de las señales de insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita (Spadaro, 2009).

### **1.5.2 Cambios a nivel molecular.**

Después de que ocurre el infarto al miocardio, se presenta una reparación en el área afectada (mayoritariamente en la zona apical del ventrículo izquierdo), en donde se lleva a cabo la deposición de colágena principalmente la de tipo I. Una gran cantidad de citocinas y factores de crecimiento que son sintetizados por macrófagos, estimulan la producción de colágena. Esta molécula es sintetizada principalmente por fibroblastos que se diferencian en miofibroblastos los cuáles tienen la función de preservar la integridad del ventrículo, previniendo la ruptura del tejido (Yutaka Matsui, 2010)(Martínez-Pérez, 2004).

En general el proceso del daño cardiaco después del infarto se divide en cuatro fases: (1) muerte de cardiomiocitos, (2) fase inflamatoria que se define por la migración de linfocitos y monocitos en el área necrótica para remover células cardiacas muertas, (3) formación de tejido de granulación que se caracteriza por la presencia de fibroblastos, macrófagos, miofibroblastos, neoformación de vasos sanguíneos y proteínas de matriz extracelular (MEC) (Figura 8). La interacción de la MEC con receptores de superficie celular que regulan la proliferación, señalización celular y diferenciación que son muy importantes para la función normal del tejido, esta matriz se compone de proteínas estructurales tales como colágena, elastina, fibronectina y proteoglicanos entre otras (Yutaka Matsui, 2010).

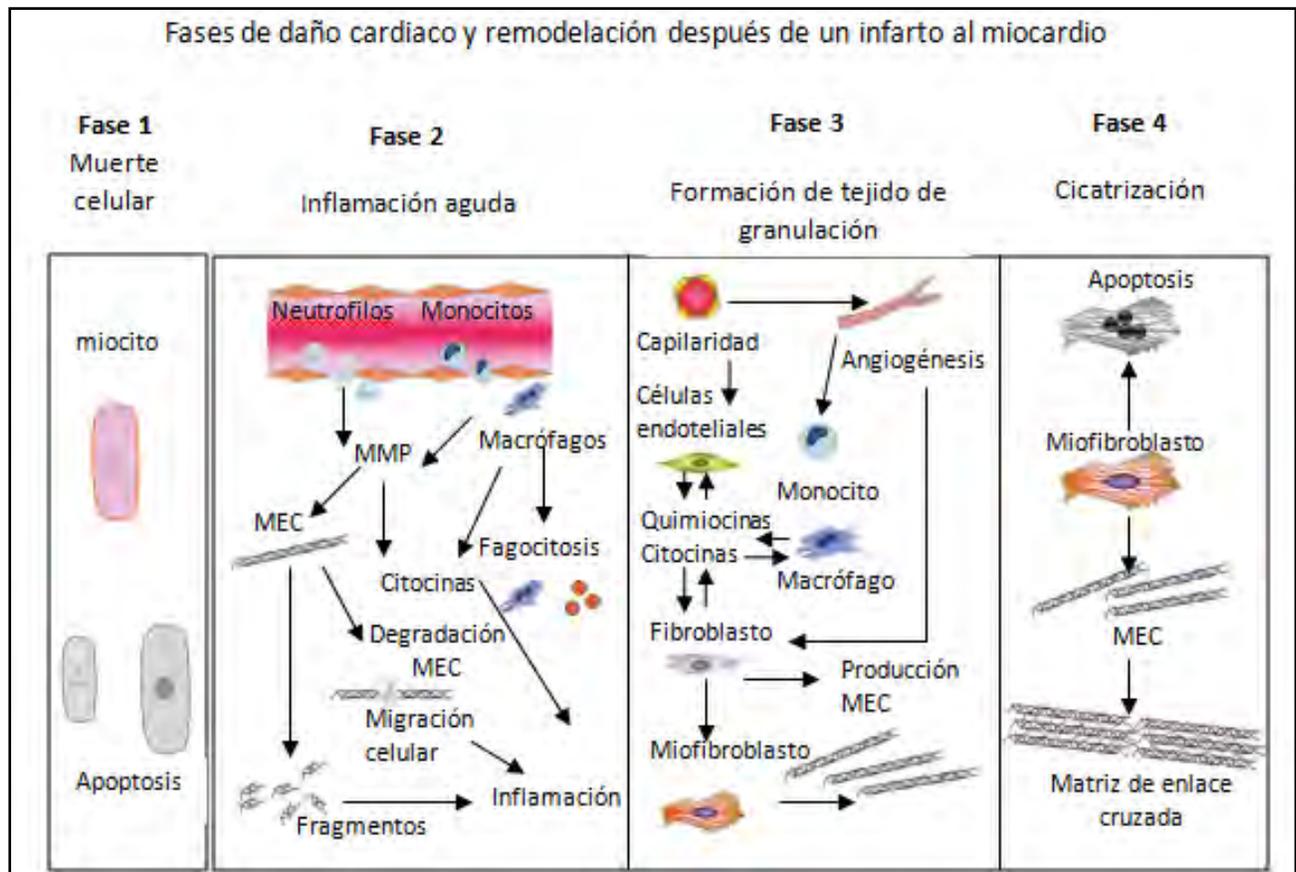


Figura 8. Esquema que representa las principales fases de daño cardíaco y remodelación después de un IAM. Traducido de (Yutaka Matsui, 2010).

Los miofibroblastos son una fuente de proteínas de la MEC que como ya se sabe forman una capa de colágena denominada fibrosis, manteniendo la integridad del tejido dañado y reparando la zona. Los fibroblastos cardíacos estimulan TGF- $\beta$ 1 que incrementa la expresión de marcadores de miofibroblastos tales como  $\alpha$ -actina de músculo liso y dominio extra de fibronectina A (Ding et al., 2007). Por lo tanto la MEC juega un papel importante en el mantenimiento de la organización y soporte del corazón así como en la remodelación después de un daño cardíaco.

## **1.6 PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA REMODELACIÓN CARDIACA.**

### **1.6.1 Colágena.**

Los fibroblastos son, el tejido celular más abundante, siendo los principales productores de colágena (Jack P.M. Cleujens; Monique J.A. Verluyten, 1995)

El principal componente de la MEC es la colágena de tipo fibrilar I, está compuesta por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$ , los genes que codifican para estas cadenas se encuentran en el cromosoma 17, forma el 85% de las fibras gruesas que confieren fuerza tensil a la elongación y deformación, por lo que la principal función es de soporte, permitiendo distribuir las fuerzas en la pared del ventrículo, conservando su forma y grosor, manteniendo la rigidez del miocardio, por tal motivo en este trabajo nos enfocaremos en el estudio de este tipo de colágena (Kehat, 2016).

La cadena de colágena termina de sintetizarse en el retículo endoplásmico rugoso (RER) donde se requiere de un evento postraducciona, el extremo amino terminal contiene una cadena señal que facilita la transferencia de la cadena hacia el lumen del RER y probablemente es eliminado por una endonucleasa, después de haber orientado la cadena hacia el interior del RER (Ritzenthaler, 1991).

Se ha visto que después de un infarto al miocardio, se da una respuesta inflamatoria en dónde además de remover los cardiomiocitos muertos, también se induce la degradación de colágena por medio de las metaloproteasas, esta degradación causa un desplazamiento del tejido y por lo tanto una deformación del corazón.

Síntesis de colágena.

Una vez que ha sido sintetizada, la proteína colágena presenta una serie de modificaciones postraduccionales antes de llegar a su estructura definitiva. A continuación, los ribosomas se encargan de ensamblar los aminoácidos para formar las cadenas polipeptídicas. Estas cadenas, precursoras de las cadenas alfa (cadenas proalfa), llevan en sus extremos secuencias suplementarias de aminoácidos. Las cadenas proalfa van a sufrir una hidroxilación en el retículo endoplásmico, mediante la cual los grupos peptidilprolina se transforman en hidroxiprolina, además los grupos peptidil-lisina se convierten en hidroxilisina (Figura 9) (Guzmán, 1981).

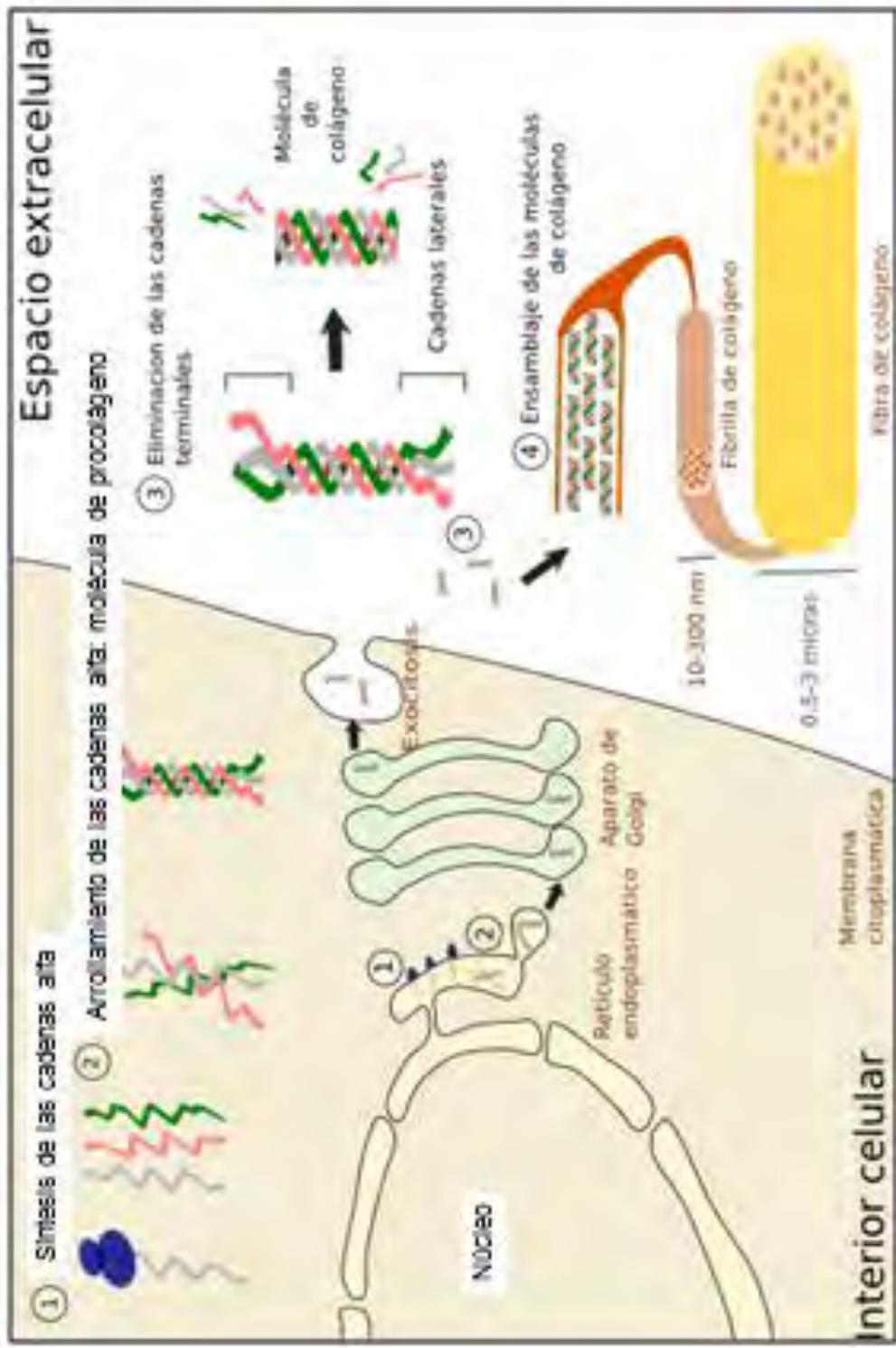


Figura 9. Esquema en dónde se representa la síntesis de colágena Modificado de (Devlin, 2000)

Posteriormente en los grupos hidroxilisina moléculas de galactosa y glucosa, mientras que en los grupos terminales de las cadenas, se fijan otros azúcares. Por último, se crean puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, llegando así a la formación de la molécula de procolágena. La molécula de procolágena transita por las vesículas de Golgi y pasa al medio extracelular, en el cual, bajo la acción de proteasas, sufre una escisión de los grupos N-terminal y C-terminal, después de esta escisión las moléculas de colágena se constituyen en fibras (Figura 9) (Guzmán, 1981).

Se piensa que los grupos terminales desempeñan un papel importante en la formación de la triple hélice, lo más probable es que intervengan para evitar que la formación de fibras de colágena se realice antes de la secreción de la proteína. Se ha visto que los enlaces transversales entre las cadenas polipeptídicas asegura la estabilidad de la molécula (Guzmán, 1981).

Así como se induce la síntesis de colágena mediante genes específicos, también hay mecanismos que la regulan negativamente, PPAR- $\gamma$  es un receptor que se ha visto que tiene un papel correpressor sobre la expresión de esta proteína.

### **1.6.2 Receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR).**

El principal papel de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR) es regular la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos (Wang-Soo Lee, 2015). La modificación de su actividad desencadena enfermedades como obesidad, diabetes y cáncer (Lee, 2015).

Los PPAR son factores de transcripción dependientes de ligando que forman una de las subfamilias de la superfamilia de los receptores nucleares hormonales. La subfamilia de los PPAR consta de tres subtipos, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta/\beta$  y PPAR $\gamma$ . PPAR- $\alpha$ , primer miembro de la familia identificado, se expresa en tejidos con una gran actividad metabólica: hígado, músculo, riñón y corazón. En todos estos tejidos, el PPAR- $\alpha$  se encuentra directamente implicado en el control de la expresión de genes que codifican proteínas y enzimas clave en el metabolismo energético, especialmente en el catabolismo de los ácidos grasos.

Por el contrario, PPAR- $\gamma$  se expresa fundamentalmente en el tejido adiposo, el gen está localizado en el cromosoma 3p25. Este subtipo controla la expresión de genes implicados en la diferenciación celular (especialmente de los adipocitos), así como en el control de la utilización metabólica de la glucosa, sin embargo se ha visto que también está implicado en la expresión de citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , también se sabe que la asociación de la hipertrofia cardiaca en respuesta a PPAR- $\gamma$  puede ser independiente en los cambios de la señalización miocárdica.

La estabilidad de la proteína y la actividad transcripcional son reguladas por modificaciones covalentes, incluyendo fosforilación, ubiquitinación, O-GlcNAcilacion y SUMOilación.

El PPAR- $\delta/\beta$  es el subtipo de PPAR sobre el que no se posee tanta información acerca de su función. Se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, especialmente en el músculo esquelético, la placenta, el intestino y el cerebro dónde es la isoforma PPAR predominante, se encontró esta isoforma en ratas con cardiomiopatía diabética y una reducción en la expresión durante hiperglicemia. Además tanto, PPAR- $\alpha$  como PPAR- $\gamma$  se expresan en células vasculares, incluyendo células endoteliales y células musculares lisas, así como en macrófagos. Igualmente se ha detectado la presencia de ambos subtipos en, aproximadamente, el 60% de las placas ateroscleróticas presentes en arterias coronarias y carótidas humanas (Carrera, 2002; Wang-Soo Lee, 2015)

Los PPAR son activados por un gran número de compuestos endógenos y sintéticos. Los ácidos grasos y sus derivados son ligandos del subtipo PPAR- $\alpha$ . El subtipo PPAR- $\gamma$  es activado por metabolitos del ácido araquidónico, así como por componentes formados por la oxidación de los ácidos grasos de las LDL. Las tiazolidindionas o glitazonas antidiabéticas son ligandos sintéticos de alta afinidad del subtipo PPAR- $\gamma$  (Wang-Soo Lee, 2015).

### **1.6.3 Mecanismo de acción de los PPAR.**

Una vez activados por sus ligandos, los PPAR necesitan formar un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) para actuar como factores de transcripción. Estos heterodímeros PPAR-RXR son capaces de reconocer secuencias específicas del DNA situadas en los promotores de los genes diana controlados por los PPAR y se denominan elementos de respuesta de los proliferadores peroxisómicos (Figura 10). Estos elementos están formados por una repetición directa imperfecta de la secuencia hexamérica AGGTCA, separada, en la mayoría de los casos, por un nucleótido. En ausencia del ligando, los heterodímeros PPAR-RXR forman complejos de alta afinidad con proteínas nucleares correpressoras, lo que impide la activación transcripcional al no poder acceder el heterodímero al promotor del gen diana (Figura 10). Sin embargo, la unión de un ligando al PPAR induce un cambio en su conformación estructural, permitiendo la disociación de las proteínas correpressoras y su posterior unión al elementos de respuesta de proliferadores peroxisómicos (PPRE). Además, una vez activado por el ligando, el heterodímero PPAR-RXR es capaz de unirse a proteínas coactivadoras que promueven el inicio de la transcripción (Figura 10) (Carrera, 2002).

Se sabe que PPAR- $\gamma$  regula negativamente la transcripción del gen Col1a1, ya que su promotor tiene un sitio de unión al factor de transcripción NF-1, el cual interacciona con la proteína p300 y estimula la transcripción del gen. PPAR- $\gamma$  funciona como un inhibidor competitivo de p300, desplazándolo al unirse a NF-1 e inhibiendo la transcripción del gen (Yavrom et al., 2005).

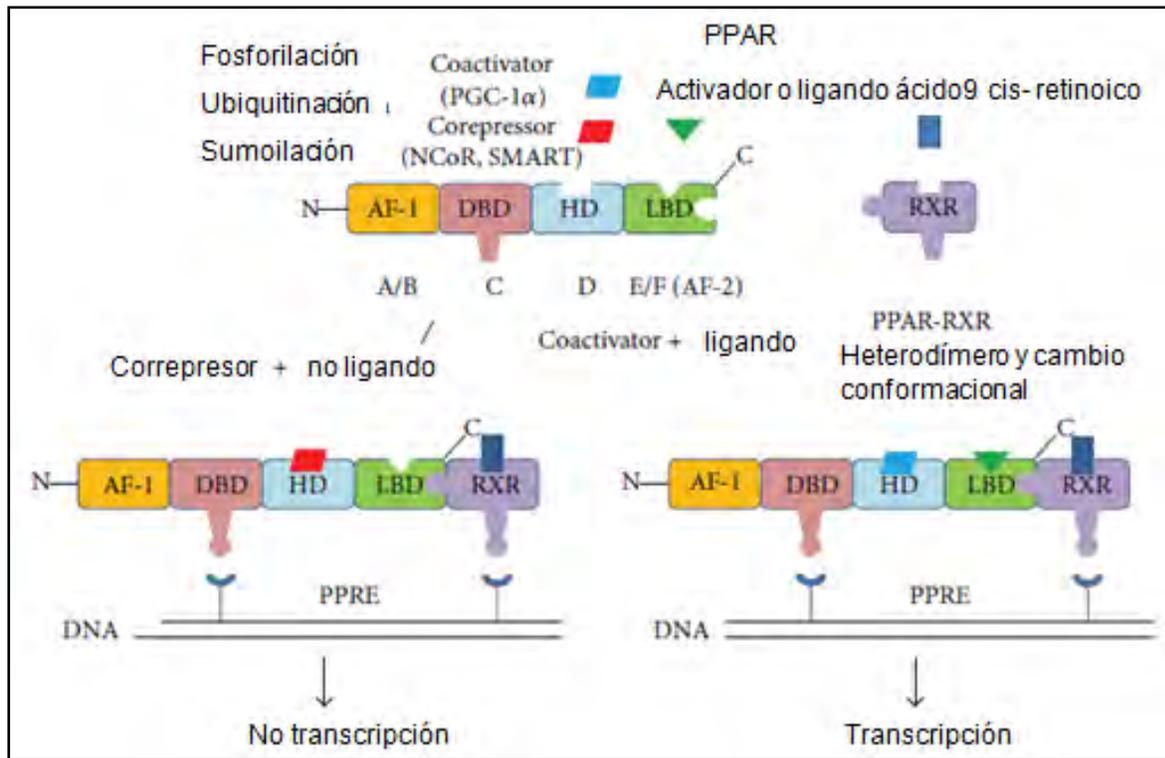


Figura 10. **Estructura de PPAR y sus procesos de transactivación y transrepresión.** En la ausencia de ligando, el heterodímero PPAR-RXR recluta correpresores (proceso del lado izquierdo). Cuando el ligando se une, los cambios conformacionales en PPAR-RXR induce disociación del complejo correpresor. El complejo transcripcionalmente activo se ensambla con proteínas coactivadoras (proceso de la derecha). PGC-1 $\alpha$ :Coactivador de PPAR- $\gamma$ , NcoR; Receptor nuclear correpresor, SMART; Mediador de silenciamiento del receptor para retinoide y de la hormona tiroidea, AF; Función de activación, DBD; dominio de unión a DNA, HD; dependiente de dominio, LBD; Dominio de unión a ligando, RXR; Receptor retinoide X, PPPE; Elemento de respuesta del proliferador de peroxisoma (Wang-Soo Lee, 2015).

Por otra parte, la actividad de PPAR también depende de la regulación transcripcional y postranscripcional a la que se encuentra sometida. Diferentes hormonas (glucocorticoides, insulina y leptina) y diferentes estímulos fisiológicos, regulan la expresión de PPAR- $\alpha$ . El control transcripcional de PPAR- $\gamma$  se lleva a cabo mediante el uso de diferentes promotores, formándose así dos proteínas diferentes PPAR- $\gamma$ 1 y PPAR- $\gamma$ 2 que presentan diferente actividad. Los procesos postranscripcionales de fosforilación también afectan a la actividad transactivadora de los PPAR, modulando así sus funciones biológicas (Wang-Soo Lee, 2015).

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS.

Las enfermedades cardiovasculares, principalmente el infarto agudo al miocardio (IAM) ocupa la primera causa de muerte en México y a nivel mundial. Actualmente no existe una terapia que permita que el paciente recupere la funcionalidad cardiaca posterior al infarto, por lo que la insuficiencia cardiaca crece llegando muchas veces a una muerte súbita (Martínez-Ríos, 2014). Teniendo esto como antecedente surge la necesidad de una terapia que permita revertir el proceso de remodelación cardiaca para que el paciente pueda recuperar la funcionalidad del corazón y que las muertes por esta complicación disminuyan.

Se sabe que la adenosina tiene efectos cardioprotectores, ya que tiene efectos anti-hipertróficos y anti-adrenérgicos en el contexto de la insuficiencia cardiaca. Además de los efectos anti-hipertróficos, la adenosina media efectos anti-fibroticos a través de receptores de adenosina  $A_{2B}$  in vitro (Epperson et al., 2009) e in vivo (Wakeno et al., 2006). Se ha observado previamente que la adenosina previene la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en corazón con falla cardiaca de humano y rata. También se identificó como autacoide ya que regula negativamente la MMP-9. La MMP-9 representa un marcador para la remodelación del ventrículo izquierdo, y degradación de redes de colágena fibrilar, subsecuente a daño miocárdico. Por lo tanto, estos antecedentes nos hablan de que la adenosina es capaz de mitigar las características por una maladaptación en la etapa de remodelación cardiaca (S-L Puhl and Devaux, 2015)

Una alternativa terapéutica para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca es el uso de un nuevo fármaco derivado de la adenosina, denominado IFC-305 (Patente UNAM 207422). Este compuesto tiene una vida media mucho más larga en comparación con la adenosina, hasta el momento no se han observado eventos adversos a la dosis y condiciones administradas.

Para evaluar el efecto del compuesto, se trabajó con un modelo experimental de infarto al miocardio inducido por Isoproterenol un análogo de la epinefrina, que actúa directamente sobre los receptores  $\beta$  adrenérgicos provocando una isquemia funcional y con ello muerte celular acompañado de una serie de eventos fisiológicos (presión sistólica y diastólica baja, frecuencia cardiaca alta), bioquímicos (función mitocondrial disminuida, elevación específica de enzimas marcadoras de daño miocárdico) e histológicos (necrosis coagulativa, formación de fibras de colágena, presencia de fibroblastos). A comparación de otros modelos como el de la ligación de arteria coronaria, el modelo de Iso tiene la ventaja de poder estudiar el infarto en 3 etapas: en preinfarto que va de cero a 12 h después de la administración de Isoproterenol, etapa de infarto que va de 12-24 h, y la etapa de postinfarto que se extiende de 24-96 h, ya que la dosis administrada permite la sobrevivencia de las ratas (Chagoya de Sanchez et al., 1997).

El modo en el que el Isoproterenol, desencadena el infarto es mediante una hipoxia funcional, ya que en los primeros minutos de administración, se presenta un incremento en la frecuencia cardiaca y una caída en la presión arterial, Chagoya y colaboradores evaluaron estos parámetros en los primeros minutos de la administración de Iso, encontrando estos parámetros modificados (Figura 11). Mientras que en la etapa de postinfarto evaluado a las 96 h, se observó que estos parámetros recuperaban los niveles normales (Figura 11) (Chagoya de Sánchez et al., 1997)

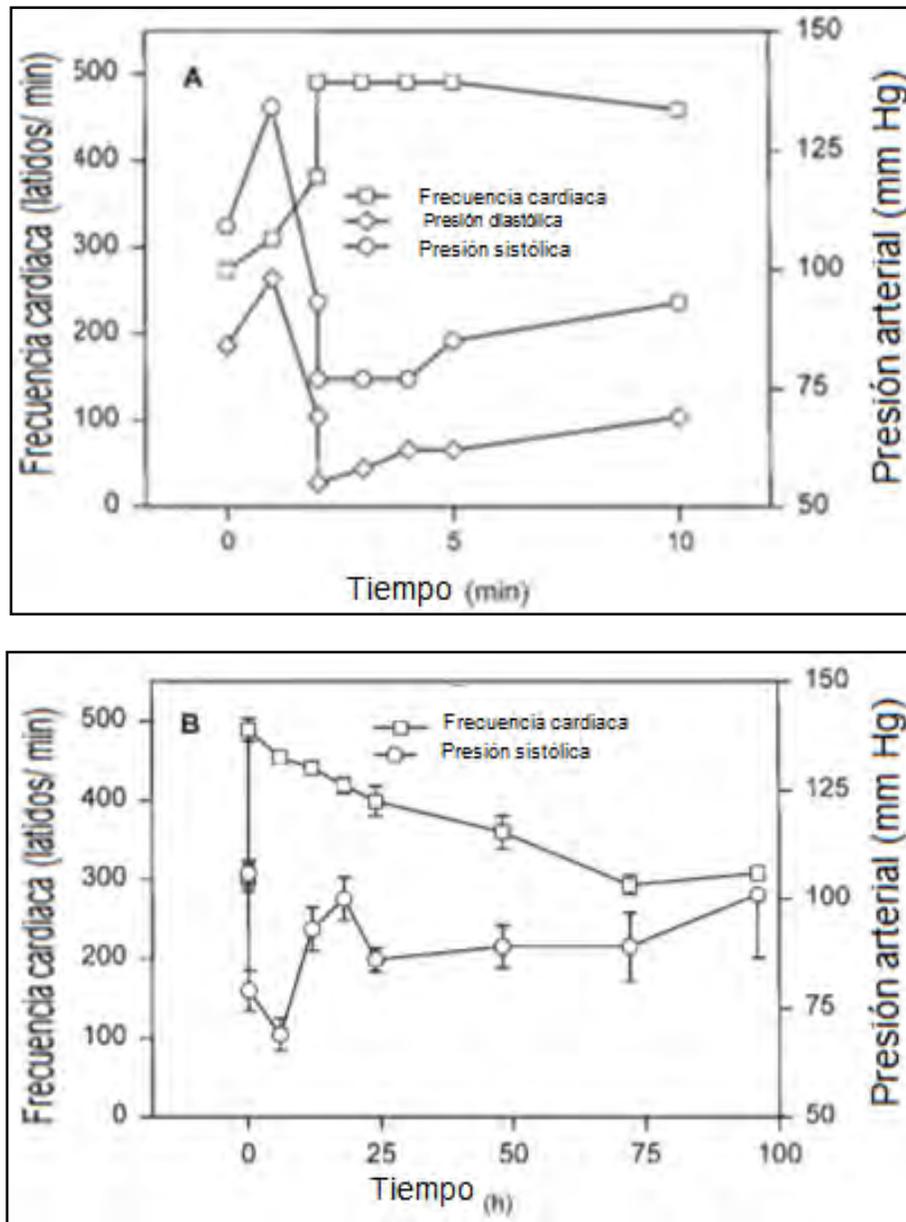


Figura 11. Cambios in vivo de la frecuencia cardiaca y presión arterial inducido por Isoproterenol

Figura 11. **Cambios in vivo de la frecuencia cardiaca y presión arterial inducido por Isoproterenol.** En la gráfica de la izquierda se observa que en los primeros minutos de administración de Iso, la frecuencia cardiaca aumenta y la presión arterial disminuye, mientras que en la gráfica de la derecha, a las 96 h (posinfarto) estos parámetros regresan a los niveles normales. Traducido de (Chagoya de Sánchez et al., 1997).

Otra manera de evaluarlo fue mediante estudios electrofisiológicos (ECG) en donde se observó que en la primera hora de administración de Iso se encontró la presencia de taquicardia, así como la elevación del segmento ST. Posteriormente al evaluarse en la etapa de postinfarto se encuentra que el seguimiento electrofisiológico regresó a niveles casi normales (Figura 12) (Chagoya de Sánchez et al., 1997).

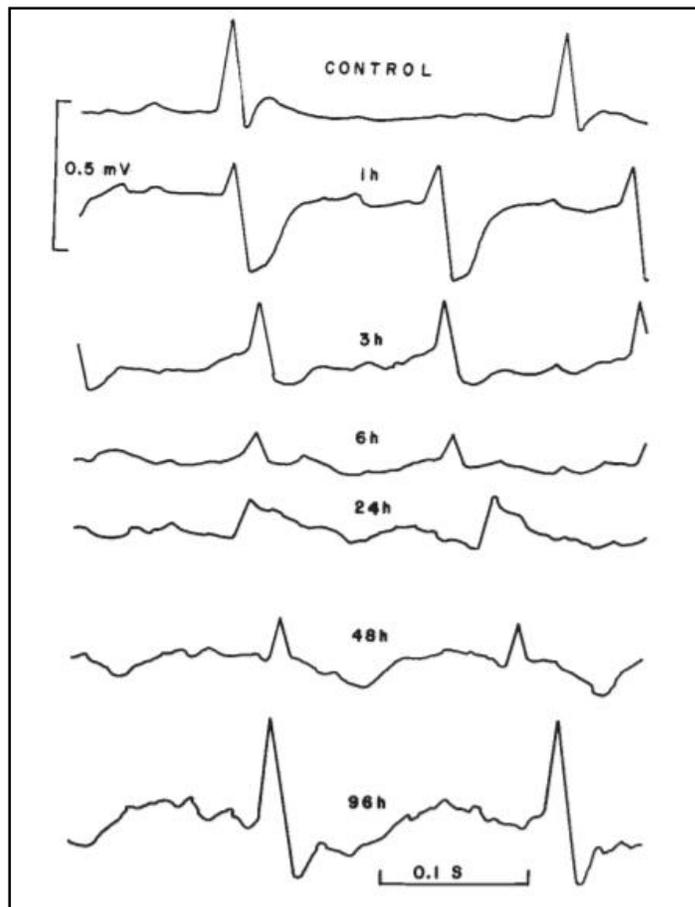


Figura 12. **Cambios secuenciales electrofisiológicos durante el infarto inducido por Isoproterenol.** A partir de 1h después de la administración, se observa la presencia de taquicardia y el aumento del segmento ST, mientras que en la etapa de remodelación cardiaca el seguimiento es casi normal. Tomado de (Chagoya y colaboradores et al., 1997).

También se llevó a cabo una evaluación histológica de cortes de corazón después del tratamiento con Isoproterenol, en donde se encuentra que en la etapa de infarto existe la presencia de necrosis coagulativa que indica daño cardíaco, por otro lado en la etapa de postinfarto se encuentra deposición de colágena además de fibroblastos, lo que indica la presencia de remodelación cardíaca (Chagoya de Sánchez et al., 1997)

Estos antecedentes nos llevaron a querer estudiar el efecto del compuesto IFC-305 en la etapa de remodelación cardíaca en un modelo experimental de infarto al miocardio inducido por Isoproterenol en ratas.

### **MECANISMO ACCIÓN DE ISOPROTERENOL.**

El isoproterenol (Iso) es una molécula análoga a la adrenalina lo que le da la propiedad de ser un potente agonista  $\beta$ -adrenérgico no selectivo, es decir estimula a los receptores  $\beta_2$  localizados en el músculo liso de la vía aérea, como a los  $\beta_1$  de localización cardíaca. Al tener gran semejanza estructural con esta molécula, es capaz de ocupar el receptor de la hormona y desencadenar los mismos evento (Martínez-Pérez, 2004) (Nicandro, 2008).

El primer paso en la acción de adrenalina y sus análogos es la unión de la hormona a su receptor, esto provoca un cambio intracelular que causa la separación de difosfato de guanosina (GDP) de la proteína G estimulante (Gs) y su activación al unirse a trifosfato de guanosina (GTP), así la subunidad  $\alpha$  de Gs se desplaza a la adenilato ciclasa activándola y catalizándola formación de AMPc, la proteína dependiente de AMPc, proteína quinasa A (PKA), es activada por el AMPc, la fosforilación de las proteínas celulares por la proteína cinasa da lugar a la respuesta celular, produciendo relajación de músculo liso en los vasos sanguíneos provocando que la presión decaiga, dando lugar a una isquemia funcional prolongada (Figura 13)(Martínez-Pérez, 2004).

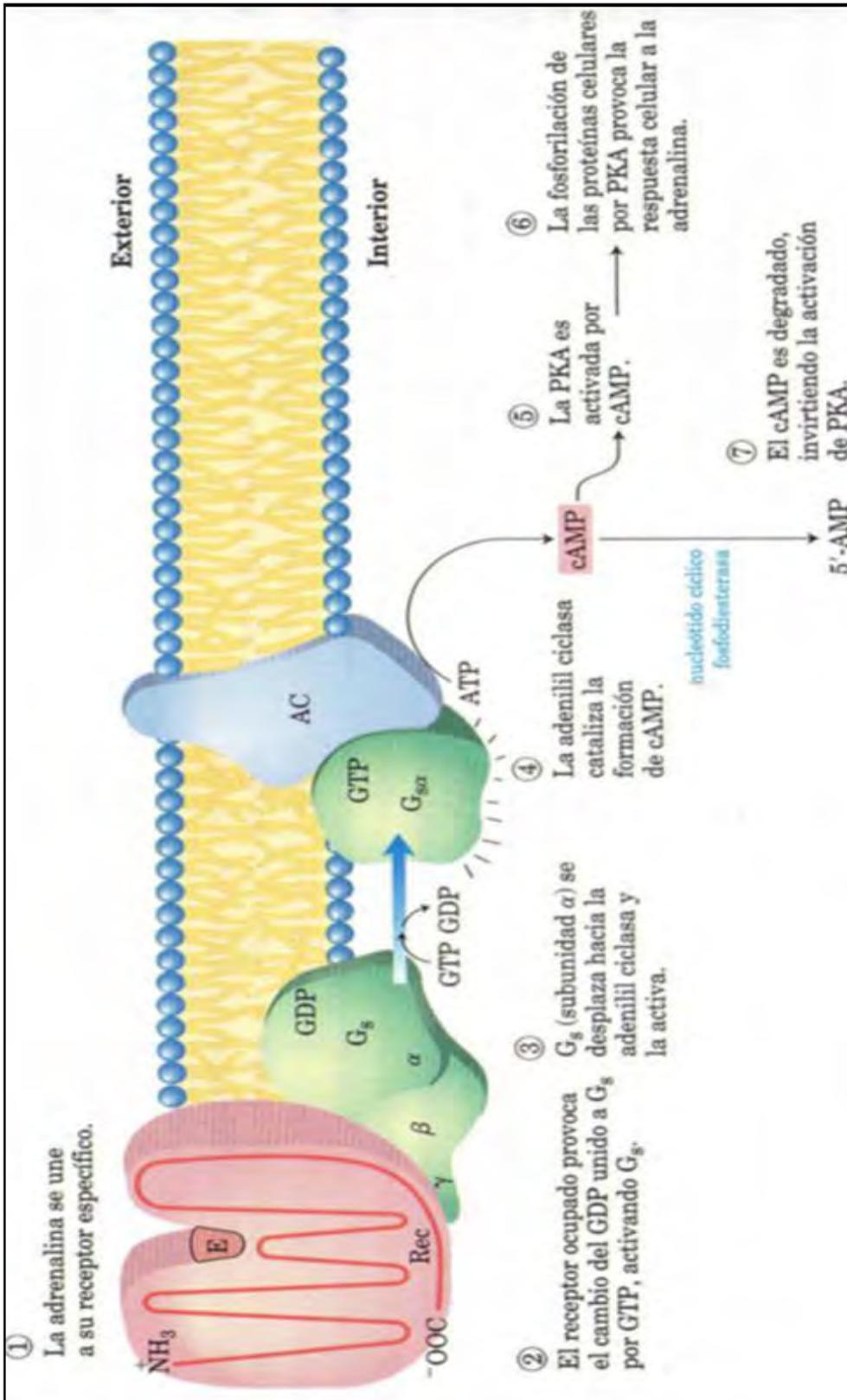


Figura 13. Mecanismo de acción de Isoproterenol (Martínez-Pérez, 2004).

## **PAPEL ANTIFIBRÓTICO DEL DERIVADO DE ADENOSINA; IFC-305.**

La adenosina es el nucleósido de adenina, que participa en la síntesis de nucleótidos, especialmente durante condiciones de estrés isquémico; se ha observado que la administración de adenosina puede contribuir a la reducción de la morbilidad y mortalidad del Infarto al Miocardio (Shafy et al., 2012).

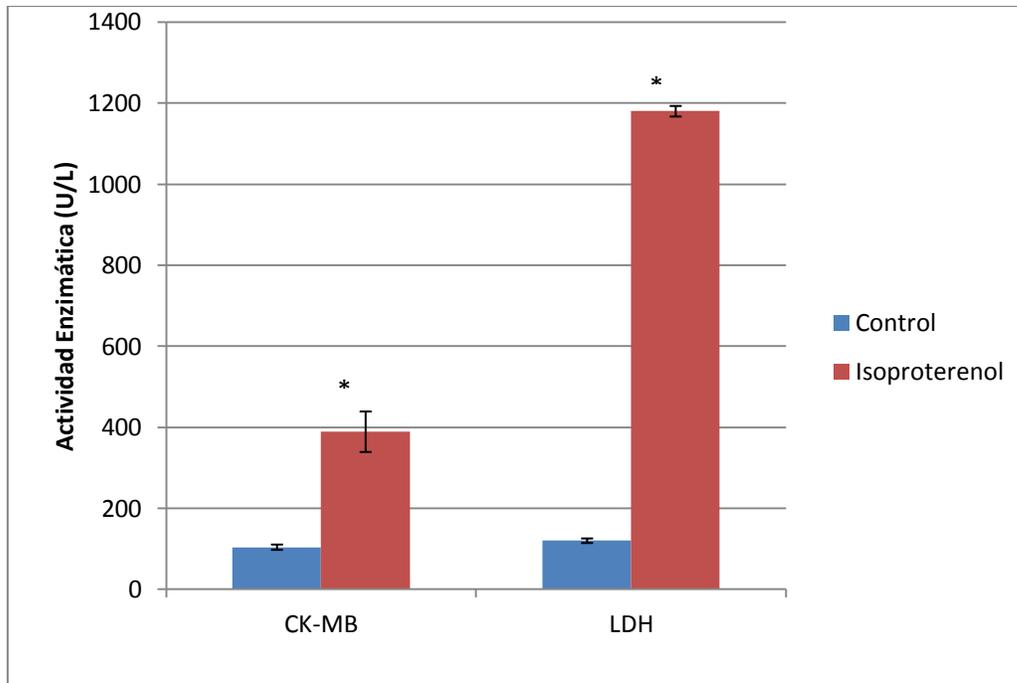
El IFC-305 es un compuesto derivado de adenosina, desarrollado por la Doctora Victoria Chagoya; el cual ha demostrado tener propiedades antifibróticas, previniendo el desarrollo de fibrosis y la activación de células estelares en un modelo de cirrosis hepática inducida por CCl<sub>4</sub>. Se sugiere que el efecto del IFC-305 involucra la modulación de la expresión genética, ya que en el estado cirrótico, 414 genes se encuentran desregulados y con el compuesto IFC-305 tienden a normalizarse (Perez-Carreón et al., 2010). En dicho estudio se encontró que el IFC-305 regula la expresión de *Pparg* (gen del receptor y activado por proliferados peroxisomales) así como *Col1a1*.

El mecanismo que se ha propuesto es la regulación de la metilación del DNA. Las citosinas que se hallan junto a una guanina en la secuencia del DNA (CpG) pueden ser modificadas a 5-metilcitosina gracias a las metiltransferasas de DNA (DNMT). La metilación del DNA sobre los promotores de los genes se ha asociado al silenciamiento de la expresión y a compactación de la cromatina (En Li, 2014). Durante la cirrosis hepática existe una disminución en la metilación del DNA de una manera global, mientras que la metilación aumenta en el hígado al administrar el compuesto IFC-305 (Rodríguez- Aguilera, 2012).

También se observó que la administración de IFC-305 a ratas cirróticas provoca una disminución en el mRNA de *Col1a1* mediante la metilación del DNA sobre el promotor de este gen, (Rodríguez-Aguilera, 2015). La transcripción del gen que codifica PPAR- $\gamma$  también se ha visto regulada por el IFC-305, promoviendo la acetilación sobre el promotor de *Pparg* y un aumento en la transcripción de este gen.

## VALIDACIÓN DEL MODELO DE ISOPROTERENOL MEDIANTE ENSAYO ENZIMÁTICO EN ENZIMAS MARCADORAS

Para poder evaluar si el modelo de Isoproterenol provoca daño cardiaco, se hizo un estudio por Yáñez-Maldonado en el 2009, dónde se evaluó la actividad de enzimas marcadoras de daño cardiaco tales como LDH y CK-MB en la etapa de infarto, esto es a las 12 h posterior a la administración con Iso (Gráfica1).



Gráfica1: **Evaluación de la actividad enzimática de LDH y CK-MB.** En suero de ratas obtenido a las 12 h posterior a la administración de Isoproterenol \* Diferencia significativa ( $p > 0.001$ ) comparada contra el control. Modificado de (Yáñez-Maldonado, 2009).

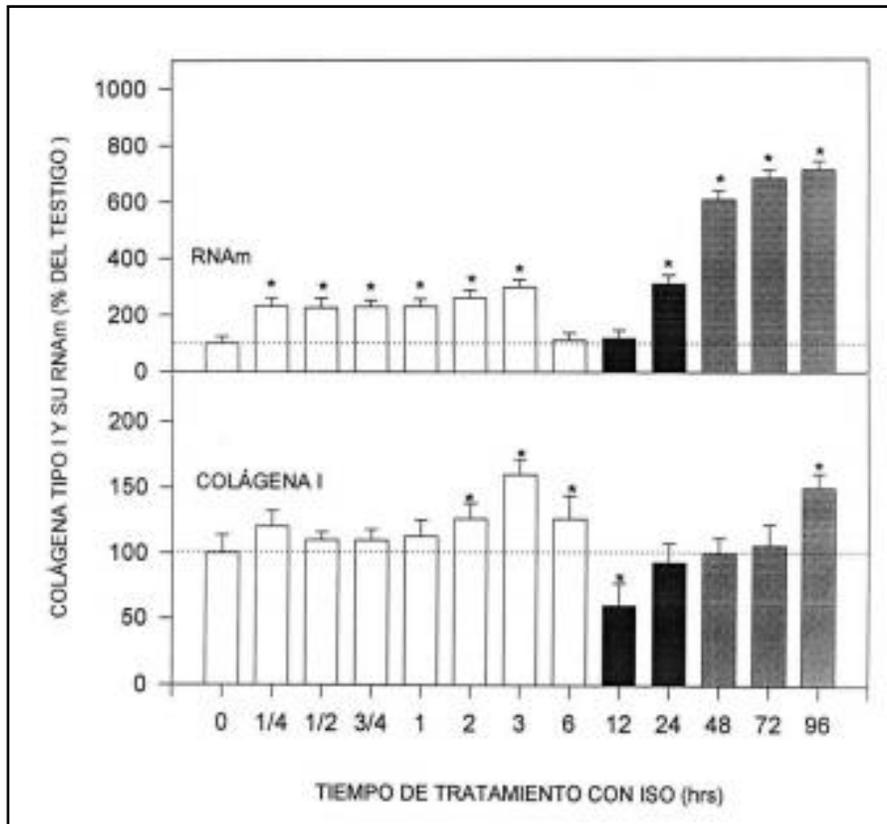
Se observa el aumento de la actividad con respecto al control, lo que nos habla de un daño cardiaco en la etapa de infarto. Estos resultados le dan validez al modelo ya que permite ver qué ocurre un daño inducido por Isoproterenol (Yáñez-Maldonado, 2009).

## **ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE COLÁGENA I EN LA ETAPA DE REMODELACIÓN CARDIACA.**

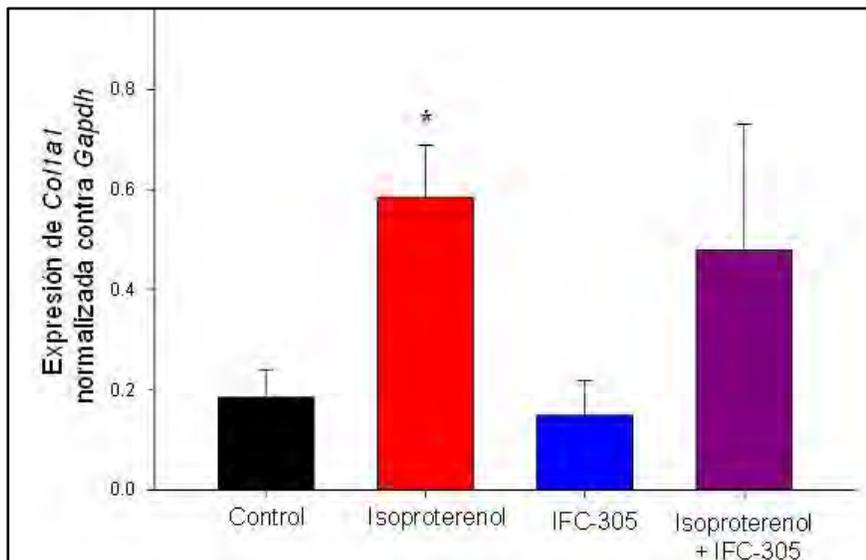
En el laboratorio también se estudiaron los genes involucrados en la remodelación del tejido cardíaco durante el infarto experimental inducido por Isoproterenol en ratas, en donde se evaluó colágena I que tiene un papel importante ya que es la encargada de darle soporte y elasticidad al corazón además de ser las principales involucradas en la etapa de remodelación cardíaca. Para ello se llevaron a cabo estudios de Western Blot en los cuales se evaluaron los niveles de proteína, además de hibridación de DNA complementario (cDNA) para medir los niveles de mRNA en las tres etapas del infarto (preinfarto, infarto y postinfarto) así como retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa para evaluar el efecto del IFC-305 en la expresión de mRNA.

En el área del tejido infartado se observaron aumentos no significativos transitorios de colágena I, entre los 15 min hasta las 6 horas postratamiento con Iso, alcanzando un incremento por encima del control a las 3 h. Durante el infarto disminuye con respecto al control y a partir de entonces se incrementó paulatinamente sobre el nivel del control. Estos resultados indican que la lesión inducida durante el infarto provocó una disminución de la síntesis de colágena tipo I. Incrementos subsecuentes hasta las 96 h correlacionan con los cambios de actividad de transcripción (Gráfica 2).

El daño provocado por Isoproterenol en el tejido cardíaco se refleja en el contenido de mRNA de colágena tipo I en el área de infarto, la actividad transcripcional del gen aumentó a los 15 min, observándose un aumento a las 3 h postratamiento, durante el infarto disminuye hasta alcanzar el nivel del control. En la etapa postinfarto aumenta paulatinamente con respecto al control al finalizar el periodo de tratamiento. El aumento en mRNA precede el aumento de la proteína (Gráfica 2).



Gráfica 2: Niveles de RNAm y proteína de colágena I. \* Diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) comparada contra el grupo control (Martínez-Pérez, 2004).

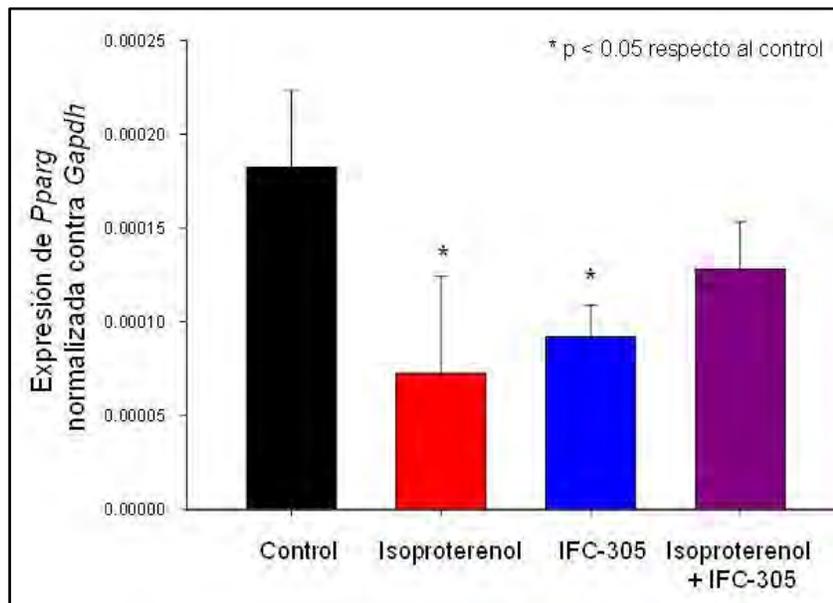


Gráfica 3: Análisis de la expresión de *Col1a1* mediante RT-qPCR. Los resultados están normalizados contra la expresión de *Gapdh* ( $n = 3$  ratas por grupo). \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada contra el grupo control (Murillo-de-Ozores & Chagoya-de-Sánchez, 2015).

En el 2015 se evaluaron los transcritos a las 96 h posteriores al tratamiento con Iso por RT-q PCR en la cual se observa un aumento en los niveles de mRNA de *Col1a1* en los corazones de las ratas tratadas con Isoproterenol, (Gráfica 3). Se evaluó el tratamiento y se observó que el IFC-305 no provoca un cambio significativo.

### Papel de PPAR- $\gamma$ en el corazón.

En este mismo año, Chagoya y colaboradores midieron la expresión del transcrito para *pparg* mediante RT-q PCR en corazones tratados con Isoproterenol a las 96 h del tratamiento, a si como el efecto del compuesto IFC-305 (Gráfica 4).

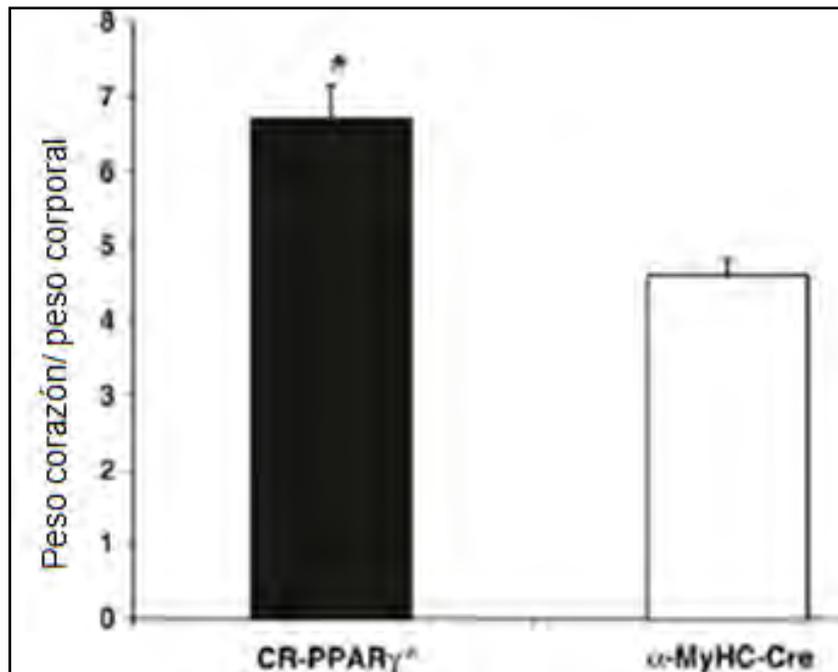


Gráfica 4: Análisis de la expresión de *Pparg* mediante RT-qPCR. Los resultados están normalizados contra la expresión de *Gapdh* (n=3 ratas por grupo). \* Diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) comparada contra el grupo control (Murillo-de-Ozores and Chagoya-de-Sánchez, 2015).

En la gráfica 4 se observa que el transcrito baja con respecto al control, y que al tratarse con IFC-305, no recupera los niveles normales. A pesar de los bajos niveles de expresión de *Pparg* en el corazón, fue posible detectar el transcrito e incluso se observa una disminución con la administración de Isoproterenol o IFC-305.

Se ha reportado en ratones, (Ding et al., 2007) la cardioprotección de PPAR- $\gamma$  por daño oxidativo en cardiomiocitos knockout en donde se removieron los exones 1 y 2 de *Pparg*, observándose cambios patológicos alrededor de 3 meses de edad, como características de hipertrofia cardíaca progresiva con daño oxidativo mitocondrial. La mayoría de los ratones murieron por cardiomiopatía dilatada.

En la gráfica 4 se muestra la relación peso corazón/peso corporal del ratón, en dónde es mucho mayor en los ratones knockout con respecto a los ratones control, lo que indica que la ausencia de PPAR- $\gamma$  puede estar relacionada con hipertrofia cardiaca. En la figura 14 también se encuentran las gráficas de niveles de mRNA de dos marcadores de hipertrofia cardiaca,  $\alpha$  actina esquelética y el factor natriurético atrial (ANF), en corazones knockout y controles, observándose que estos transcritos están sobreexpresados. En la figura 15 se tienen fotografías de un corazón knockout y de un control, observándose morfológicamente una cardiomiopatía dilatada con evidencia de insuficiencia cardiaca. En la figura 15 también se presenta un análisis histopatológico en microfotografías de muestras cardiacas teñidas con tricrómica de Masson, revelándose la presencia de fibrosis intersticial en corazones knockout esto se debe en parte a que este factor de transcripción actúa sobre el gen *Col1a1* que es profibrótico apagando su transcripción, cancelando la traducción de colágena I, provocando la fibrosis.



Gráfica 5: **Relación peso corazón/ peso corporal de los ratones.** En dónde se puede observar que a diferencia del control los knockout muestran una relación más elevada, esto resulta en una hipertrofia cardiaca por la deficiencia de PPAR- $\gamma$ . \* Diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) comparada con el grupo control. Traducido de (Ding et al., 2007).

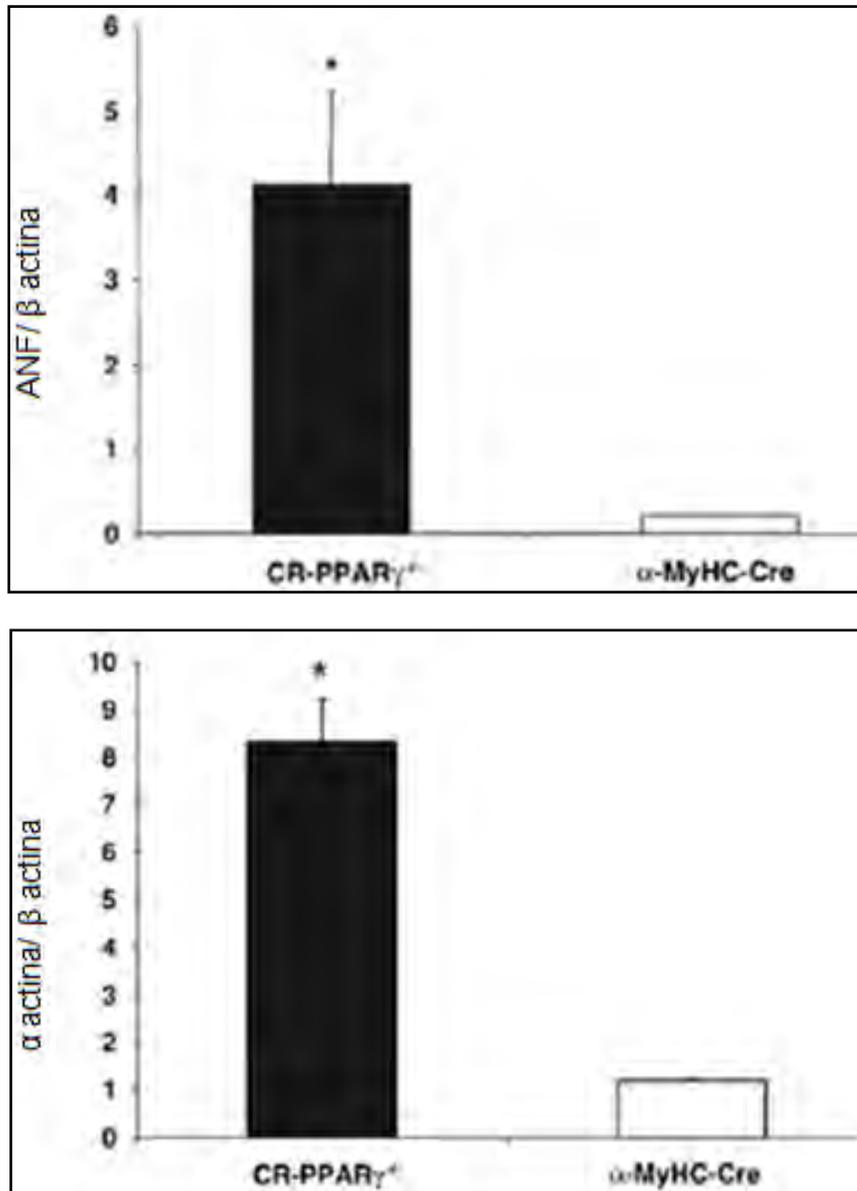


Figura 14. **Evaluación de RNAm de  $\alpha$ -actina y ANF, marcadores de hipertrofia cardiaca.** Observamos que en corazones knockout estos marcadores se encuentran significativamente aumentados en comparación con el control. \*Diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) comparada contra el grupo control (Ding et al., 2007).

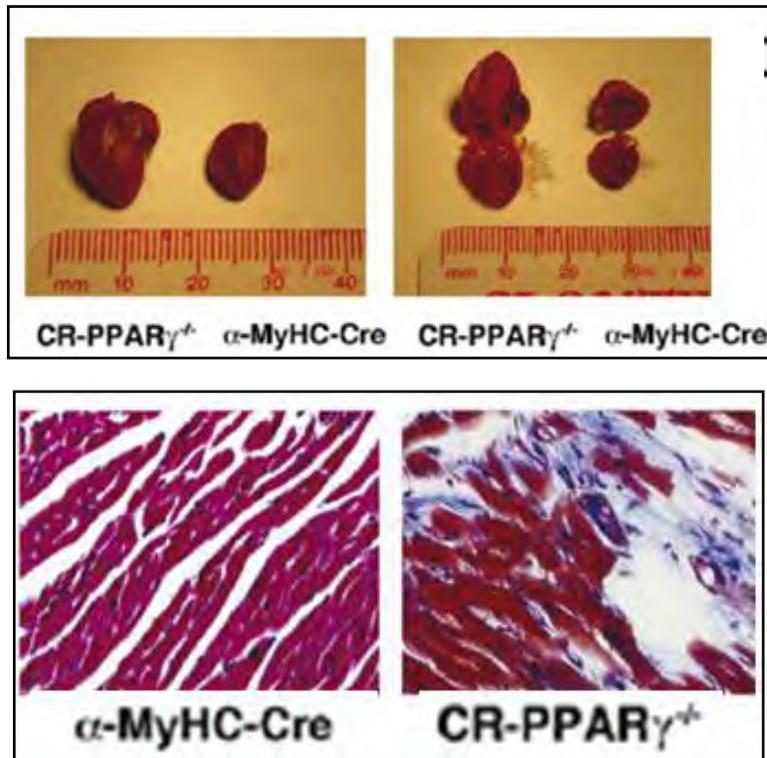


Figura 15. **Corazón control vs corazón knockout y cortes histológicos de corazón.** En las figuras se observan un corazón control y un corazón knockout, en donde hay un incremento de tamaño. En la figura siguiente se muestran cortes histológicos de corazón teñidos con tricrómica de Masson, observándose que en donde se depletó PPAR- $\gamma$  existe la presencia de fibrosis a diferencia del control. Modificado de (Ding et al., 2007).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El infarto al miocardio es un problema de salud, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud las cardiopatías representan la primera causa de muerte en México (Martínez Ríos, 2014). En la actualidad no existe un tratamiento que permita disminuir el daño causado posterior a este padecimiento.

Se han descrito efectos antifibróticos del compuesto IFC-305 en un modelo experimental de cirrosis hepática (Pérez-Carreón et al., 2010) y se ha observado que el compuesto es capaz de regular la expresión de *Col1a1*, *Col3a1* y *Pparg* en la etapa de remodelación cardiaca (Murillo-de-Ozores & Chagoya de Sánchez, comunicación personal), dado que es un problema de salud pública es por eso que nos interesa estudiar si el compuesto posea propiedades antifibróticas en corazón después del infarto. Para ello se estudiarán los niveles proteicos de colágena tipo I y PPAR- $\gamma$  en corazones infartados de ratas tratados con este compuesto.

### 4. HIPÓTESIS.

La cantidad de colágena I y PPAR- $\gamma$  en un infarto al miocardio inducido por isoproterenol, se puede corregir por el tratamiento con el compuesto IFC-305.

## 5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la cantidad de las proteínas colágena I y PPAR- $\gamma$  en respuesta al tratamiento con IFC-305 en la etapa de remodelación cardiaca posterior al infarto.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Medir la actividad de las enzimas marcadoras de daño al miocardio Lactato Deshidrogenasa (LDH) y creatincinasa (CK-MB) a las 12 h después del infarto, en corazones tratados con Iso+ 4ss e Iso+ 4IFC mediante espectrofotometría para corroborar que se indujo el infarto.
2. Evaluar histopatológicamente cortes transversales de corazones de rata que se sometieron al tratamiento con Iso+ 4ss e Iso+ 4IFC en la etapa de remodelación, con ayuda de la tinción tricrómica de masson.
3. Estudiar la cantidad de las proteínas que participan en la remodelación como colágena tipo I y PPAR- $\gamma$  mediante Western Blot a las 96 h después de tratamiento con IFC-305.

## 6. MÉTODOS.

### 6.1 Inducción de infarto con isoproterenol

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de entre 200-300g provistas de agua y comida *ad libitum*, las cuáles se dividieron en 4 grupos: 1) 4IFC (ratas a las cuales se les administró solución salina vía s.c. y 1 h después IFC vía i.p.), 2) Control (a las que únicamente se les administró solución salina vía i.p y s.c), 3) Iso+ 4ss (ratas a las que se les administró isoproterenol vía s.c y solución salina 1h después vía i.p.), 4) Iso+ 4IFC (ratas a las cuáles se les administró isoproterenol vía s.c. y 1h después IFC vía i.p.), el Isoproterenol (dosis 67 mg/Kg) fue administrado entre las 8:00- 8:30 h para inducir el infarto al miocardio. Una hora después se administró por vía i.p. el compuesto IFC-305 (dosis 50 mg/Kg), esta última administración se repitió cada 24 h, hasta las 96 h, tiempo en que fueron sacrificadas. Posteriormente se recuperó el corazón, se pesó y se disectó la zona apical del ventrículo izquierdo, el resto se preservó a -70°C (Figura13).

Procedimientos de acuerdo a las normas institucionales de uso y manejo de animales.

Dosis Isoproterenol: 67 mg/Kg.

Dosis IFC-305: 50 mg/Kg

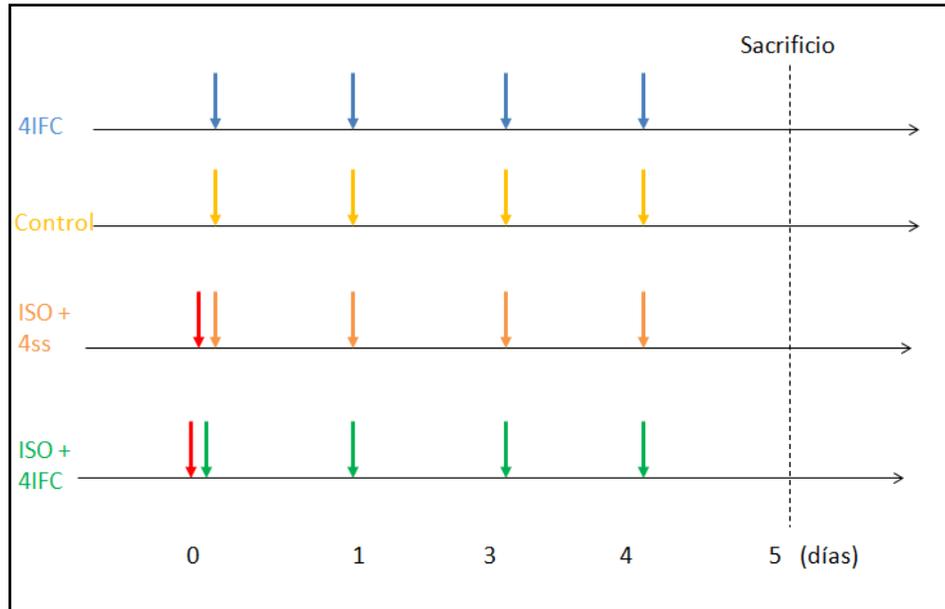


Figura 16. Modelo de Isoproterenol para evaluar la remodelación cardíaca.

## 6.2 Evaluación histopatológica de cortes transversales de corazón.

La tinción tricrómica de Masson es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágena que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágena (Gartner, 2011).

Se necesitan de la hematoxilina que tiñe los núcleos celulares, un colorante citoplasmático como la escarlata de Biebrich, azul de anilina que sirve de contraste con la hematoxilina, Fucsina ácida que tiñe de rosa a los eritrocitos y un colorante derivado del anillo de trifenilmetano, como el ácido fosfomolibdico o fosfotungstico que es el que va a teñir el tejido conjuntivo (Gartner, 2011).

Las ratas se trataron de acuerdo al modelo establecido, se dejaron evolucionar hasta la etapa de remodelación cardíaca (96 h), posteriormente se anestesiaron, se realizó punción cardíaca para recuperar suero, los corazones se trataron con formaldehído al 4% y se almacenaron a 4°C. Posteriormente los tejidos fueron evaluados histopatológicamente, por el Doctor Alberto Aranda Fraustro, jefe de departamento de patología del Instituto Nacional de Cardiología.

Se realizaron cortes transversales a cada uno de los corazones (en su mayoría 4 cortes) posteriormente en un criostato se hicieron cortes más delgados (4  $\mu\text{m}$  cada uno), se fijaron y se tiñeron con tricrómica de Masson, después las muestras se observaron en un microscopio óptico para diagnosticar la condición según sea el caso (Figura 17).

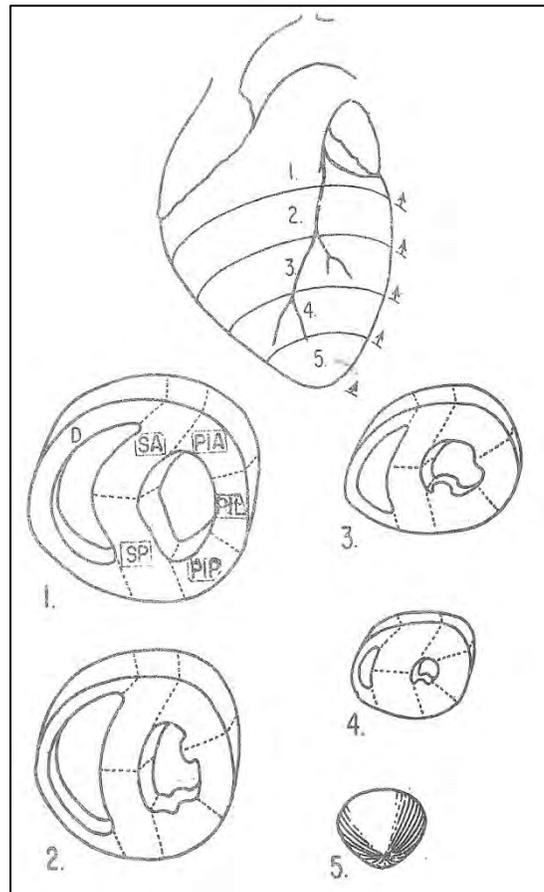


Figura 17. **Esquema representativo para el análisis de las zonas de infarto.** La base corresponde al número uno y la zona del ápice corresponde al número cinco. Imagen proporcionada por Instituto Nacional de Cardiología.

### **6.3 Validación del modelo por medio de la evaluación de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) y creatincinasa fracción MB (CK-MB).**

Como ya se mencionó con anterioridad, una de las maneras de diagnosticar un infarto al miocardio en la clínica es la elevación de enzimas marcadoras de daño miocárdico. Este trabajo evaluó la actividad de LDH y CK-MB. A continuación se describe el método y los kits que se utilizaron para tal fin (Figura 18).

Se evaluó la actividad en la etapa de infarto (que ocurre a las 12 h después de la administración con Isoproterenol), ya que dicha etapa es cuando se encuentra una mayor actividad de estas enzimas (Yáñez Maldonado, 2009).

Para dichos ensayos se utilizaron sueros de cada una de las condiciones. Antes del sacrificio se realizó punción cardiaca y se recolectaron aproximadamente 10 mL de sangre total. Posteriormente se dejaron a 4°C toda la noche para la formación de coagulo y se centrifugación a 3,000 rpm por 15 min. El suero se recolectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se procedió a realizar la determinación de actividad enzimática. Después las muestras fueron almacenadas a -70°C.

Dosis Isoproterenol: 67 mg/Kg.

Dosis IFC-305: 50 mg/Kg

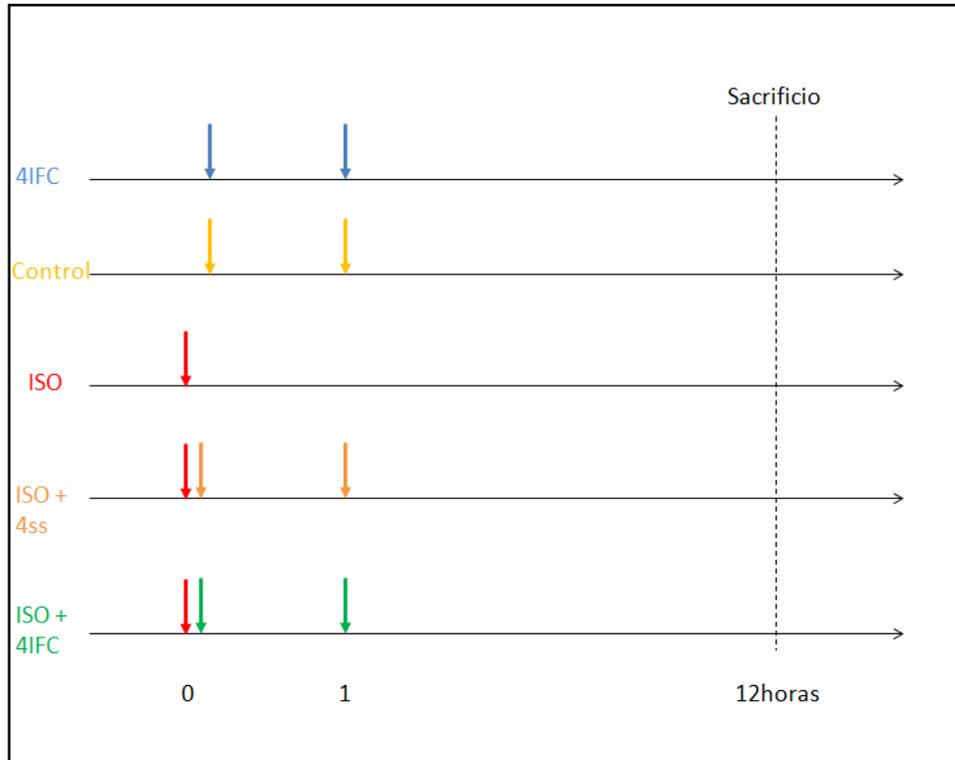


Figura 18. Modelo de Isoproterenol para evaluar la actividad enzimática en la etapa de infarto.

#### 6.4 Determinación cuantitativa de Lactato Deshidrogenasa (LDH).

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción del piruvato por el NADH. La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio determinado espectrofotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de LDH en la muestra ensayada.



Se utilizó el kit LDH-LQ Piruvato. Cinética UV. DGKC. Líquido (Sipinreact) número de catálogo: 41222 para la evaluación de actividad de LDH. Se siguió el procedimiento indicado por el fabricante como se describe a continuación.

## Reactivos

|                 |                      |            |
|-----------------|----------------------|------------|
| R1<br>Tampón    | Imidazol<br>Piruvato | 65mmol/L   |
| R2<br>Substrato | NADH                 | 0.18mmol/L |

### **Preparación.**

Reactivo de trabajo (RT); Mezclar 4 volúmenes (R1) Tampón + 1 volumen de (R2) Substrato.

### **Procedimiento.**

- 1) Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: longitud de onda a 340 nm, cubeta de 1 cm de paso de luz, temperatura constante a 25°C.
- 2) Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- 3) Pipetear en una cubeta:

|              | 25-30°C | 37°C |
|--------------|---------|------|
| RT (mL)      | 3,0     | 3,0  |
| Muestra (µL) | 100     | 50   |

- 4) Mezclar, incubar 1 min.
- 5) Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 min.
- 6) Calcular el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### **Cálculos.**

25°C-30°C  $\Delta A/\text{min} \times 4925 = \text{U/L LDH}$

37°C  $\Delta A/\text{min} \times 9690 = \text{U/L LDH}$

**Unidades:** La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

### **Valores de referencia:**

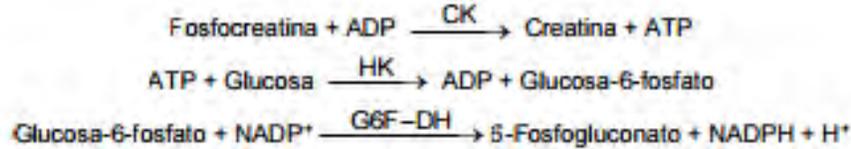
25°C: 120- 240 U/L

30°C: 160-320 U/L

37°C: 230-460 U/L

### 6.5 Determinación cuantitativa de creatincinasa fracción MB (CK-MB)

El anticuerpo anti CK-M inhibe completamente la actividad de la CK-MM y la subunidad (M) de la CK-MB. La actividad de la CK-B no inhibida se determina según las siguientes reacciones:



La velocidad de formación de NADPH, determinado espectrofotométricamente es proporcional a la concentración catalítica de CK-B en la muestra ensayada.

Se utilizó el kit Creatincinasa- MB Inmunoinhibición. Cinético UV (Sipinreact) número de catálogo 1001055 para la evaluación de actividad de CK-MB. Se siguió el procedimiento indicado por el fabricante como se indica a continuación

#### Reactivos

|                 |  |   |
|-----------------|--|---|
| R1<br>Tampón    | Imidazol pH 6.7<br>Glucosa<br>Acetato de magnesio<br>EDTA  | 100mmol/L<br>20mmol/L<br>10mmol/L<br>2mmol/L  |
| R2<br>Anti CK-M | Anti CK-M<br>ADP<br>AMP<br>di-Adenosina-5-pentafosfato<br>NADP <sup>+</sup><br>Hexoquinasa (HK)<br>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH)<br>N-acetilcisteína<br>Fosfato creatinina | 2000 U/L<br>2mmol/L<br>5mmol/L<br>10mmol/L<br>2mmol/L<br>2500 U/L<br>1500 U/L<br>20mmol/L<br>30mmol/L |

#### Preparación.

- Reactivo de trabajo (RT).
- Disolver un comprimido de R2 en un vial de R1.
- Tapar el vial y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

#### Procedimiento.

- 1) Condiciones de ensayo: longitud de onda 340 nm, cubeta 1 cm paso de luz, temperatura ambiente: 25°C/ 30°C/ 37°C.
- 2) Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.

3) Pipetear en una cubeta:

|                    |     |
|--------------------|-----|
| RT (mL)            | 1,0 |
| Muestra ( $\mu$ L) | 40  |

4) Mezclar incubar 10 min.

5) Leer la absorbancia ( $A_1$ ) inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia de nuevo a los 5 min. ( $A_2$ ).

6) Calcular la diferencia de absorbancias:  $\Delta A = A_2 - A_1$ .

### **Cálculos.**

$\Delta A \times 825 =$  U/L de CK-B

$\Delta A \times 1651 =$  U/L de CK-MB.

### **Valores de referencia.**

La probabilidad de un infarto de miocardio es elevada en las siguientes condiciones:

|       |          |          |          |
|-------|----------|----------|----------|
|       | 25 °C    | 30 °C    | 37 °C    |
| CK-MB | > 10 U/L | > 15 U/L | > 24 U/L |

### **6.6 Obtención de proteínas totales.**

Se realizó un homogenado del área de infarto (zona apical del corazón) en 1 mL de buffer (sacarosa 200 mM, HEPES 20 mM a pH 7.4) que contiene inhibidores de proteasas (aprotinina 2  $\mu$ g/mL y PMSF 100  $\mu$ g/mL). Posteriormente el homogenado se recolectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, recuperándose el sobrenadante en otro tubo, se volvió a centrifugar a las mismas condiciones para eliminar restos celulares y únicamente rescatar proteínas solubles, después de la segunda centrifugación la fracción soluble se volvió a recuperar en otro tubo de 1.5 mL y se dispuso a cuantificar, las muestras siempre se conservaron en hielo (Martínez-Pérez, 2004).

### **6.7 Cuantificación de proteínas por método de Bradford.**

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, uno de los métodos colorimétricos es el método de Bradford, el cual se basa en la unión de un colorante, *Coomasie Blue G-250*, a las proteínas. El colorante en solución ácida, existe en dos formas químicas, una azul y otra naranja, las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método tiene una sensibilidad de 1-1.5  $\mu$ g, simple, rápido, barato, y pocas sustancias interfieren en la determinación, entre las que se encuentran detergentes y soluciones básicas (Rodríguez-Aguilera, 2012).

Se siguió el protocolo de ensayo estándar en placa de ELISA proporcionado por el fabricante del reactivo Quick Start Bradford 1x *Dye Reagent* (BioRad® 500-0205), para lo cual se pesaron con exactitud 2 mg de albúmina sérica bovina Fracción V (USB Corporation 10857) y se llevaron a 1ml con agua desionizada, posteriormente se preparó una curva estándar de la siguiente manera:

| No. Tubo    | Volumen del Estándar [ $\mu\text{L}$ ] | Fuente del estándar | Volumen de diluyente** ( $\mu\text{L}$ ) | [Proteína] ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) |
|-------------|--|---------------------|--|--|
| 1           | 20                                     | Stock 2mg/mL        | 0  | 2000                                   |
| 2           | 30                                     | Stock 2mg/mL        | 10                                       | 1500                                   |
| 3           | 20                                     | Stock 2mg/mL        | 20                                       | 1000                                   |
| 4           | 20                                     | Tubo 2              | 20                                       | 750                                    |
| 5           | 20                                     | Tubo 3              | 20                                       | 500                                    |
| 6           | 20                                     | Tubo 5              | 20                                       | 250                                    |
| 7           | 20                                     | Tubo 6              | 20                                       | 125                                    |
| 8 (Blanco*) | -                                      | -                   | 20                                       | 0                                      |

\*El blanco y el diluyente\*\* utilizado fue una solución que contenía sacarosa 200 mM y Hepes 20mM. Tomado de (Rodríguez-Aguilera, 2012).

### **Procedimiento.**

- 1) Se sacó la solución 1x *Dye Reagent* (BioRad® 500-0205) de su temperatura de almacenamiento ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se dejó a temperatura ambiente hasta que alcanzó el equilibrio térmico.
- 2) Se agregaron  $5\mu\text{l}$  de la curva, al igual que cada una de las muestras por duplicado en la placa de ELISA. Posteriormente se agregaron  $250\mu\text{l}$  del reactivo 1x *Dye Reagent* (BioRad® 500-0205) en cada pozo con la ayuda de una pipeta multicanal.
- 3) Se incubó a temperatura ambiente por 5 min, es importante tomar en cuenta que las muestras no deben ser incubadas por más de una hora a temperatura ambiente.
- 4) Pasado este tiempo se leyó en un lector de ELISA la absorbancia de la curva y las muestras a una  $\lambda$  de 595 nm.
- 5) Se determinó la concentración de proteínas de las muestras problema, interpolando en la curva estándar.

### **6.8 Western Blot.**

El Western Blot (WB) o es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas. Este método descrito por Towbin y colaboradores, permite la detección de una proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Con esta técnica se puede estimar la masa molecular de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y ser utilizado para comparar cualitativamente los niveles de proteínas entre muestras (Towbin H, 1979).

Se requiere llevar a cabo una electroforesis con SDS-PAGE, para que posteriormente el gel se pueda transferir a una membrana de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF). Estas proteínas se transfieren mediante una corriente eléctrica, por lo que estas quedan en la membrana, posteriormente se lleva a cabo un bloqueo en la mayoritariamente con leche, después la exposición de un anticuerpo primario que reconocerá primeramente a la proteína de interés, paso seguido se dará otra exposición con anticuerpo secundario que reconocerá al anticuerpo primario, el secundario tiene acoplada una enzima (peroxidasa de rábano) que reconocerá su sustrato (luminol) dando una reacción de quimioluminiscencia (Towbin H, 1979).

Se prepararon geles de policarilamida-SDS al 8 %, ya que esta concentración permite que se separen proteínas de hasta 37 kDa (se utilizó como control de carga GAPDH con un peso similar), también se prepararon 5 veces el volumen equivalente a las muestras con 100 µg de proteína mezclada con el amortiguador de muestra (adicionando el volumen de amortiguador de muestra para obtener una concentración final de 1x de dicha solución). Posteriormente las muestras se colocaron en el thermoblock a una temperatura de 95 °C por 5 min y posteriormente en hielo por el mismo periodo de tiempo, paso seguido se cargaron 100 µg de proteína de cada una de las muestras, así como 5µl de marcador de peso molecular *Dual color* (BioRad 161-0374EDU). La electroforesis se realizó con buffer de corrida a 100 V durante 2 h y 30 min.

Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon®-P (Millipore IPVH00010) previamente activadas en metanol. Se utilizó amortiguador de transferencia con metanol y se transfirió a 100 V por 1 h y 45 min.

Una vez transferidas las membranas, se dispuso a teñirlas con rojo de Ponceau, para garantizar que todas proteínas se hayan transferido, evaluar que no se hayan degradado además verificar ausencia burbujas al momento de transferir.

Posteriormente las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente con leche descremada, al 5 % disuelta en TTBS 1x.

La siguiente tabla muestra las condiciones en que se utilizaron los anticuerpos primarios, para cada una de las proteínas a evaluar.

Tabla 1: **Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de expresión de proteínas.**

| <b>Anticuerpo</b> | <b>Origen</b>         | <b>Marca, número de catálogo y lote.</b>    | <b>Condiciones de incubación.</b>                                      |
|-------------------|-----------------------|---|--|
| PPAR- $\gamma$    | IgG conejo policlonal | Santa Cruz Biotechnology<br>sc-7196; E0611  | 1:2000 gelatina 1.5%, temperatura ambiente en agitación toda la noche. |
| Colágena tipo I   | IgG cabra policlonal  | Santa Cruz Biotechnology<br>sc-25974; J1614 | 1:500 leche 5%, 4°C en agitación toda la noche.                        |
| GAPDH             | IgG ratón Monoclonal  | MilliporeTM<br>MAB374; 2521487              | 1:2000 leche 5%, 4°C en agitación toda la noche.                       |

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometieron a 5 lavados de 5 min en agitación con TTBS 1x para eliminar el anticuerpo que no se unió a su blanco. En seguida se incubaron con los anticuerpos secundarios con las condiciones establecidas en la siguiente tabla.

Tabla 2: **Anticuerpos secundarios utilizados para la determinación de expresión de proteínas.**

| <b>Anticuerpo</b>   | <b>Origen</b> | <b>Marca, número de catálogo y lote</b>    | <b>Condiciones de incubación</b>                            |
|---------------------|---------------|--|---|
| Anti-conejo IgG-HRP | Cabra         | Jackson                                    | 1:10000 gelatina 1.5% temperatura ambiente en agitación 2h. |
| Anti-ratón IgG-HRP  | Cabra         | Santa Cruz Biotechnology<br>sc-2005; F0412 | 1:10000 leche 5% temperatura ambiente en agitación 2h.      |
| Anti-cabra IgG-HRP  | Burro         | Santa Cruz Biotechnology<br>sc-2020; F2612 | 1:10000 leche 5% temperatura ambiente en agitación por 2h.  |

Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se sometieron a lavados con TTBS 1x como ya describió.

Para revelar se utilizaron 250  $\mu$ L del sustrato West Femo (Thermo Scientific 34095), así como equipo Li-Cor el cual permite visualizar las imágenes en la computadora, al escanear y tomar fotografías en determinado tiempo a las membranas previamente expuestas con el sustrato.

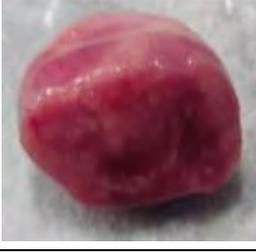
Para remover los anticuerpos y volver a evaluar la membrana con otros anticuerpos, se le aplicó un *stripping* el cual consiste en lavar 2 veces la membrana a temperatura ambiente y en agitación por 15 min con buffer *stripping*, dos veces durante 10 min con PBS 1x y una vez durante 5 min con TTBS 1x seguido por el bloqueo de la membrana con leche descremada al 5 % en TTBS durante 1 h.

## **7. ANALISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de ANOVA ordinaria, además de un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de Tukey, para ello se utilizó el software prism statistics.

## 8. RESULTADOS.

**8.1 Tabla 3: Características macroscópicas de los corazones de cada condición en la etapa de remodelación cardiaca.**

| Condición | Imagen  |   | Descripción   |
|-----------|---|---|---|
|           | Corazón completo  | Corte transversal   |   |
| Control   |    |    | Se observa un corazón de color rojo brillante, cavidades ventriculares uniformes sin presencia de algún tipo de daño.   |
| 4IFC      |    |    | Se observa un corazón de coloración rojo brillante, sin la presencia de algún tipo de daño.   |
| Iso+4ss   |   |   | Corazón con infarto en la región apical (zona blanquecina), los ventrículos a diferencia de los controles se pueden observar muy engrosados y la luz muy disminuida.            |
| Iso+4IFC  |  |  | Corazón con infarto en la zona apical de una coloración blanquecina, los ventrículos también presentan engrosamiento pero en menor grado en comparación con el corazón Iso+4ss. |

La tabla 4 muestra los corazones de cada condición, en dónde se puede observar que tanto el control como el tratado con el compuesto IFC-305 no presentan ningún grado de daño ya que su aspecto macroscópico se encuentra normal, además de los ventrículos.

Sin embargo en el corazón tratado con Isoproterenol se puede observar la presencia de una lesión de color blanquecina en la zona apical, parte característica de un infarto, el tamaño de los ventrículos se encuentra aumentada y por lo tanto la luz de la pared ventricular se encuentra disminuida, si comparamos la lesión de estos ventrículos con la lesión de los ventrículos de la condición Iso+4IFC podemos evaluar que el tamaño de los ventrículos es menor y por ende la luz de la pared ventricular está menos disminuida.

### 8.2.1 Resumen de la descripción de los cortes transversales de corazón de rata tratados con Isoproterenol, de cada una de las condiciones en la etapa de remodelación cardíaca.

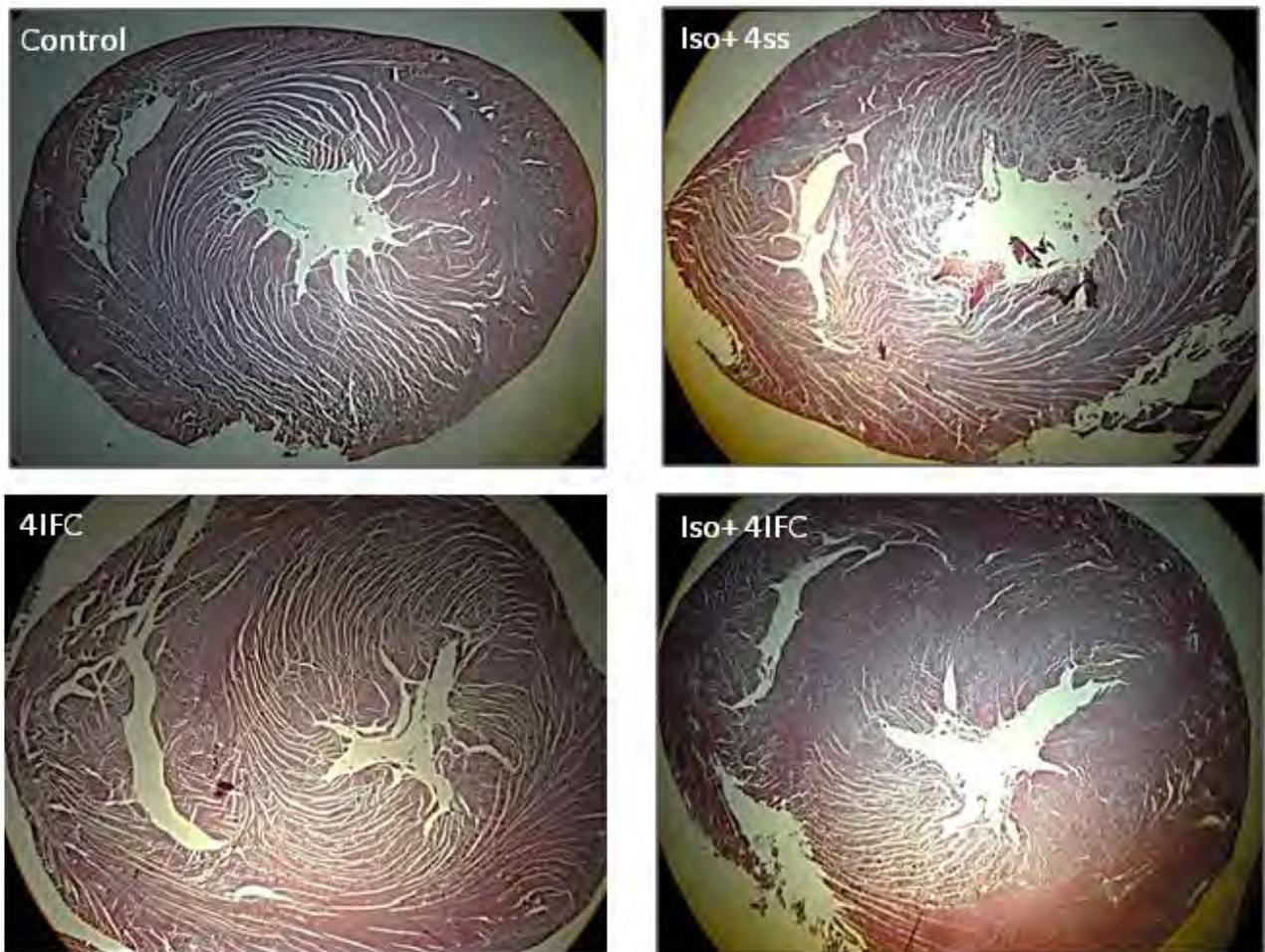


Figura 19. Tejido cardíaco de rata fijado en paraformaldehído, teñido con Tricrómica de Masson. Esta tinción permite observar las fibras de colágena de color azul y las fibras miocárdicas de color morado. Estas micrografías panorámicas 1.5x, muestran los cortes transversales de la zona apical de cada condición. Se observa que con Iso + 4SS existe una alta deposición de colágena, en comparación con Iso + 4IFC en donde se observa una disminución de fibras de colágena.

## 8.2.2 Esquema y micrografía de un corazón control, histologías teñidas con tricrómica de Masson.

### CONTROL

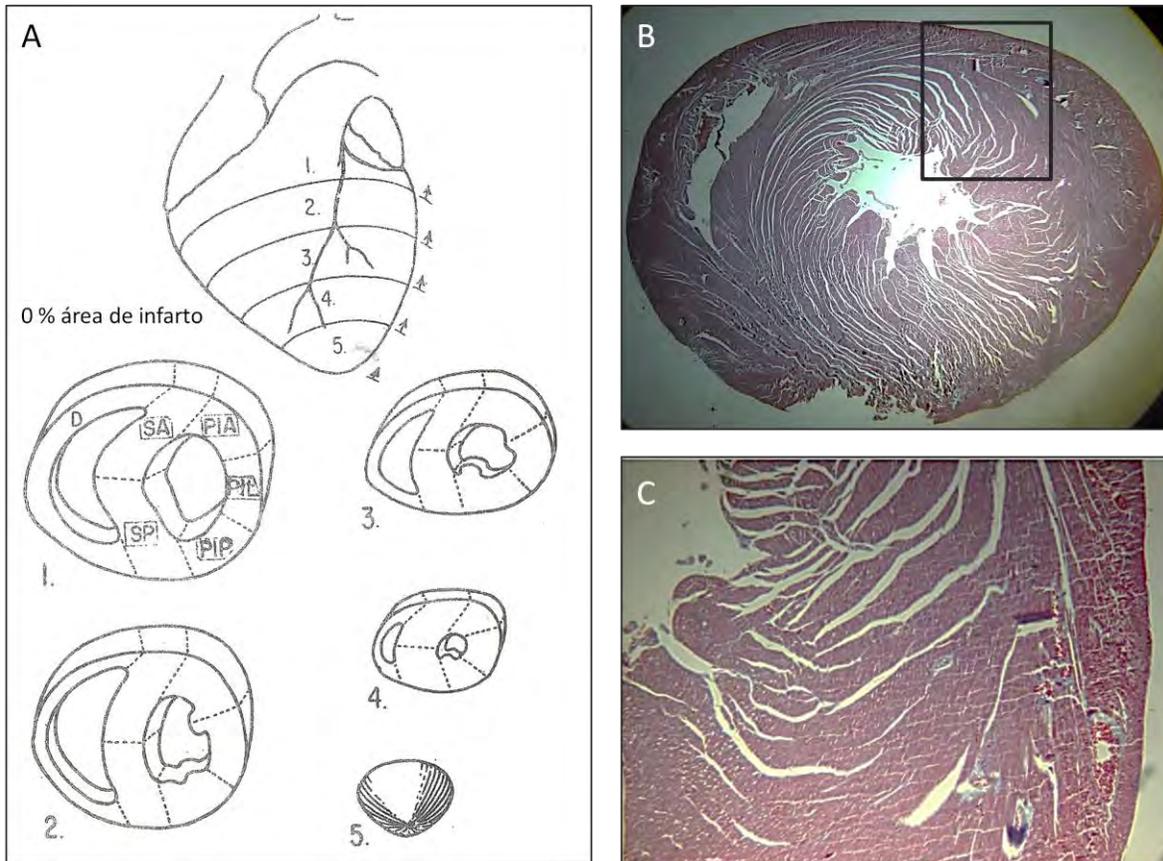


Figura 20. **Esquema y micrografías de un corazón control.** A. Esquema dónde se observan los cortes transversales del corazón que va desde la base (1) hasta la zona apical (5). B. Micrografía panorámica de la zona apical del corazón sin lesiones visibles, Masson 1.5x. C. Aumento de la zona anterior del ventrículo izquierdo dónde se puede observar vasos sanguíneos rodeados por tejido conjuntivo de color azul, Masson 2.5x.

### 8.2.3 Esquema y micrografías de un corazón tratado con Isoproterenol, histologías teñidas con tricrómica de Masson en la etapa de remodelación cardiaca.

#### Iso+ 4ss

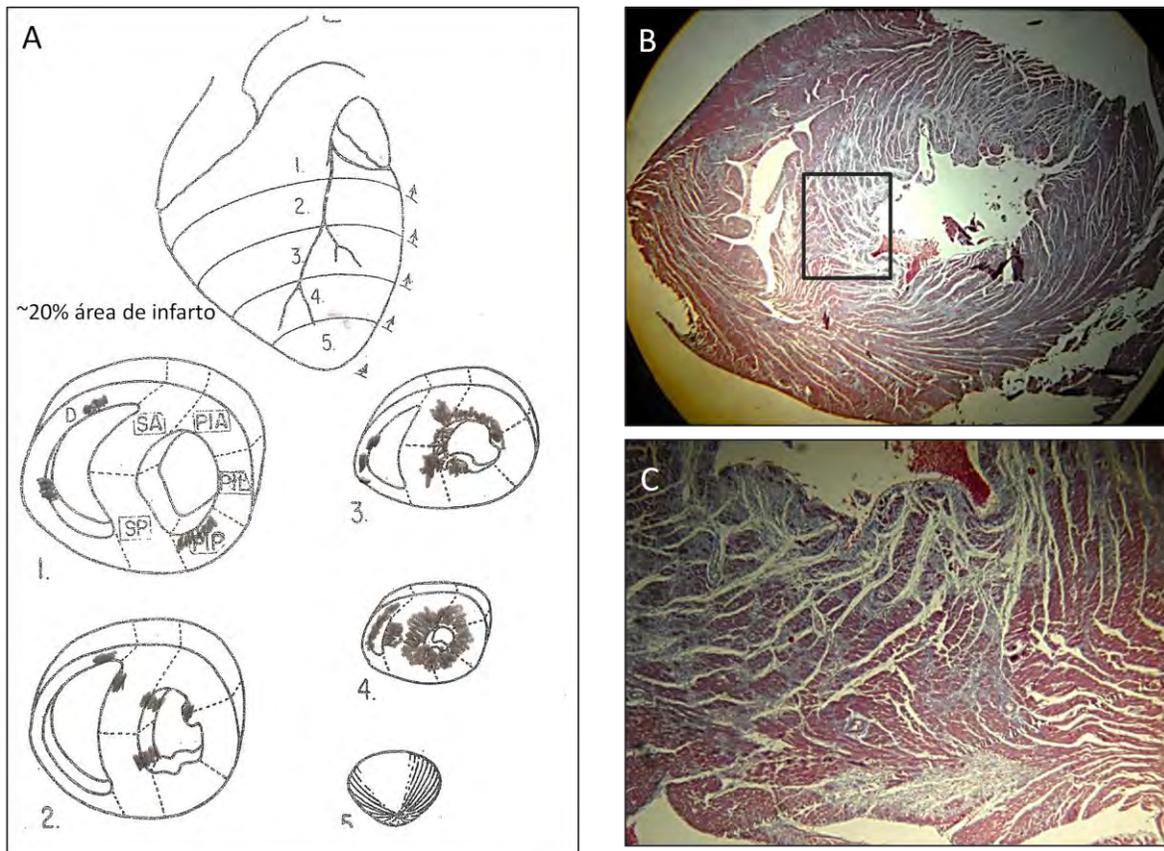


Figura 21. **Esquema y micrografías de un corazón tratado con Iso +4ss.**A. Se observan los cortes transversales del corazón, en dónde se localizan los focos de infarto en cada rebanada y que se calcularon corresponden aproximadamente a un 20 % de las superficies de corte. B. Micrografía panorámica de la zona apical del corazón en dónde se observa un infarto circunferencial de tipo subendocárdico en el ventrículo izquierdo Masson 1.5x. C. Aumento del tabique interventricular en dónde se observa la deposición de fibras de colágena en color azul. También se observa la presencia de fibroblastos por núcleos de color rojo, Masson 2.5x.

**8.2.4 Esquema y micrografías de un corazón tratado con Isoproterenol más cuatro dosis de IFC-305, histologías teñidas con tricrómica de Masson, en la etapa de remodelación cardiaca.**

**Iso+ 4IFC**

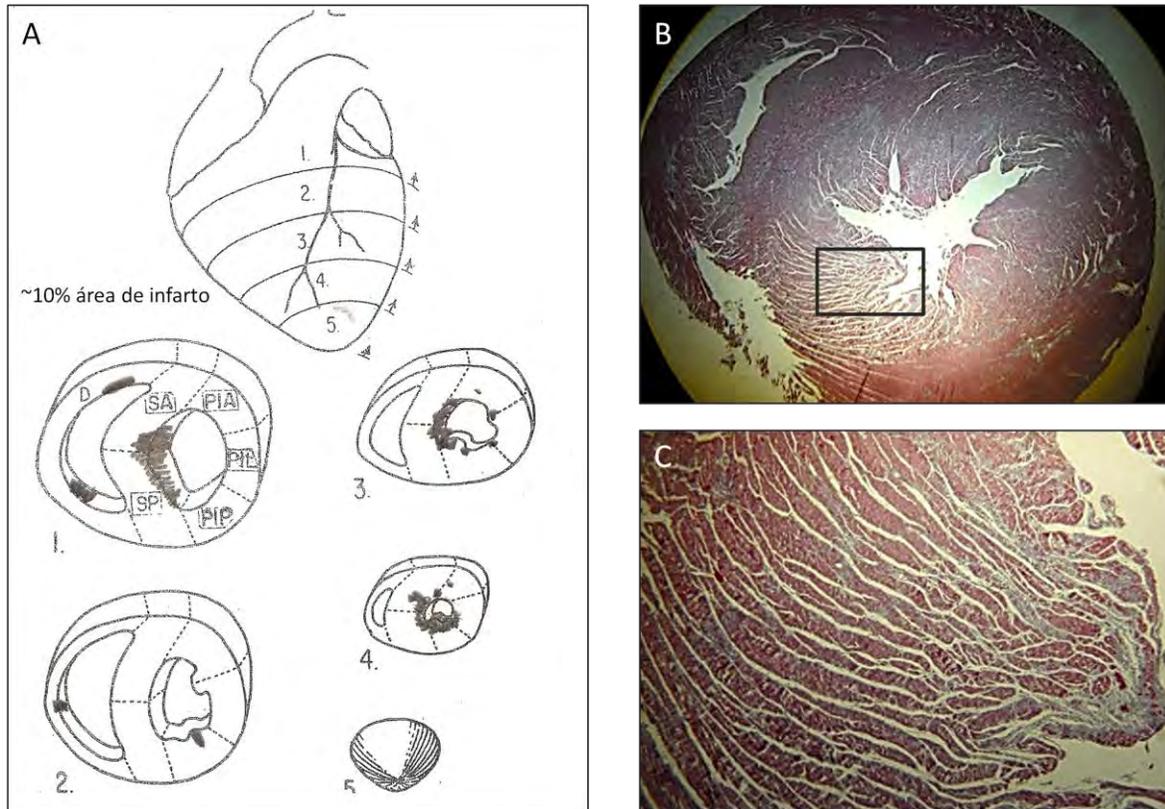


Figura 22. **Esquema y micrografías de un corazón tratado con Iso + 4IFC.** A. Se observan los cortes transversales del corazón en dónde se encuentran los focos de infarto en cada corte y que corresponden aproximadamente al 10 % de la superficie total de las rebanadas. B. Micrografía panorámica de la zona apical del corazón dónde se observa un infarto de tipo subendocardico del ventrículo izquierdo, Masson 1.5x. C. Acercamiento de la zona del ventrículo izquierdo en dónde observa la deposición de fibras de colágena de forma disminuida, Masson 10x, en comparación con las micrografías de la figura 3.

**8.2.5 Esquema y micrografías de un corazón tratado con cuatro dosis de IFC-305, histologías teñidas con tricrómica de Masson.**

**4IFC**

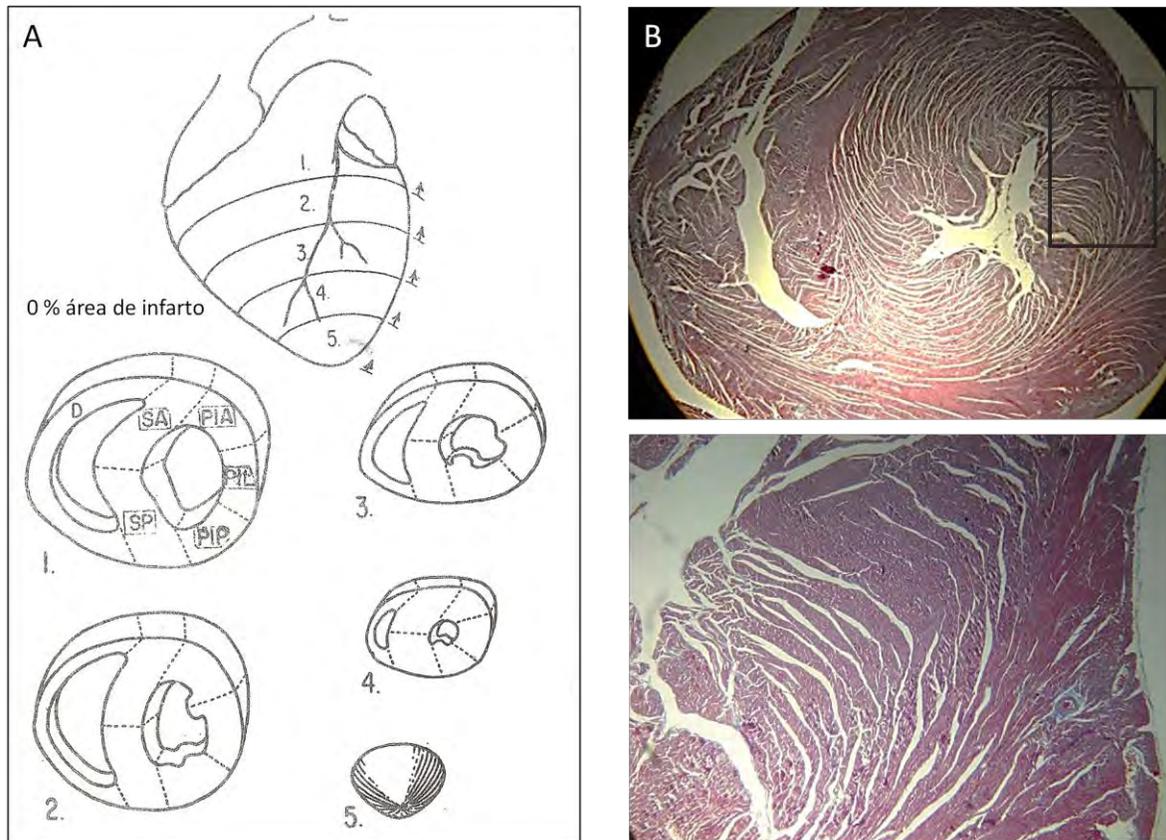


Figura 23. **Esquema y micrografías de un corazón tratado con 4IFC.** A. Se observan los cortes transversales del corazón sin focos de infarto. B. Rebanada apical completa, Masson 1.5x. C. Porción lateral del ventrículo izquierdo, Masson 2.5x.

**8.2.6 Acercamientos de cortes histológicos de cada condición, gráfica que muestra el porcentaje de la zona infartada en la etapa de remodelación cardiaca.**

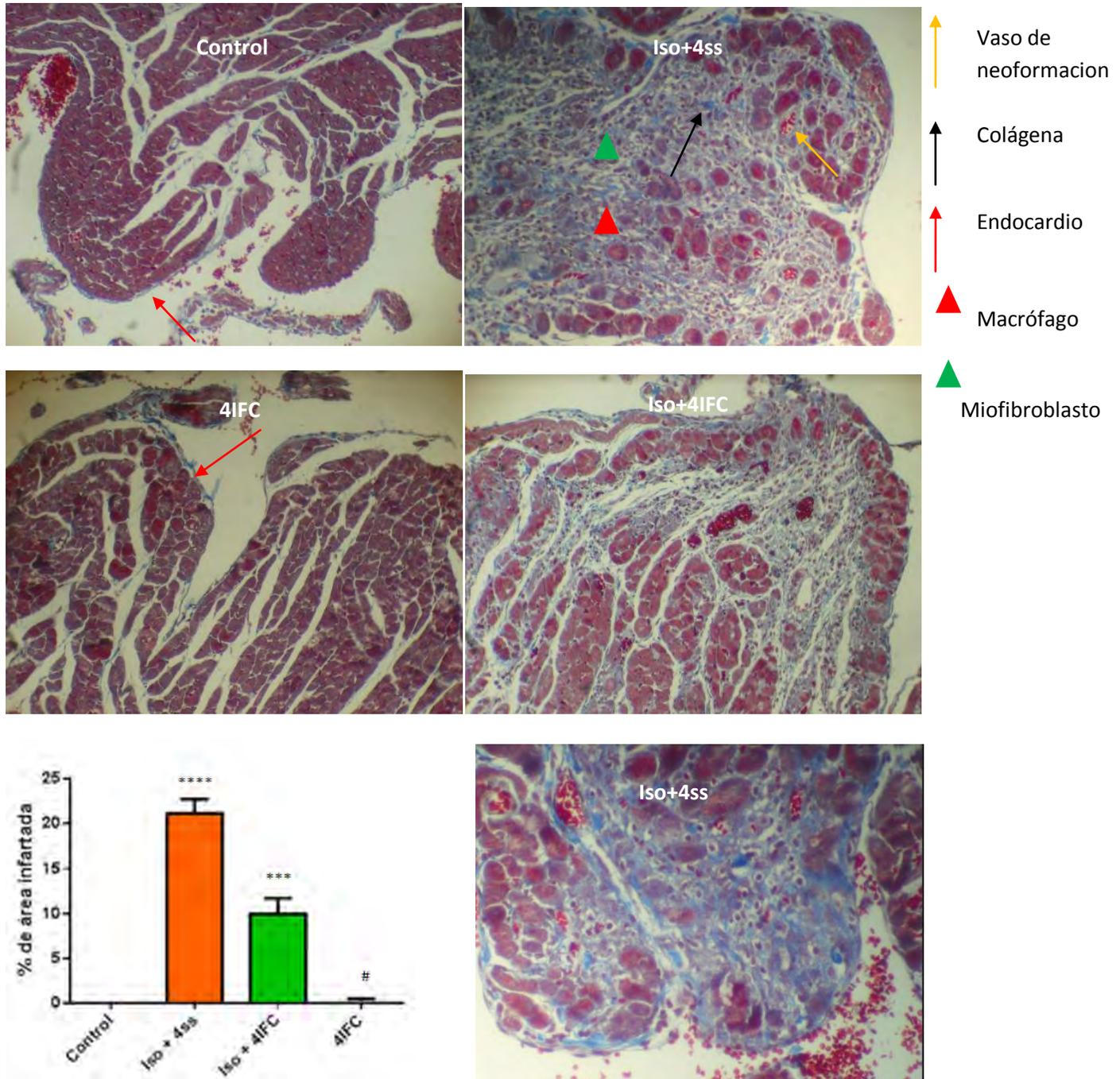
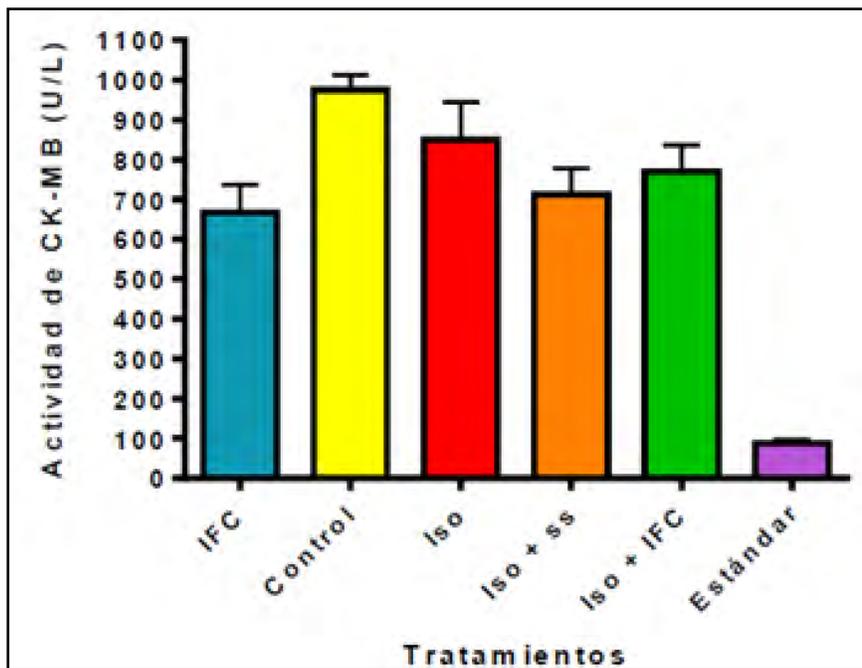


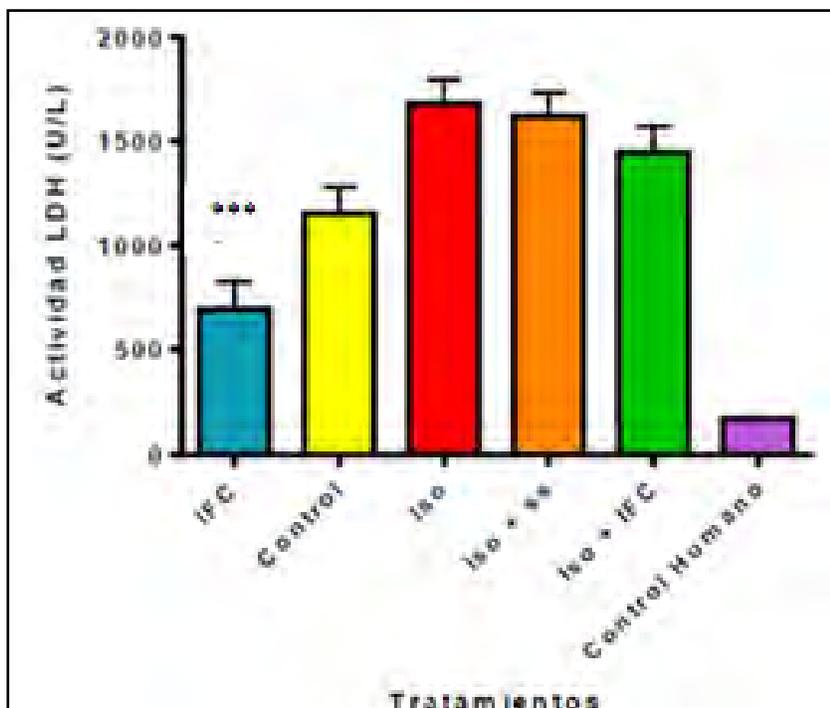
Figura 24. El compuesto IFC-305 reduce en 50% el área de infarto provocado por Isoproterenol.

Figura 24. **El compuesto IFC-305 reduce en 50% el área de infarto provocado por Isoproterenol.** Masson 2.5x, muestran los cortes transversales de la zona apical de cada condición. Se observa que con Iso + 4ss existe una alta deposición de colágena, en comparación con Iso + 4IFC en donde se observa una disminución de fibras. La gráfica muestra el porcentaje de infarto de cada condición, en donde se puede apreciar a los corazones tratados con ISO+ 4IFC, la reducción es del 50% del área de infarto, con respecto a los corazones Iso + 4ss. \*\*\*\* Diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) con respecto al control. \*\*\* Diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al control y a Iso + 4ss. # Diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) con respecto a Iso + 4ss.

### 8.3 Evaluación enzimática de CK-MB y LDH en la etapa de infarto



Gráfica 6: **Evaluación de la actividad enzimática de CK-MB a las 12 h.** Para validar el efecto de Isoproterenol, medidas a las 12 h posterior al tratamiento con Iso ( $n = 3$  ratas por grupo) (2 determinaciones por grupo).



Gráfica 7. **Evaluación enzimática de la actividad enzimática de LDH a las 12 h.** Para validar el efecto de Isoproterenol, medidas a las 12 h posterior al tratamiento con Iso (n=3 ratas por grupo) (2 determinaciones por grupo). \*\*\* Diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto a Iso + 4ss.

Estos ensayos se hicieron con el propósito de poder validar el modelo bioquímicamente en la etapa de infarto (12 h posteriores a la administración con Iso), además de evaluar el efecto del compuesto IFC-305 sobre esta actividad.

Al analizar la actividad enzimática de CK-MB, podemos observar que en la etapa de infarto se encuentra disminuida, Chagoya y colaboradores en 1997 encontraron que esta actividad llega a su pico máximo a las 3 h posterior al tratamiento con Iso, por lo tanto hay una caída de la actividad a las 12 h. Al evaluar el efecto del IFC-305 sobre esta enzima podemos encontrar que no hay una disminución de manera significativa (Gráfica 6).

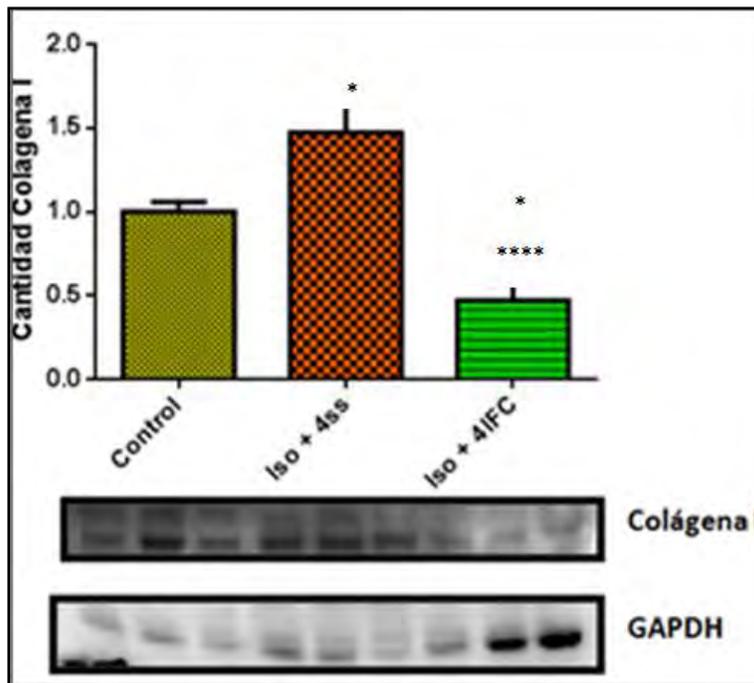
Cuando se evalúa la actividad enzimática en sueros de ratas a las cuales únicamente se les administró el compuesto IFC-305, hay una tendencia a la disminución pero no es significativa.

Con la enzima LDH se observa una tendencia al aumento, lo cual indica que efectivamente se indujo un daño cardíaco. Por otro lado cuando se evaluó el efecto del IFC-305 sobre esta actividad, se encontró que el compuesto no baja significativamente los niveles de esta.

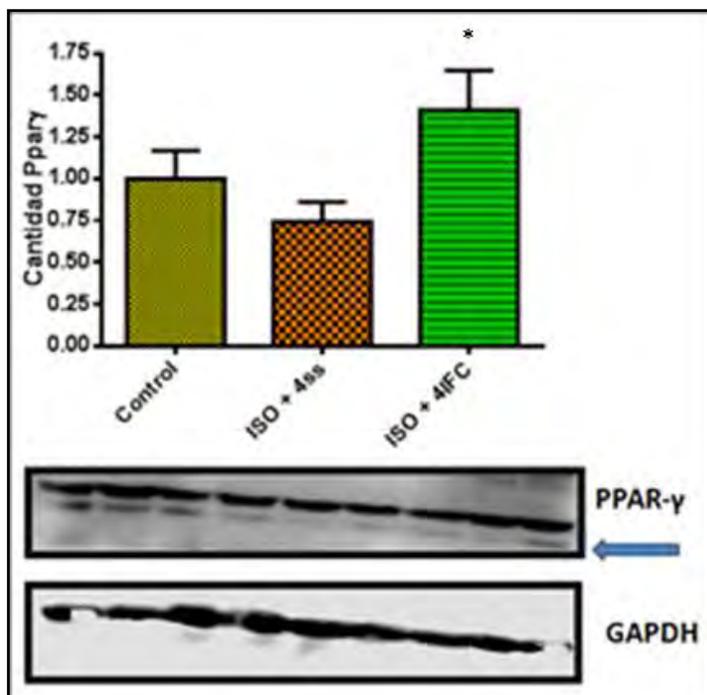
Cuando se observa la actividad enzimática de los sueros de ratas a la cuales se les administró el compuesto IFC-305, únicamente se observa una tendencia a la disminución, pero no es significativa (Gráfica 6).

Cabe mencionar, que en la evaluación de ambas enzimas se trabajaron con 2 condiciones distintas de inducción de infarto, la primera representada por barras rojas indica únicamente la administración de Isoproterenol vía s.c., la otra condición representada por barras anaranjadas indica que además de la administración de Iso vía s.c., también se administró solución salina vía i.p., como control del compuesto IFC-305, la primera condición fue utilizada por Chagoya y colaboradores en el año de 1997, cuando únicamente se llevo a cabo la caracterización del modelo, en este caso se pretende evaluar el efecto del compuesto por lo que se decidió administrar solución salina i.p. como control. Por lo tanto, es importante mencionar que se trabajó con la condición Iso+4ss, en la evaluación de cortes histológicos así como en la evaluación de niveles de proteína.

#### 8.4 Evaluación de la cantidad de colágena I y PPAR- $\gamma$ en la etapa de remodelación cardiaca.



Gráfica 8. **Evaluación de la proteína colágena I.** Mediante Western Blot a las 96 horas después de tratamiento con Isoproterenol, los resultados están normalizados contra la expresión de GAPDH (n= 3 ratas por grupo) (3 determinaciones por grupo). \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. \*\*\*\* Diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) con respecto a Iso + 4ss.



Gráfica 9. **Evaluación de la proteína PPAR-  $\gamma$** . Mediante Western Blot a las 96 horas después de tratamiento con Isoproterenol, los resultados están normalizados contra la expresión de GAPDH (n= 3 ratas por grupo) (3 determinaciones por grupo).\* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a Iso + 4ss.

En la gráfica 7 se tiene un análisis por densitometría de las proteínas colágena tipo I y PPAR- $\gamma$ , en dónde se muestran los niveles de estas evaluados por Western Blot a las 96 h posterior al tratamiento con Isoproterenol y con el tratamiento del compuesto IFC-305.

Para el caso de colágena I podemos observar que la cantidad de esta proteína en corazones infartados aumenta de manera significativa con respecto al control, y que la cantidad de esta proteína en corazones tratados con el compuesto IFC-305 disminuye de manera significativa con respecto al control e Iso+4ss.

Para el caso PPAR- $\gamma$ , podemos observar que la cantidad de esta proteína en corazones a los cuales se les administró Iso se encuentra disminuida, sin embargo esta es sólo tendencia ya que no es significativa. Por otro lado, al evaluar la cantidad de esta proteína en corazones tratados con Iso más el compuesto IFC-305 se encuentra que estos niveles aumentan de manera significativa con respecto al control e Iso+4ss.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las enfermedades cardiovasculares son en conjunto, la primera causa de muerte en nuestro país, de ellas el infarto agudo al miocardio es la de mayor prevalencia, según reporta la Organización Mundial de la Salud (Martínez-Ríos, 2014).

Después de que sucede un infarto al miocardio (IM), el ventrículo izquierdo sufre cambios moleculares, celulares, además de respuestas extracelulares que resultan en un adelgazamiento de la pared, dilatación y disfunción. Estos cambios repercuten en la forma, tamaño y función del corazón los cuales están denominados como remodelación cardíaca. Si el infarto no procede propiamente, esto podría desencadenar ruptura cardíaca y propiamente la muerte (Yutaka Matsui, 2010).

Debido a que es un problema de salud pública, es de gran importancia poder estudiar los mecanismos moleculares de esta patología de manera experimental, enfocándose en la etapa de remodelación cardíaca ya que actualmente no existe un tratamiento que permita disminuir el daño cardíaco posterior al infarto, resultando también importante el poder evaluar el compuesto IFC-305 sobre algunas proteínas que pueden regular esta remodelación.

### **Enzimología como una forma de validar el modelo de Isoproterenol.**

La ciencia de la enzimología clínica se ha desarrollado con rapidez desde sus etapas iniciales. Por tal motivo ha sido de gran utilidad para diagnosticar y tratar un gran número de enfermedades entre las cuales están las cardíacas. Las principales enzimas son la Lactato Deshidrogenasa (LDH) y creatincinasa fracción MB (CK-MB) (Shauna C. Anderson, 1992).

Se evaluó la creatincinasa fracción MB, la cual se limita exclusivamente al tejido muscular cardíaco. La elevación en los niveles de CK-MB tiene importancia clínica como ayuda de laboratorio para el diagnóstico de infarto agudo al miocardio (Shauna C. Anderson, 1992). En un trabajo publicado en el año de 1997 por la doctora Chagoya se evaluó la actividad de dicha enzima en suero de ratas tratadas con Iso y se encontró que la actividad llegaba a su pico máximo después de 3 h de tratamiento (Chagoya de Sanchez et al., 1997). En el presente trabajo dicha enzima se evaluó en la etapa de infarto y como era de esperarse la actividad se encontró disminuida en sueros de ratas a las 12 h, siendo que el tiempo de pico máximo había transcurrido (Gráfica 6). Al evaluarse la actividad en ratas que se sometieron con tratamiento de Iso más una dosis de IFC-305 se observa que este lote se encuentra disminuido, sin embargo esta no es significativo lo que indica que el compuesto no puede restaurar el grado de daño cardíaco, por lo menos a una sola dosis. Cuando se analiza el lote que se trató únicamente con IFC-305 se encuentra que los niveles de la actividad tienden a una disminución con respecto al control (Gráfica 6), esto

puede ocurrir ya que como se sabe, la adenosina aumenta la concentración de AMPc la que a su vez fosforila a la creatina, la cual es dependiente de ATP, al haber una alta concentración de IFC-305 la actividad de esta enzima disminuye, ya que si aumentara entonces habría una sobreproducción de fosfocreatina (Devlin, 2000).

En la literatura está reportado que LDH puede llegar a ser una enzima inespecífica puesto que está presente en casi todas células del cuerpo y presenta mayor actividad en cerebro, eritrocitos, leucocitos, riñón, pulmón, ganglios linfáticos, miocardio, hígado y músculo esquelético, por lo que su elevación en suero se considera no específica para cualquier enfermedad o afección (Shauna C. Anderson, 1992) . A los animales en nuestro modelo únicamente se les sometió al tratamiento con Iso y no tuvieron otro tipo de daño, se propone que la enzima en este caso puede fungir como específica. Por tal motivo, en el presente trabajo se decidió validar el modelo de Isoproterenol midiendo la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en la etapa de 12 h posterior al tratamiento con Isoproterenol. Este periodo de tiempo coincide con la etapa de infarto (Chagoya de Sanchez et al., 1997), en donde la actividad enzimática en las ratas que recibieron Iso, presenta una tendencia al incremento con respecto al control (Gráfica 6), esto nos habla de un daño ya que es indicativo de necrosis celular, por otra parte cuando se evaluó la actividad enzimática en ratas a las cuales se sometieron al tratamiento con Iso más una dosis de IFC-305 se encontró que hay una ligera disminución, la cual no es significativa, lo que posiblemente indica que el compuesto IFC-305 a una sola dosis no podría reducir el grado de daño cardiaco (Gráfica 6).

Con estos datos, se puede sugerir una evaluación de la actividad de CK-MB a las 3 h posterior a la administración de Iso, así como también la evaluación en cada una de las etapas (preinfarto, infarto y postinfarto), tanto de LDH como de CK-MB para investigar el tiempo en que cada una de ellas se elevan significativamente.

Cabe mencionar que los kits para LDH y CK-MB contenían un estándar humano (control sano) que permitió corroborar que el sistema no mostrara diferencias sistemáticas significativas.

Estrictamente las determinaciones no permitieron validar el modelo, ya las elevaciones no fueron significativas, sin embargo es importante destacar que en este trabajo también se llevaron a cabo análisis histológicos de cortes transversales de corazón que fungieron como otra forma de validación y que a continuación se describe.

## **Histología de cortes transversales de corazón para evaluar el grado de remodelación cardíaca posterior al infarto.**

La histología es una rama de la biología que estudia la estructura de los tejidos vegetales y animales permitiendo comprender su funcionamiento normal y patológico. Para ello emplea técnicas de tinción de acuerdo a la estructura que se quiera analizar, en este caso se evaluó la remodelación cardíaca observando la cantidad de colágena depositada en los ventrículos. En los cortes histológicos de corazones control y los tratados únicamente con 4 dosis del compuesto IFC-305 no se observó tejido de granulación (alta deposición de colágena tipo I, miofibroblastos, vasos de neofomación) (Figura 20) (Figura 23) , tampoco se observaron adelgazamientos de pared ventricular, y el parénquima se conservó sin alteraciones, lo que indica que el compuesto no altera la estructura cardíaca (Spadaro, 2009). El corazón al tener sobre todo una cantidad estable de colágena le da el suficiente soporte al mismo para que mantenga una forma elíptica y las condiciones mecánicas de bombeo como la presión sistólica y diastólica se mantengan de manera normal (Izhak Kehat, 2016; Yutaka Matsui, 2010).

Cuando se analizaron los corazones tratados con Isoproterenol se pudo observar una alta deposición de colágena tipo I de coloración morada, infiltrado inflamatorio, además de vasos de neoformación (Figura 21). La deposición de colágena se encontró en el miocardio, mayoritariamente alrededor del ventrículo izquierdo, lo que indica un infarto circunferencial, cabe destacar que esta deposición no solamente se encontró en este ventrículo, sino que también de manera disminuida en el ventrículo derecho. La fibrosis observada en las histologías, actúa como impedimento mecánico sistólico y diastólico, por lo que muy posiblemente en esta etapa de remodelación se pueda presentar alguna insuficiencia, por ejemplo las arritmias, estas se dan por un evento fibrótico, impidiendo que las células del miocardio no se puedan comunicar de una manera adecuada y entonces cada una de ellas funcione de manera independiente (Jack P.M. Cleujens; Monique J.A. Verluyten, 1995) (Chagoya de Sánchez et al., 1997).

En la figura 24 se muestra el porcentaje de la zona infartada en dónde podemos ver que con únicamente 4 dosis de IFC-305 se disminuye la zona de daño hasta un 50%, lo que podría indicar un efecto cardioprotector y antifibrótico del compuesto pues al disminuir la fibrosis disminuye también la insuficiencia cardíaca, y con ello, la probabilidad de una muerte súbita.

Con este antecedente, sería importante poder evaluar el efecto de este compuesto no únicamente en la etapa de remodelación, sino que en un tiempo más prolongado, lo que correspondería a una etapa de hipertrofia cardiaca ya que este fenómeno se da como un mecanismo compensatorio por el adelgazamiento de las paredes ventriculares (Figura 22) (S-L Puhl and Devaux, 2015)

Cuando se analizaron los cortes histológicos de corazones tratados con Iso más 4 dosis de IFC-305 (Figura 22), se encontró que a diferencia de los corazones tratados con el  $\beta$  adrenérgico, el porcentaje de la zona infartada disminuyó, observándose una deposición en el ventrículo izquierdo que se encontraba de manera circunferencial pero en menor grado. Esto quiere decir que el compuesto permite que la sobrecarga de trabajo y la falla cardiaca del corazón sea menor.

Como ya se sabe, el compuesto IFC-305 es un derivado de adenosina, en condiciones de infarto hay un aumento de concentración de este metabolito, ya que está reportado que es sumamente importante en el aporte energético de la célula, al haber un requerimiento energético mayor, hay un aumento en dicha molécula y por consecuencia una mayor sobrevivencia por parte de los cardiomiocitos (K. Mubagwa, 1996; Wang-Soo Lee, 2015) . El compuesto IFC-305 presenta un tiempo de vida mayor a la adenosina, lo que permite un mayor efecto en el corazón.

Este estudio permitió validar el modelo de Isoproterenol ya que se indujo un daño al miocardio, además de que permitió corroborar el efecto cardioprotector y antifibrótico del IFC-305 tras un infarto.

El siguiente punto que se aborda en este trabajo es analizar el efecto del compuesto IFC-305 sobre la colágena tipo I y PPAR- $\gamma$  en la etapa de remodelación cardiaca.

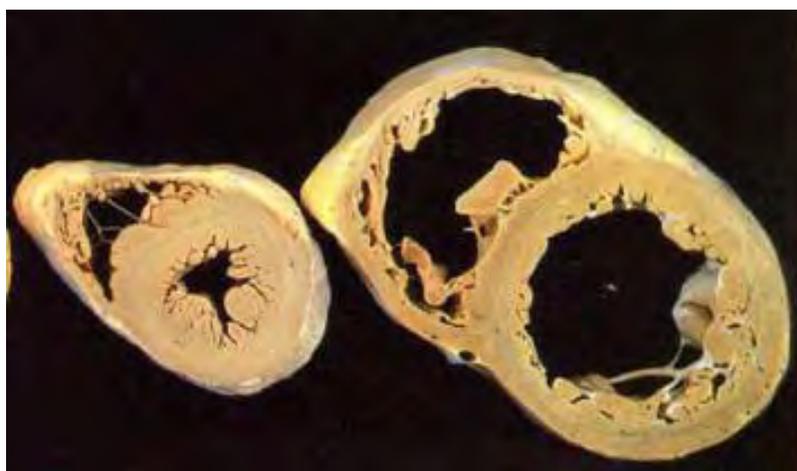


Figura 25. **Cortes transversales de corazón.** Del lado izquierdo se pueden observar ventrículos normales, del lado derecho podemos ver los ventrículos dilatados lo que nos habla de una hipertrofia cardiaca posterior al infarto (Valencia, 2007).

## **Efecto del compuesto IFC-305 sobre algunas proteínas que pueden regular la remodelación cardíaca.**

En los estudios que se realizaron mediante Western Blot para colágena I se observó que la cantidad de esta proteína en ratas a las que únicamente se sometió tratamiento con Isoproterenol está aumentada de manera significativa con respecto al control, esto en primera instancia nos arroja la presencia de fibrosis en el tejido, presente también en las histologías previamente mencionadas (Gráfica 7).

Se ha visto que el TGF- $\beta$  es una citocina fibrogénica de la matriz extracelular y que juega un papel importante en el desarrollo de fibrosis cardíaca (Martin G. St. John Sutton, 2000). Su estimulación induce la transformación de fibroblastos en miofibroblastos, que son los que enriquecen las síntesis de proteínas de la MEC, esto podría explicar el incremento significativo de la colágena I. La fibrosis está asociada con el aumento de este factor transformante que por lo tanto, contribuye a las cardiomiopatías como engrosamientos, disfunción valvular y arritmias (Buja, 2014).

Cuando se analizó la cantidad de colágena I en las ratas tratadas con Isoproterenol más 4 dosis de IFC-305 se observó que la cantidad de dicha proteína disminuyó significativamente con respecto al control y al grupo Iso + 4ss, esto concuerda con lo observado en las histologías, lo cual indica que efectivamente no hubo un daño tisular tan marcado y por lo tanto la reparación fue menor (Gráfica7).

Recientemente en el laboratorio, se midieron los niveles de RNAm de *Col1a1* por RT-qPCR en la etapa de remodelación cardíaca y el efecto del compuesto IFC-305 sobre estos, encontrándose que para las ratas a las cuales se les administró Iso, este transcrito se encuentra aumentado de manera significativa con respecto al control, lo que concuerda con el aumento de la proteína, cuando se evalúa el efecto del compuesto sobre este transcrito se puede observar una tendencia a la disminución con respecto al control, dicha disminución concuerda con lo observado en los niveles de proteína (Gráfica 3) . Existen estudios como el de Cleujens y colaboradores en 1995 en dónde se encontraron aumentos de RNAm y proteína de procolágena I a los 4 días después de la inducción de infarto en ratas que le dieron la característica de tejido de granulación (Jack P.M. Cleujens; Monique J.A. Verluyten, 1995).

La regulación de colágena no solamente depende de TGF- $\beta$ , existen mecanismos que regulan negativamente a esta molécula, se ha visto que PPAR- $\gamma$  tiene un papel en la modulación de esta proteína. Algunos estudios han reportado a los PPAR's implicados en la remodelación de matriz extracelular, estrés oxidativo, además de regulación de ciclo circadiano (Wang-Soo Lee, 2015).

Ding y colaboradores en 2007 corroboraron el papel de PPAR- $\gamma$  en fibrosis, en donde se depletó el gen para tal proteína observándose la presencia de una alta cantidad colágena I depositada en corazones knockout (tinción tricrómica de Masson) (Ding et al., 2007), este factor de transcripción regula negativamente la transcripción del gen *Col1a1*, ya que su promotor tiene un sitio de unión al factor de transcripción NF-1, el cual interacciona con una la proteína p300 y estimula la transcripción del gen. PPAR- $\gamma$  funciona como un inhibidor competitivo de p300, desplazándolo al unirse a NF-1 e inhibiendo la transcripción (Yavrom, et al, 2005)

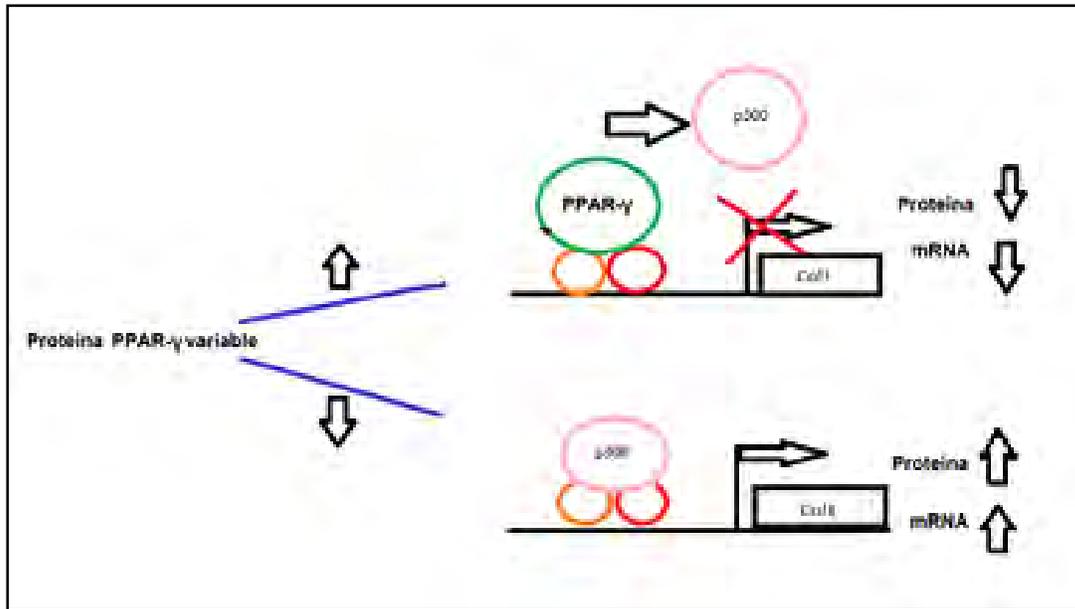


Figura 26. Mecanismo por el cual PPAR- $\gamma$  regula la expresión de Colágena I.

Cuando se analizaron los niveles de PPAR- $\gamma$  en muestras tratadas únicamente con Isoproterenol, se encontró que mostraban una tendencia a la disminución con respecto al control (Gráfica 7), por lo que existe una posibilidad de que no únicamente PPAR-esté regulando a la colágena, posiblemente TGF- $\beta$  y Angiotensina II estén regulando positivamente la expresión de esta proteína, además de inducir la transdiferenciación de los fibroblastos. Cuando se evaluaron los niveles de PPAR- $\gamma$  en ratas tratadas con Isoproterenol más 4 dosis de IFC-305 se encontró un incremento significativo de esta proteína con respecto al grupo Iso + 4ss (Gráfica 7), lo que indica que en este grupo, es posible que colágena I esté siendo regulada negativamente por este factor de transcripción, ya que al disminuir la zona de necrosis la presencia de daño es menor y por consiguiente la expresión de la proteína profibrogénica disminuye.

Chagoya y colaboradores en el 2015 evaluaron la expresión de RNAm de *Pparg* por RT-qPCR en la etapa de remodelación cardíaca además del efecto del compuesto sobre estos transcritos, en corazones únicamente tratados con Isoproterenol, se encontró una disminución significativa con respecto al control lo que concuerda con la tendencia a la disminución de la proteína (Gráfica 4), al evaluarse el efecto del compuesto se encuentra una tendencia al aumento, este aumento también lo presenta la proteína sólo que en este caso este aumento si es significativo (Murillo-de- Ozoires, comunicación personal).

En la matriz extracelular, existen una gran cantidad de proteínas capaces de regular la comunicación entre célula-célula, pero también existen aquellas, como la colágena, que tienen la función de conferir soporte y elasticidad al corazón, por lo tanto resultó de gran importancia poder evaluar el efecto del compuesto sobre esta proteína además de un correpresor muy importante como lo es PPAR- $\gamma$ . Esto nos permitió corroborar el efecto antifibrótico del compuesto en la etapa de remodelación cardíaca.

## 10. CONCLUSIONES.

1. Se validó el modelo de Isoproterenol, mediante estudios enzimáticos de LDH y CK-MB, medidas en la etapa de infarto esto es, a las 12 h.
2. Se validó el modelo de Isoproterenol, mediante estudios histopatológicos de cortes transversales de la zona apical del corazón a las 96 h después del tratamiento con Iso.
3. Se comprobó el efecto cardioprotector del compuesto IFC-305, al disminuir el grado de daño en un 50% en cortes histológicos.
4. El compuesto disminuye los niveles de colágena I en tejido cardiaco a las 96 h.
5. El compuesto aumentó los niveles del factor de transcripción PPAR- $\gamma$  en tejido cardiaco a las 96 h, que concuerda con la disminución de la colágena I.
6. Con los datos que se tienen es posible que el efecto antifibrogénico esté sustentado por la disminución de colágena I y aumento del factor de transcripción PPAR- $\gamma$ .

## 11. PERSPECTIVAS

Debido a que existen diferentes proteínas que regulan el proceso fibrogénico en el corazón sería importante el poder evaluarlas, tales como TGF- $\beta$  ya que se sabe que esta vía se activa durante este proceso.

Sabiendo que el compuesto presenta propiedades antifibrogénicas, el siguiente punto sería poder dilucidar el mecanismo de acción por el cual el compuesto ejerce su acción.

Sería de gran interés el poder evaluar el efecto del compuesto durante un periodo de tiempo más prolongado.

## 12 REFERENCIAS.

- Bodh I. Jugdutt, M. (2003). Ventricular Remodeling After Infarction and the Extracellular Collagen Matrix When Is Enough Enough? *Circulation* 108, 1395- 1403.
- Buja, A.M.S.O.H.F.L.M. (2014). *Fibrosis and heart failure*. Springer 19, 173-185.
- Carrera, M.V. (2002). Receptores activados por proliferadores peroxisómicos y aterosclerosis. *Clin Invest Arterioscl* 6, 297-308.
- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Lopez-Barrera, F., Yanez, L., Vidrio, S., Suarez, J., Cota-Garza, M.D., Aranda-Fraustro, A., and Cruz, D. (1997). Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol* 75, 1300-1311.
- Devlin, T.M. (2000). *Bioquímica, Primera edn* (Barcelona).
- Ding, G., Fu, M., Qin, Q., Lewis, W., Kim, H.W., Fukai, T., Bacanamwo, M., Chen, Y.E., Schneider, M.D., Mangelsdorf, D.J., *et al.* (2007). Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res* 76, 269-279.
- En Li, Y.Z. (2014). *DNA Methylation in Mammals*. Cols Spring Harbor Perspectives in Biology 6, 1-21.
- Fuster V., et al., (1997), "Aterosclerosis y enfermedad de arteria coronaria", Ed. Springer- Verlag Ibérica, Filadelfia Nueva York, 1325 pp.
- Gartner, J.L.H. (2011). *Histología Básica, primera edn* (Barcelona).

- Gerhard Thews, E.M., Peter Vaupel (1983). Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre manual para farmacéuticos y biólogos., primera edición edn (Barcelona).
- Guzmán, D.J.P.y.N.A. (1981). El colágeno. Educación médica continuada 1, 53-63.
- Hamm Christian, S. Willems (2007), " El electrocardiograma: Su interpretación práctica Ed. Médica Panamericana, Madrid España, 207pp.
- Izhak Kehat, M., PhD; Jeffery D. Molkenin, PhD (2016). Molecular Pathways Underlying Cardiac Remodeling During Pathophysiological Stimulation. Circulation 122, 2727-2735.
- Jack P.M. Cleujens; Monique J.A. Verluyten, J.F.M.S.a.M.J.A.P.D. (1995). Collagen Remodeling after Myocardial Infarction in the Rat Heart. American Journal of Pathology, 147, 325-338.
- K. Mubagwa, K.M., 'W. Fkneng (1996). Role of adenosine in the heart and circulation. ELSEVIER 32, 797-813.
- Luisa Martínez-Aguilar, P., \*† Diego Lezama-Martínez, BD,\*‡ Nancy V. Orozco-Cortés, MD,\*‡, Claudia González-Espinosa, P., § Jazmin Flores-Monroy, PhD,\*‡ and, and Ignacio Valencia-Hernández, P. (2016). Antihypertensive Properties of a Novel Morphologic Derivative (4-tert-butyl-2,6-bis(thiomorpholine-4-ylmethyl)phenol). J Cardiovasc Pharmacol 67, 6.
- Martin G. St. John Sutton, M., FRCP; Norman Sharpe, MD, FRACP (2000). Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. Clinical Cardiology: New Frontiers 101, 2981- 2988.

- Martínez-Pérez, L. (2004). Estudio de los genes involucrados en la remodelación de tejido cardíaco durante el infarto experimental inducido con isoproterenol en ratas. In *Biología Celular*, Instituto de Fisiología Celular (México: Universidad Nacional Autónoma de México)
- Murillo-de-Ozores, A.R., and Chagoya-de-Sánchez, V. (2015). Cambios epigenéticos en un modelo de infarto al miocardio inducido por isoproterenol y efecto cardioprotector del derivado de adenosina, IFC-305 (Informe de Rotación de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).
- Perez-Carreón, J.I., Martínez-Pérez, L., Loredó, M.L., Yáñez-Maldonado, L., Velasco-Loyden, G., Vidrio-Gómez, S., Ramírez-Salcedo, J., Hernández-Luis, F., Velázquez-Martínez, I., Suárez-Cuenca, J.A., *et al.* (2010). An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 287-296.
- S-L Puhl, A.K., A Müller, P Fries, D RWagner, M Böhm,, and Devaux, C.M.a.Y. (2015). Adenosine A1 receptor activation attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in response to  $\alpha$ 1-adrenoceptor stimulation in vivo. *British Journal of Pharmacology* 173, 88-102.
- Santaló Bel Miguel, G.S.J., Ordóñez Llanos Jordi (2003). Marcadores biológicos de necrosis miocárdica. *Revista Española de Cardiología* 56.
- Shafy, A., Molinie, V., Cortes-Morichetti, M., Hupertan, V., Lila, N., and Chachques, J.C. (2012). Comparison of the effects of adenosine, inosine, and their combination as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction. *ISRN Cardiol* 2012, 326809.
- Shauna C. Anderson, P.D., Susan Cockayne, Ph.D. (1992). *Química Clínica*, Primera edn (Estado Unidos).

- Silverthorn, D.U. (2009). *Fisiología: Un enfoque integrado*, 4a edn (Buenos Aires).
- Spadaro, L.A.M.Z.S.A.R.P.D.R.D.J. (2009). Remodelación ventricular postinfarto de miocardio: conceptos e implicaciones clínicas. *Arq Bras Cardiol* 92.
- Suárez, C.B.d. (1998). Patología cardiovascular adquirida de las principales enfermedades en nuestro medio, U.C.V., and C.d.D.C.y. Humanístico, eds. (Venezuela), pp. 285.
- Tortora, G.J. (2015). *Principios de Anatomía y Fisiología Humana* 13 edn (Madrid, España).
- Towbin H, S.T., Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. . *PNAS* 76, 4350-4354.
- Wang-Soo Lee, J.K. (2015). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Heart: Lessons from the Past and Future Directions. *PPAR Research* 2015, 18.
- Yavrom, S., Chen, L., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R.A., and Tsukamoto, H. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses proximal alpha1(I) collagen promoter via inhibition of p300-facilitated NF- $\kappa$ B binding to DNA in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 280, 40650-40659.
- Yutaka Matsui, J.M., Toshimitsu Uede (2010). Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World Journal of W J B C Biological Chemistry* 1, 69-80.

## Apéndice 1: Preparación de soluciones

- Tratamiento de animales de laboratorio.

|                 |   |
|-----------------|---|
| Isoproterenol   | 44.6mg/mL   |
| IFC-305         | Disolver 1g del compuesto en 50mL de solución salina. |
| Solución salina | Vehículo cbp  |

- Determinación del comportamiento de algunas proteínas que participan en la remodelación cardíaca posterior al infarto.

|                                    |   |         |
|------------------------------------|---|---------|
| Acrilamida 30%                     | Disolver 29g de acrilamida y 1g de N,N'-methilenbisacrilamida en un volumen total de 60mL de agua. Calentar la solución a 37°C para disolver las sustancias. Verificar que el pH de la solución sea igual o menor a 7.0. Almacenar en frasco ámbar a 4°C. |         |
| Gel separador de poliacrilamida 8% | Para 10mL   |         |
|                                    | Agua  | 4.0mL   |
|                                    | Acrilamida 30%  | 3.3mL   |
|                                    | Tris (pH 8.8) 1.5M  | 2.5mL   |
|                                    | SDS 10%   | 0.1mL   |
|                                    | Persulfato de amonio 10%  | 0.1mL   |
|                                    | TEMED   | 0.004mL |
| Gel concentrador de poliacrilamida | Para 3mL  |         |
|                                    | Agua  | 1.72mL  |
|                                    | Acrilamida 30%  | 0.5mL   |
|                                    | Tris (pH 6.8) 0.5M  | 0.76mL  |
|                                    | SDS 10%   | 0.03mL  |
|                                    | Persulfato de amonio 10%  | 0.03mL  |
|                                    | TEMED   | 0.003mL |
| Amortiguador de muestra 4x         | Para 10mL   |         |
|                                    | Tris-HCl 1mol/L pH 6.8  | 2.0mL   |
|                                    | 2-mercaptoetanol  | 1.6mL   |
|                                    | SDS 10%   | 4.0mL   |
|                                    | Azul de bromofenol  | 0.02g   |
|                                    | Glicerol  | 2.0mL   |
|                                    | Agua destilada estéril cbp  | 10mL    |
| Amortiguador de corrida 10%        | Glicina   | 144g    |
|                                    | Tris-base   | 30g     |
|                                    | SDS 10%   | 100mL   |

|   |  |                                 |
|---|--|---------------------------------|
|   | Agua destilada estéril cbp   | 100mL                           |
| Amortiguador de transferencia           | Para 1L<br>Glicina<br>Tris-base<br>Metanol<br>Agua desionizada cbp | 2.9g<br>5.8g<br>200mL<br>1000mL |
| TBS 10x                                 | Para 1L<br>Tris-HCl pH 7.5<br>NaCl<br>Agua desionizada cbp         | 200mL<br>282g<br>1000mL         |
| TTBS 1x                                 | Para 1L<br>TBS 10x<br>Tween 20<br>Agua desionizada cbp             | 100mL<br>500µL<br>1000mL        |
| Amortiguador de <i>stripping</i> pH 2.2 | Para 500mL<br>Glicina<br>SDS<br>Tween 20<br>Agua desionizada cbp   | 7.5g<br>0.5g<br>5.0mL<br>500mL  |

## ANEXO 1: ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Creatincinasa fracción MB (CK-MB).

| Método de Tukey para comparaciones múltiples | Significancia |
|--|---------------|
| IFC vs Control                               | No            |
| IFC vs Iso                                   | No            |
| IFC vs Iso + ss                              | No            |
| IFC vs Iso + IFC                             | No            |
| IFC vs Estándar                              | Si **         |
| Control vs Iso                               | No            |
| Control vs Iso + ss                          | No            |
| Control vs Iso + IFC                         | No            |
| Control vs Estándar                          | Si *****      |
| Iso vs Iso + ss                              | No            |
| Iso vs Iso + IFC                             | No            |
| Iso vs Estándar                              | Si *****      |
| Iso + ss vs Iso + IFC                        | No            |
| Iso + ss vs Estándar                         | Si ***        |
| Iso + IFC vs Estándar                        | Si *****      |

Lactato Deshidrogenasa (LDH).

| Método de Tukey para comparaciones múltiples | Significancia |
|--|---------------|
| IFC vs Control                               | No            |
| IFC vs Iso                                   | Si ***        |
| IFC vs Iso + ss                              | Si ***        |
| IFC vs Iso + IFC                             | Si **         |
| IFC vs Estándar                              | No            |
| Control vs Iso                               | No            |
| Control vs Iso + ss                          | No            |
| Control vs Iso + IFC                         | No            |
| Control vs Estándar                          | Si **         |
| Iso vs Iso + ss                              | No            |
| Iso vs Iso + IFC                             | No            |
| Iso vs Estándar                              | Si *****      |
| Iso + ss vs Iso + IFC                        | No            |
| Iso + ss vs Estándar                         | Si *****      |
| Iso + IFC vs Estándar                        | Si *****      |

Porcentaje de infarto

| <b>Método de Tukey para comparaciones múltiples</b> | <b>Significancia</b> |
|---|----------------------|
| Control vs Iso + 4ss                                | Si *****             |
| Control vs Iso + 4IFC                               | Si ***               |
| Control vs 4 IFC                                    | No                   |
| Iso + 4ss vs Iso + 4IFC                             | Si ***               |
| Iso + 4ss vs 4IFC                                   | Si *****             |
| Iso + 4IFC vs 4IFC                                  | Si ***               |

Receptores Activados por Proliferadores Peroxisómicos (PPAR-γ)

| <b>Método de Tukey para comparaciones múltiples</b> | <b>Significancia</b> |
|---|----------------------|
| Control vs Iso + 4ss                                | No                   |
| Control vs Iso + 4IFC                               | No                   |
| Iso + 4ss vs Iso+ 4IFC                              | Si *                 |

Colágena tipo I

| <b>Método de Tukey para comparaciones múltiples</b> | <b>Significancia</b> |
|---|----------------------|
| Control vs Iso + 4ss                                | Si *                 |
| Control vs Iso + 4IFC                               | Si *                 |
| Iso + 4ss vs Iso + 4IFC                             | Si *****             |