



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA VIA PI3K-AKT EN EL CORAZÓN DE
RATONES TRATADOS CON EPICATEQUINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

VIRIDIANA GARCÍA PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesora: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez.

VOCAL: Profesor: Euclides Avila Chávez.

SECRETARIO: Profesor: Ramón Mauricio Coral Vázquez.

1ER SUPLENTE: Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez.

2DO SUPLENTE: Profesora: Aurora Lara Núñez.

El presente trabajo fue realizado en la División de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado (ISSSTE).

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

ASESOR

Dr. Sergio De los Santos Enriquez.

SUPERVISOR TÉCNICO

Viridiana García Pérez

SUSTENTANTE

Splenderanno... Per aspera ad astra...

Haggard.

I won't give up, we'll fight to win to move along from where we'd been, I'm looking up around the bend... We're so much stronger than before

Epica.

Now we see our tomorrow, the night is long ago, all the fighting is over...But the dream is still alive.

Xandria.

Now I'm leaving my worries behind, feel the freedom of body and mind I have started my journey. I'm drifting away with the wind I go...

Stratovarius.

There's no sign of the morning coming, there's no sight of the day You've been left on your own... like a Rainbow in the Dark.

Dio.

How can life be so feigned and cold. I've answered the call of every melody, lovingly. Did I find the answers to all my questions? Or a gravenimage of me...

Sonata Arctica.

So understand, don't waste your time always searching for those wasted years Face up...make your stand, and realize you're living in the golden years

Iron Maiden

Te he dicho que no mires atrás porque el cielo no es tuyo y hay que empezar despacio a deshacer el mundo.

Héroes del Silencio.

Hay miedos que se acurrucan entre uno y otro escalón de la escalera que sube de tus sueños hacia el sol, y te acechan y no dejan que tú elijas tu lugar, no queda sino batirnos no queda sino luchar...

Mägo de Oz

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RELACIÓN DE FIGURAS	9
RELACIÓN DE TABLAS	10
RESUMEN	11
Capítulo 1	
1. Introducción.....	12
1.1. Hipertrofia Cardíaca.....	12
1.2. Diferencias moleculares entre la HCP y la HCF.	14
1.2.1. Hipertrofia Cardíaca Patológica (HCP).	14
1.2.2. Hipertrofia Cardíaca Fisiológica (HCF).	16
1.3. Vías de señalización implicadas en el desarrollo de la HC.	17
1.3.1. HCP; vía de las MAPK.....	18
1.3.2. HCF; vía PI3K-AKT.....	18
1.4. Importancia de la vía PI3K-AKT en el desarrollo de HCF.	21
1.5. La vía PI3K- AKT.....	23
1.6. Activación de la vía PI3K-AKT en el endotelio.	24
1.7. Epicatequina	25
Capítulo 2	
2. Planteamiento del Problema.....	27
Capítulo 3	
3. Hipótesis.....	28
Capítulo 4	
4. Objetivos.	29
4.1. Objetivo General.....	29

4.2. Objetivos específicos.....	29
Capítulo 5	
5. Materiales.....	30
5.1. Animales.....	30
5.1.1. Selección de ratones.....	31
5.1.2. Tratamiento.....	31
5.1.3. Obtención de corazones.....	31
5.2. Anticuerpos.....	32
5.2.1. Primarios.....	32
5.2.2. Secundario.....	32
5.3. Epicatequina.....	33
Capítulo 6	
6. Metodología.....	34
6.1. Tratamiento de ratones con Epi.....	34
6.2. Extracción de proteínas totales de corazón de los ratones.....	34
6.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	35
6.4. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
6.5. Transferencia a membrana de nitrocelulosa en sistema húmedo.....	35
6.6. Caracterización de proteínas por ensayos de Western Blot.....	36
Capítulo 7	
7. Resultados.....	38
7.1. Obtención de los corazones de los ratones tratados y no tratados con Epi. 38	
7.2. Obtención de la relación peso corazón/ peso corporal.....	39

7.3. Obtención de un extracto de proteínas totales de los corazones de ratones tratados y no tratados con Epi y transferencia a la membrana de nitrocelulosa. 42

7.4. Evaluar la concentración de las proteínas involucradas en la vía PI3K-AKT. 43

Capítulo 8

8. Discusión de resultados..... 45

Capítulo 9

9. Conclusiones..... 47

Capítulo 10

10. Referencias 48

ABREVIATURAS.

AKT	Proteína cinasa B
ANG II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético auricular
APS	Persulfato de amonio
AT₁	Receptor de angiotensina 1
BNP	Péptido natriurético cerebral
BSA	Albumina sérica bovina
caPI3K	Ratón mutante constitutivamente activo para PI3K
dnPI3K	Ratón mutante dominante negativo para PI3K
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
Epi	Epicatequina
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 Y 2
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
HC	Hipertrofia cardiaca
HCF	Hipertrofia cardiaca fisiológica
HCP	Hipertrofia cardiaca patológica
HTA	Hipertensión arterial
IGF	Factor de crecimiento análogo a insulina
IGFR-1	Receptor de factor de crecimiento análogo a insulina 1
IR	Receptor de insulina
IRS	Receptor de insulina fosforilado
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
MEK	Proteína cinasa MEK
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NFAT	Factor nuclear de activación de células T
NO	Óxido nítrico
P70S6K	Cinasa de la proteína ribosomal S6
PBS	Amortiguador de fosfatos

PBS-T	Amortiguador de fosfatos con tween 20
PHO- mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero fosforilada
PHO-AKT	PKB fosforilada
PHO-P70S6K	P70S6K fosforilada
PHO-PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa fosforilada
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PIP3	Fosfoinositol 3 fosfato
PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
PKD1	Proteína cinasa D 1
PLC	Fosfolipasa c
RIPA	Amortiguador de lisis para radioinmunoprecipitación.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
β-MHC	Cadena pesada de beta miosina

RELACIÓN DE FIGURAS.

Figura 1 Vías de señalización activadas por la fosforilación del IR.	20
Figura 2 Corazones de ratones transgénicos.	21
Figura 3 Corazones de ratones mutantes dnPI3K sometidos a estímulos generadores de hipertrofia.	22
Figura 4 La vía PI3K-AKT, se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de HCF..	23
Figura 5 Estructura de la molécula de Epi.....	25
Figura 6 Casete de transferencia de proteínas.....	36
Figura 7 Impacto de la Epi en el crecimiento del corazón..	38
Figura 8 El consumo de Epi no afecta al peso corporal.	41
Figura 9 La Epi causa HC en ratones sanos.	41
Figura 10 Integridad de proteínas.....	42
Figura 11 Activación de la vía PI3K-AKT por el consumo de Epi.	44

RELACIÓN DE TABLAS.

Tabla 1 Características de cada tipo de HC.....	13
Tabla 2 Diluciones y tiempos de incubación de Ab.....	37
Tabla 3 Pesos corporales y de los corazones de los ratones Ctr y Epi, durante el tratamiento.	40

RESUMEN.

En la actualidad diversas publicaciones han clasificado a la Hipertrofia Cardíaca (HC) en dos tipos diferentes: Hipertrofia Cardíaca Patológica (HCP) e Hipertrofia Cardíaca Fisiológica (HCF). La HCP se caracteriza por la presencia de fibrosis intersticial, la expresión de genes embrionarios, además de que es irreversible y se asocia a una función anormal del corazón, mientras que en la HCF no hay presencia de fibrosis intersticial, se cree que es reversible y la función del corazón no está comprometida.

En estudios recientes se ha señalado que la vía de señalización PI3K-AKT se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento del corazón generando un tipo de HCF al ser activada por factores hormonales como la insulina y la angiotensina, sin embargo se ha demostrado que dicha vía también puede ser activada por compuestos orgánicos como el flavonoide Epicatequina (Epi), el cual ha sido utilizado en experimentos de cultivos de células endoteliales de aorta coronaria y cordón umbilical de humanos, en donde se ha mostrado un incremento en la fosforilación de las proteínas que componen esta vía en ambos tipos de células, a raíz de esto se ha sugerido que Epi puede tener un efecto cardioprotector.

En el presente trabajo evaluamos el efecto de la Epi en el corazón, utilizando 20 ratones de la cepa C1, los cuales fueron divididos en 2 grupos (Epi y Ctr) y sometidos a tratamiento durante dos semanas con Epi vía intragástrica cada 12 h. Los resultados mostraron un incremento en el tamaño de los corazones del grupo tratado con Epi, acompañado del aumento en la fosforilación de las proteínas que integran la vía de señalización PI3K-AKT. Estos resultados sugieren que el flavonoide Epi también activa esta cascada de señalización en el corazón de los ratones utilizados.

Capítulo 1

1. Introducción.

1.1. Hipertrofia Cardíaca.

El corazón es uno de los órganos más importantes del cuerpo. Está situado en el tórax por detrás del esternón, delante del esófago y descansa sobre el diafragma que separa la cavidad torácica y abdominal.¹ Su función más importante es bombear sangre a todos los órganos del cuerpo; sin embargo, cuando hay una sobrecarga hemodinámica las paredes de los ventrículos tienden a dilatarse o aumentar su grosor, a este padecimiento se le ha llamado hipertrofia cardíaca (HC).

En los últimos años la HC ha tomado mayor relevancia en el mundo, ya que ha aumentado el número de individuos que la padecen o ha sido causa de fallecimiento por muerte súbita en atletas de alto rendimiento, por ello la Organización Mundial de la Salud la ha designado con el término de Cardiomiopatía Hipertrófica (CMH), que describe a la enfermedad como un proceso de aumento de la masa muscular cardíaca, que puede existir con o sin obstrucción dinámica en el tracto de salida del ventrículo izquierdo.² La CMH se ha interpretado como una respuesta adaptativa del miocardio frente a un requerimiento hemodinámico; entre algunos de los agentes causales identificados se encuentran el embarazo, el ejercicio vigoroso y enfermedades como la aterosclerosis, la hipertensión arterial, la diabetes y la obesidad entre otras.³

La hipertrofia es el producto de una serie de cambios estructurales del corazón a nivel de los miocitos ante un nuevo requerimiento hemodinámico. Dependiendo del tipo de estímulo que reciba el miocardio se han clasificado dos tipos de hipertrofia, la hipertrofia cardíaca patológica (HCP) y la hipertrofia cardíaca fisiológica (HCF).

La HCP se desarrolla en respuesta a estímulos derivados de enfermedades primarias como es en el caso de la hipertensión arterial (HTA). Este tipo de HC se caracteriza por la presencia de fibrosis intersticial, una función cardíaca anormal,

la expresión de genes embrionarios, así como la represión de genes que se expresarían en un corazón adulto sano. Esto genera, en la mayoría de las ocasiones, una hipertrofia excéntrica en el miocardio,⁴ en la cual las unidades de proteínas contráctiles se disponen en series, predominando un crecimiento longitudinal sobre el espesor.

Por otro lado, cuando hay un aumento del espesor de la pared ventricular, consecuencia de la sobrecarga hemodinámica causada por el embarazo o por la práctica de actividad física intensa, la adaptación del miocito se caracteriza por un aumento de su tamaño con un incremento proporcional generando una HCF. Esta se caracteriza a nivel celular por un aumento armónico del ancho y largo de los miocitos, produciendo generalmente una hipertrofia concéntrica en respuesta a una sobrecarga de presión^{4, 5}.

Es importante mencionar que las formas fenotípicas de hipertrofia (concéntrica y excéntrica) se pueden presentar en ambos tipos de hipertrofia, ya sea HCP ó HCF. En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran las características más significativas de cada tipo de hipertrofia.

Tabla 1 Características de cada tipo de HC.

Patológica (HCP)	Fisiológica (HCF)
<ul style="list-style-type: none"> • Fibrosis intersticial. • Función cardíaca anormal. • Expresión de genes embrionarios, reprimiéndose genes que se expresan normalmente en adulto. • Irreversible 	<ul style="list-style-type: none"> • No hay fibrosis intersticial • Función cardíaca normal. • Sin expresión de genes embrionarios. • Reversible

Aunque inicialmente la HCF constituye una respuesta compensatoria que normaliza transitoriamente el estrés biomecánico y optimiza la función de la bomba cardíaca, su continuidad prolongada es un factor de riesgo para el

desarrollo de insuficiencia cardiaca, ya que va acompañada de muchas formas de cardiopatía, incluida la enfermedad isquémica, la HTA y las valvulopatías.⁵

1.2. Diferencias moleculares entre la HCP y la HCF.

En la última década se ha establecido que los cardiomiocitos no entran en el ciclo celular, por lo que muchas de las vías de señalización intracelular que se encargan de regular la proliferación celular en otros tipos celulares, en el miocito modulan el crecimiento hipertrófico.^{6, 7} Así mismo, se ha observado que hay una expresión de genes específica para cada tipo de hipertrofia, fisiológica o patológica, que se ve reflejada en cambios fenotípicos.⁸

Los cambios en el fenotipo celular a nivel molecular se generan por la unión de neurotransmisores (respuesta neurohumoral) y/o la liberación de factores de crecimiento o de algunas citocinas. Estos generalmente desencadenan su efecto a través de la activación de vías de señalización inducidas por diferentes tipos de estímulos que son responsables del desarrollo de la respuesta hipertrófica.⁴ De esta forma se promueve la expresión de receptores de membrana, entre los cuales se encuentran los receptores acoplados a proteínas G y los receptores tipo tirosina-quinasas, que a su vez se encuentran asociados a un grupo particular de proteínas que activan diferentes rutas metabólicas intracelulares.⁶

1.2.1. Hipertrofia Cardiaca Patológica (HCP).

En circunstancias normales existe una fina red de fibras de colágeno que rodea a los cardiomiocitos proporcionándoles sostén para mantener la organización de las células; en respuesta a un estímulo patológico, los fibroblastos cardíacos y las proteínas de la matriz extracelular se acumulan de forma excesiva, lo que provoca la rigidez mecánica, que ocasiona disfunción diastólica. Lo anterior se ha

relacionado con el aumento de la fibrosis intersticial, que es inducida principalmente por padecimientos como son la HTA, o una estenosis aórtica.⁹

Empleando modelos murinos se han investigado las diferencias entre la HCP y la HCF. Al respecto, se han generado modelos de HCP mediante la inducción de una sobrecarga ventricular izquierda a través de la constricción de la aorta. Mediante este estímulo se observó la liberación de algunas hormonas y/o neurotransmisores que mediaron la respuesta al estímulo patológico y que tuvieron un papel importante en el desarrollo de la HCP.¹⁰ Estas proteínas, que son ligandos de receptores acoplados a proteínas Gq, pueden inducir hipertrofia en los miocardiocitos por medio de la dislocación de su subunidad α que activa vías de señalización cascada abajo. Esto se determinó mediante el empleo de ratones carentes de proteínas Gq, que fueron sometidos a una sobrecarga de presión hemodinámica mediante la constricción quirúrgica de la aorta^{11, 12}. De esta forma se observó que en los ratones carentes de proteínas Gq se desarrolló una hipertrofia ventricular menos intensa con respecto a los animales control, lo cual demostró que las proteínas Gq juegan un papel importante en el desarrollo de la HCP¹³.

También se ha descrito que la HCP va acompañada de una reinducción del llamado «programa fetal», es decir, existe una reprogramación de la expresión de genes fetales que son inhibidos en individuos adultos. Estos procesos conducen a la activación de los oncogenes tempranos que codifican para las proteínas jun (c-jun), fos (c-fos), myc (c-myc)¹⁰ y de los genes fetales de los péptidos, natriurético atrial (ANP) y cerebral (BNP); así como de las isoformas fetales de las proteínas contráctiles β -miosina (β -MHC) y α -actina esquelética (SKA). Por esta razón todas estas proteínas se han considerado y utilizado como marcadores de la HCP.⁵

1.2.2. Hipertrofia Cardíaca Fisiológica (HCF).

A diferencia de la HCP, la HCF es generada por estiramiento mecánico de cardiomiocitos y se han propuesto diversas hipótesis acerca del proceso por el cual el estrés mecánico genera HC. Una de las más investigadas es que a través de la activación de canales iónicos sensibles al movimiento, como son los de Ca^{2+} , se puede iniciar una respuesta a la tensión mecánica. Esto está sustentado con estudios en modelos animales que sobre expresan la fosfatasa calcineurina. En estos organismos se observó un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que a su vez incrementó la presencia del factor de transcripción NFAT₃ y esto indujo el desarrollo de HC.^{13,14,15}

Otra de las propuestas, es la intervención de los factores de crecimiento, entre ellos, el factor de crecimiento transformante [TGF], el factor de crecimiento fibroblástico [FGF], el factor de crecimiento análogo a la insulina [IGF] y la angiotensina (Ang).¹⁴ Este último es el sistema que más se ha investigado ya que provoca un aumento en la presión sanguínea, inclusive más que la noradrenalina¹¹. La interacción de Ang II con sus receptores tipo 1 (AT₁) media la respuesta de los miocitos al estrés biomecánico^{12,16}, ya que este receptor se caracteriza por acoplarse a proteínas Gαq/11 (aunque también se puede acoplar a Gαi/0, Gα12/13). Esto a su vez activa a la fosfolipasa tipo C, para generar inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol, el cual activa a la PKC, la cual fosforila diferentes proteínas que participan en el crecimiento celular; sin embargo esto está más relacionado con la presencia de HCP^{4, 12}.

El aumento en el tamaño del corazón en respuesta compensatoria a estímulos de tipo fisiológicos en donde se mantiene una función cardíaca normal o incluso mejorada, ha tomado una gran relevancia clínica en la medicina cardiovascular actual, para definir si los mecanismos responsables de la función del corazón de un atleta pueden actuar como una potencial estrategia terapéutica, ya que se ha observado que la práctica de ejercicio específico, en algunos pacientes diagnosticados con insuficiencia cardíaca, podría revertir las anormalidades

fenotípicas y funcionales del crecimiento patológico¹⁵. Algo similar se ha observado en modelos animales. Por otra parte, el ejercicio es ahora uno de los tratamientos más ampliamente prescritos como preventivos que pueden ser explotados para beneficiar a los pacientes con hipertrofia patológica y la insuficiencia cardíaca.¹⁶

Por ello se ha puesto hincapié en descifrar las vías de señalización que controlan la formación de la HCF; ya que en el músculo esquelético y en el corazón la hipertrofia es ocasionada por el aumento en el tamaño y no por el aumento en el número de células.¹⁵ En algunos ensayos se han estudiado las rutas metabólicas relacionadas con el crecimiento celular como son las vías acopladas al receptor de insulina (IR) y el receptor del factor de crecimiento análogo a insulina (IGFR), que regulan importantes respuestas biológicas, tales como el crecimiento celular y la supervivencia¹⁷. En relación con esto, se ha descrito que en el tejido cardíaco el receptor IGFR-1 y la vía de señalización orquestada por la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) están implicados en el crecimiento cardíaco normal y el desarrollo de la HCF. La sobreexpresión del IGFR-1 induce hipertrofia cardíaca compensatoria, parecida a una HCF y dependiente de la vía PI3K^{14,17,18}, ya que tiene como blanco cascada abajo a la cinasa P70S6K, la cual tiene un papel muy importante en el crecimiento de la célula a través de la síntesis de proteínas.¹⁹ También se observó en un modelo murino dominante negativo para PI3K, que esta cinasa se asocia directamente con hipertrofia cardíaca en respuesta a la presión de sobrecarga generada por una constricción quirúrgica de la aorta⁶.

1.3. Vías de señalización implicadas en el desarrollo de la HC.

Los estímulos hipertróficos son mediados por diferentes vías de señalización que afectan a la transcripción de genes²⁰. Entre las más importantes implicadas en el desarrollo de HC se encuentra la activación de las MAPK que está relacionada con el desarrollo de HCP^{18, 21}; la vía PI3K-AKT está directamente relacionada con el desarrollo de HCF^{19, 22}.

1.3.1. HCP; vía de las MAPK.

La vía de señalización de las MAPK produce la rápida activación de Raf y de las proteínas cinasas ERK_{1/2} a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G, o también por la interacción de diferentes receptores con sus respectivos ligandos.^{20, 23, 24, 25} Un ejemplo de ello es la interacción de la insulina con su receptor (IR), ya que su fosforilación en residuos de Tyr en el dominio citoplasmático, promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS; donde SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas, ya que se une y activa a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de la vía, cual involucra el reclutamiento y activación de MEK (también llamada cinasa de MAP cinasa) y de las ERK1 (cinasa regulada extracelularmente 1) y ERK2 que promueven la transcripción de genes implicados en la generación de nuevas células lo cual se encuentra representado en el panel (A) de la figura 1.^{26, 27}

Por otra parte las MAPK en células vasculares de musculo liso (VSMC), pueden ser activadas por la unión de ANG II a su receptor AT₁ que promueve la inhibición de PLC mediante un aumento de Ca²⁺, originando la fosforilación de EFGR en sus residuos de tirosina por Src y Pyk2, para formar el complejo Shc/Grb2 y activar a ERK^{18, 23}.

1.3.2. HCF; vía PI3K-AKT.

La vía PI3K-AKT, puede ser activada por diferentes receptores, entre ellos el IGF1-R o al igual que las MAPK por el IR, del cual se ha descrito con mayor detalle²⁸, como se muestra en el panel (B) de la figura 1, la activación de la vía PI3K ocurre a partir de la interacción de la subunidad p85 de PI3K, con los sustratos IRS1/ IRS2, que activan la subunidad catalítica p110¹⁹. De forma similar ocurre con el IR, cuyos blancos río abajo promueven la biogénesis ribosomal y la síntesis de la maquinaria traduccional²⁶, convirtiéndose en elementos importantes

de la respuesta hipertrófica ya que interviene en la organización del citoesqueleto, el crecimiento celular e interfiriendo en la apoptosis²⁷. La señalización a través de PI3K- AKT tiene efectos pro-hipertróficos y favorece la supervivencia de los miocitos en parte debido a la activación de mTOR, quien estimula la traducción ribosomal, culminando con la activación de p70S6K para aumentar la síntesis de proteínas y así incrementar el tamaño de la célula.^{18, 28}

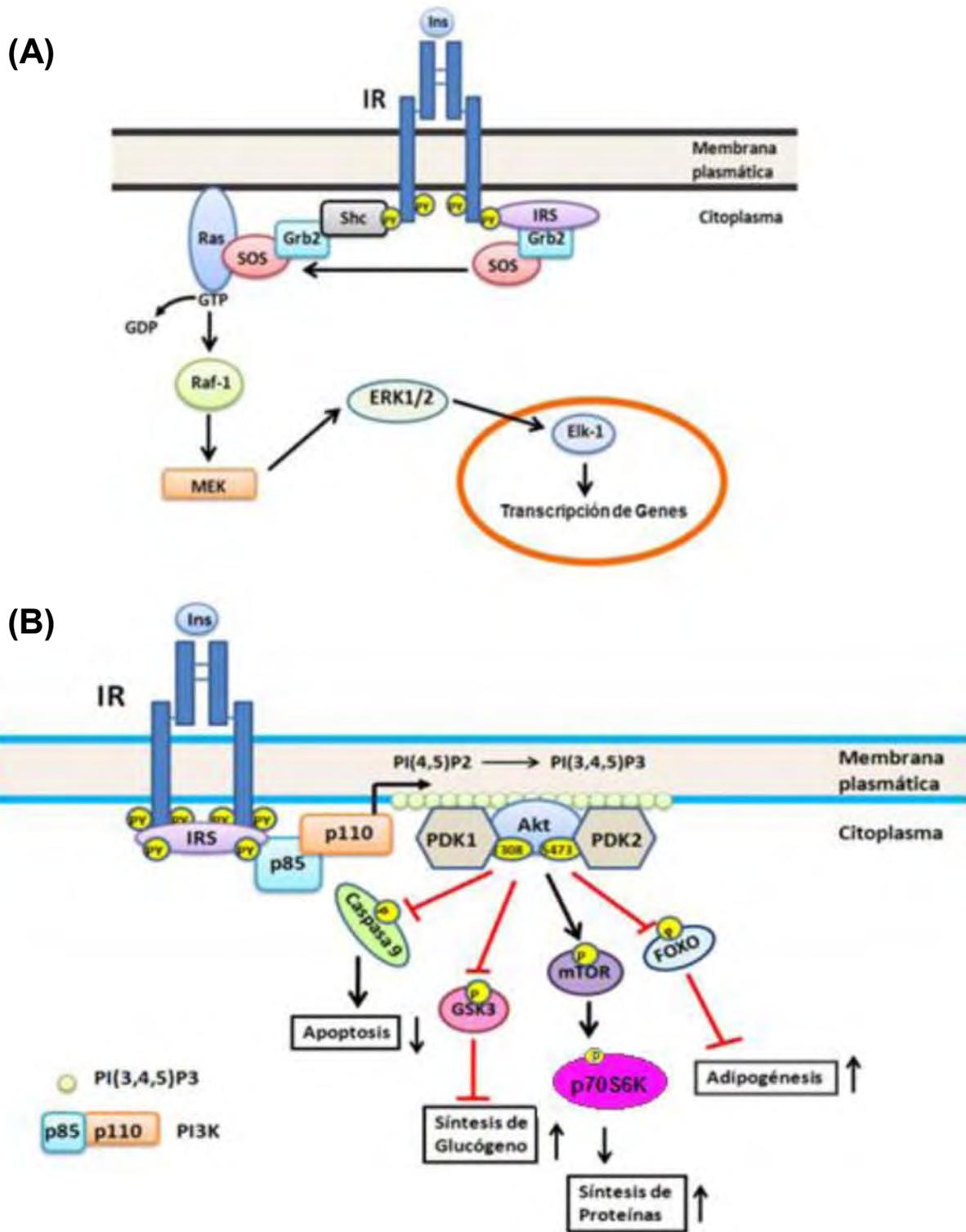


Figura 1 Vías de señalización activadas por la fosforilación del IR. (A) El encendido de la vía de MAPK conlleva la activación de las proteínas MEK y ERK_{1/2} con respuestas a nivel de núcleo celular. (B) La estimulación de la ruta PI3K-AKT está involucrada en diferentes procesos celulares entre ellas la síntesis de proteínas, a diferencia de la vía de MAPK, la respuesta queda a nivel citoplasmático. Modificada de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb081c.pdf>

1.4. Importancia de la vía PI3K-AKT en el desarrollo de HCF.

En diversas publicaciones se ha relacionado el aumento del tamaño de diferentes tipos celulares con la activación de la vía de señalización PI3K-AKT. En los primeros trabajos realizados fueron en las moscas de la fruta, *Drosophila*, la insulina inducía considerablemente el aumento del tamaño de sus células, estos estudios sugirieron que la vía PI3K estaba relacionada con el crecimiento de las células.²⁸ Sin embargo, no había datos que mostraran lo que ocurría en células de mamíferos, por ello utilizando dos modelos murinos transgénicos, el primero dominante negativo (dnPI3K) y el otro constitutivamente activo (caPI3K), en el corazón del ratón, en caPI3K se observó que su tamaño fue mayor al del ratón control, y en el dnPI3K el efecto fue el opuesto²². Estos estudios demostraron que PI3K participa activamente en el crecimiento del miocardio como se muestra en la figura 2:

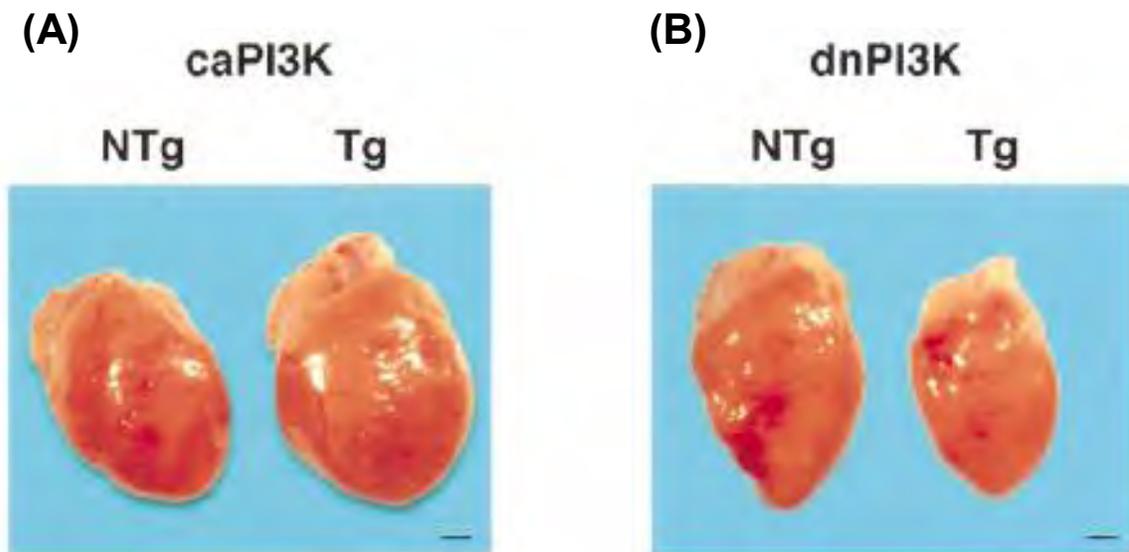


Figura 2 Corazones de ratones transgénicos. (A) En el ratón transgénico (Tg) del modelo caPI3K aumenta el tamaño del corazón considerablemente respecto al ratón no transgénico (NTg). (B) Se muestra que el corazón del ratón NTg tiene un tamaño mayor al del modelo dnPI3K que representa la ausencia de PI3K; esto demostró la importancia de PI3K en el crecimiento del miocardio.²²

Para confirmar esto, se realizaron análisis de Western Blots con las proteínas cascada abajo de la vía de señalización de PI3K. Con esto se confirmó que en el modelo caPI3K, la vía se encontraba activamente encendida; por lo contrario, esto no ocurrió en el modelo dnPI3K. También se realizaron ecocardiografías en donde se apreció un crecimiento proporcional entre el tamaño del miocardio y las paredes del ventrículo izquierdo. Así mismo, los miocitos del ratón caPI3K fueron de mayor tamaño que los miocitos del dominante negativo. Finalmente mediante cortes histológicos del corazón analizadas con la Tinción Tricrómica de Masson no se observaron depósitos de colágeno, lo que rechazaba el desarrollo de una HCP²².

En otros estudios realizados con ratones transgénicos dnPI3K y ratones normales, sometidos a estímulos que generaran una sobrecarga hemodinámica que provocó HCF (ejercicio) y una HCP (constricción de la aorta), se observó que en los ratones deficientes de PI3K el ejercicio no inducía un aumento en el tamaño del corazón, pero si la constricción de la aorta (Figura 3). Estos datos apoyaron la hipótesis de que PI3K está íntimamente ligada al desarrollo de la HCF, pero no a la HCP.³

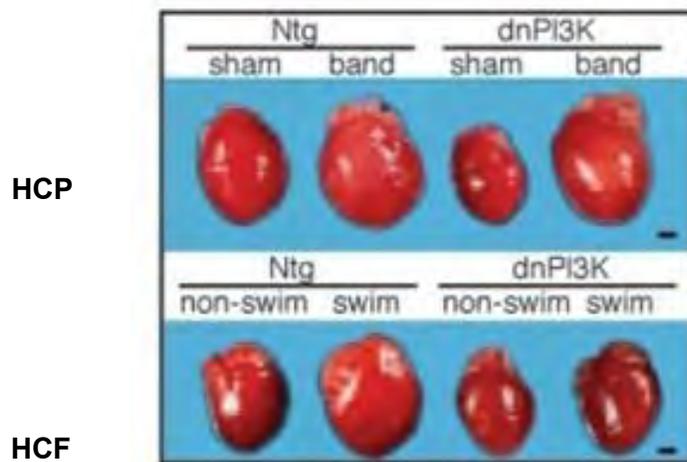


Figura 3 Corazones de ratones mutantes dnPI3K sometidos a estímulos generadores de hipertrofia. Se formaron 2 grupos de ratones, no transgénicos (Ntg) y los dominantes negativos para PI3K (dnPI3K). En la parte superior se muestran corazones de ratones a lo que se les ligó la aorta (band) con el fin de generar una HCP; en la parte inferior se muestran los corazones de ratones sometidos a ejercicio vigoroso a base de natación (swim) durante cuatro semanas creando una HCF. El tamaño del corazón del ratón dnPI3K no se vio afectado al ser sometido a ejercicio intenso, demostrando que PI3K es importante en el desarrollo de una HCF y no de una HCP.³

En este mismo estudio se observó, que en los ratones controles sometidos a ejercicio, los marcadores moleculares característicos de HCF, AKT y S6, que son blanco de PI3K cascada abajo (figura 4 A), estaban en estado activo es decir, se encontraban fosforilados. Así mismo, se mostró que los marcadores propios de HCF se activaban solamente en los ratones controles y mutantes sometidos a constricción de la aorta, pero no en los sometidos a ejercicio.³

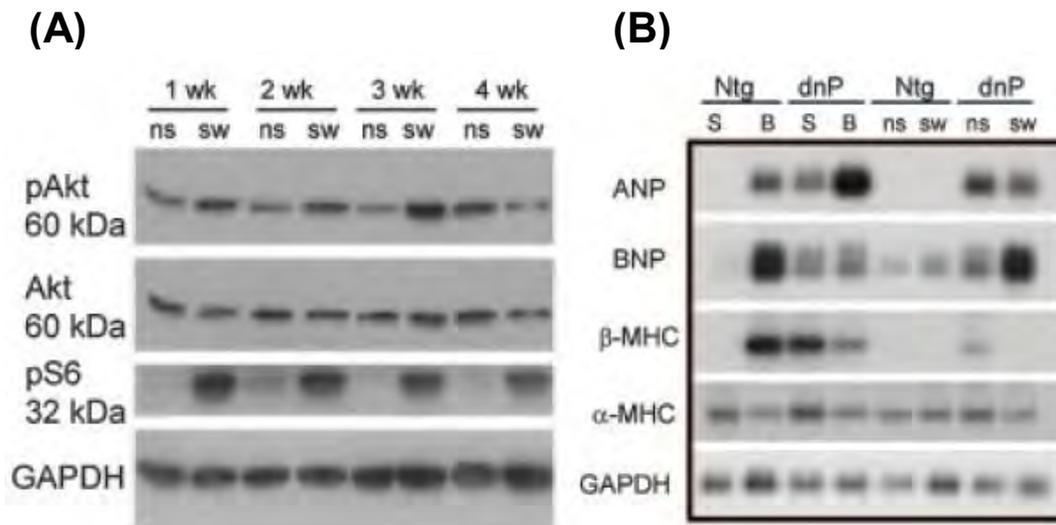


Figura 4 La vía PI3K-AKT, se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de HCF. (A) western blot de proteínas de corazones de ratones sometidos a ejercicio vigoroso a base de natación (sw) por diferentes intervalos de tiempo en los cuales la cascada de señalización PI3K se mantiene activa cascada abajo en comparación con su grupo control (ns); (B) marcadores moleculares de HCF ANP, BNP, α y β MHC, que se mantiene activos en los corazones de ratones transgénicos (dnP) y no transgénicos (Ntg) cuando se les coloca una banda en la aorta (B), sin embargo esto no ocurre en los ratones con ejercicio vigoroso (sw) ³.

1.5. La vía PI3K- AKT.

En la literatura se ha descrito un mecanismo general por el cual la vía de señalización PI3K-AKT realiza sus efectos. Como se mencionó con anterioridad, la activación de esta vía de señalización ocurre tras la unión de la insulina con su respectivo receptor IR. Posteriormente, este interacciona con IRS los cuales al ser fosforilados, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH₂^{17, 26}. Estos dominios están presentes en la subunidad

reguladora 85 de PI3K y promueven la activación de la subunidad catalítica 110 de PI3K, la cual localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a PIP3 que sirve como sitio de unión para la cinasa AKT o proteína cinasa B (PKB)³. Después de su reclutamiento en la membrana plasmática, AKT es fosforilada en los residuos Thr₃₀₈ y la Ser₄₇₃, esta última fosforilación parece promover la interacción entre el motivo hidrofóbico del carboxilo terminal de AKT y la cinasa PDK1 que la fosforila en la Thr₃₀₈; estas dos fosforilaciones son importantes para que AKT se active completamente. Seguidamente la cascada de la PI3K culmina con la fosforilación de mTOR la cual regula la síntesis proteica a través de la fosforilación de p70S6K en la Thr₃₈₉, la cual activa a la proteína S6 de la subunidad ribosomal 40S que participa en control de la traducción.^{19, 25,26, 27, 28}.

1.6. Activación de la vía PI3K-AKT en el endotelio.

Por otra parte, se ha demostrado que la cascada de señalización de PI3K no solo se activa por la unión de la insulina o del IGF a sus respectivos receptores, sino también por la presencia de compuestos polifenólicos como la epicatequina (Epi). PI3K tiene la capacidad de aumentar las concentraciones plasmáticas de NO a través de la activación de AKT, la cual fosforila selectivamente a la enzima sintasa de oxido nítrico endotelial (eNOS) en la Ser₁₁₇ encargada de la producción de NO. En modelos animales la presencia de NO tiene una función cardioprotectora y en humanos previene la aparición de infartos²⁷. Para demostrar la activación de eNOS en presencia de Epi, se realizó un cultivo de células endoteliales de arterias coronarias donde se monitorizaron los posibles activadores de eNOS rio arriba, entre ellos AKT y PKA las cuales son fosforiladas directamente por PI3K²⁹.

En modelos in vivo a través de una administración oral en humanos se ha observado que las dietas ricas en Epi junto con otros flavonoides tienen efectos benéficos a nivel de la función vascular ya que promueve la vasodilatación, disminuyendo así la presencia de enfermedades como la arteroesclerosis²⁹.

1.7. Epicatequina

La epicatequina (Epi) es un flavonoide que se ubica principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, en bebidas como el vino tinto, la cerveza y en frutas como la manzana.³⁰ Sin embargo, se ha demostrado que la mayor concentración de Epi se encuentra en el cacao, ya que representa un 35% de los polifenoles presentes en el chocolate amargo³¹.

Dentro de la clasificación de los flavonoides, la Epi se encuentra en el grupo de los flavanos, como la catequina, ya que cuenta con un grupo (-OH) en posición 3 del anillo C como se muestra en la figura 5. Gracias a estas características también ha sido catalogada como un agente antioxidante, debido a que contiene en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, que al igual que otros flavonoides, retira oxígeno reactivo especialmente en aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos³⁰.

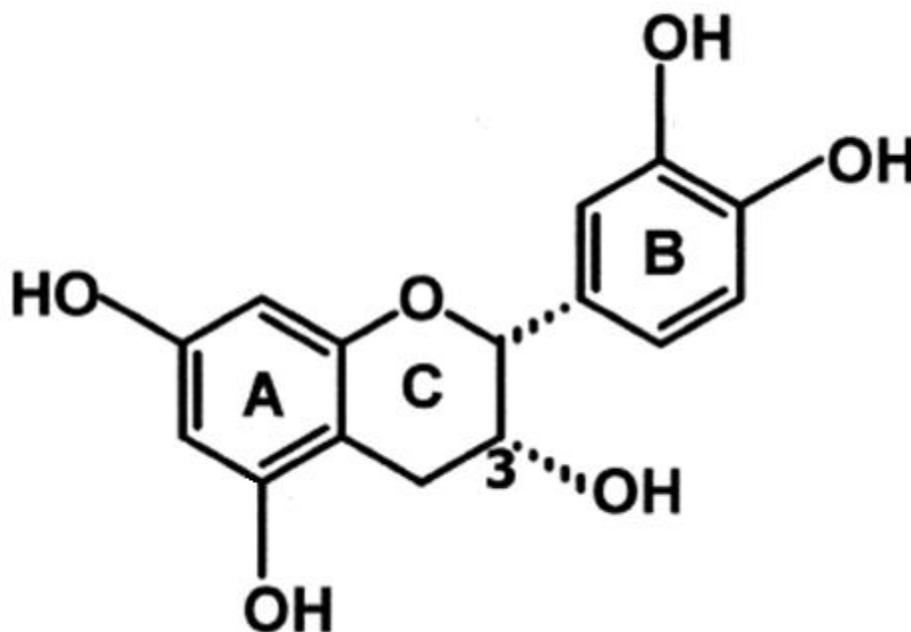


Figura 5 Estructura de la molécula de epicatequina (Epi).

Finalmente al igual que otros flavonoides el metabolismo de la Epi ocurre en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I y también en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II.³⁰

En experimentos recientes, se han purificado algunos metabolitos de la epicatequina que fueron extraídos de orina humana y de rata después de una administración oral. En muestras de orina de humanos se identificaron las estructuras de tres metabolitos los cuales son (-) - epicatequina-3'-O-β-D-glucurónido, el 4'-O-metil- epicatequina, y el 4'-O-metil- (-) – epicatequina-7-O-glucurónido, mientras que los metabolitos purificados a partir de orina de rata fueron: 3'-O-metil-epicatequina, epicatequina-7-O-glucurónido, y 3'-O-metil-epicatequina-7-O-glucurónido. Así mismo estos compuestos también se han detectado en la sangre de seres humanos y ratas. La presencia de estos metabolitos en sangre y orina sugiere que las catequinas se metabolizan y se distribuyen en el cuerpo después de la administración y una parte importante se excreta por la orina en forma de conjugados solubles en agua³².

Capítulo 2

2. Planteamiento del Problema.

El desarrollo de HCF ha sido estrechamente relacionado con la práctica de ejercicio moderado, por medio de la activación de la vía de señalización PI3K-AKT. Así mismo se ha observado que la administración de Epi en cultivos de células endoteliales de aorta coronaria y cordón umbilical de humanos activa las cinasas PI3K y AKT que promueve la fosforilación de la eNOS, aumentando las concentraciones plasmáticas de NO causando un efecto cardioprotector. Por lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿Es factible mediante la administración de Epi en ratones sanos promover la activación de la vía de señalización PI3K-AKT e inducir así el desarrollo de una HCF?

Capítulo 3

3. Hipótesis.

El flavonoide epicatequina activa la vía PI3K-AKT en el miocardio de ratones sanos, induciendo así una hipertrofia adaptativa o fisiológica.

Capítulo 4

4. Objetivos.

4.1. Objetivo General.

Cuantificar las proteínas de la vía PI3K–AKT en corazones sanos de ratones tratados y no tratados con Epi.

4.2. Objetivos específicos.

- Obtener los corazones de los ratones tratados y no tratados con Epi y calcular la relación peso corazón/peso cuerpo (PC/PC).
- Obtener un extracto de proteínas totales de los corazones de los ratones no tratados y tratados con Epi.
- Evaluar la concentración de las proteínas involucradas en la vía PI3K-AKT por medio de la técnica de western blot y cuantificar las concentraciones de proteína por medio de ensayos densitométricos.

Capítulo 5

5. Materiales.

5.1. Animales. Se utilizaron 20 ratones machos de la cepa (CD-1), de 2.5 meses y aproximadamente 20 g de peso.

Los procedimientos realizados en los animales cumplieron los requerimientos que en la materia determina la **NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, SAGARPA**; y la **Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio** (National Research Council):

- El diseño y realización de los procedimientos con base en su relevancia para la salud humana y animal, el avance del conocimiento y el bien de la sociedad
- El uso de las especies, calidad y número apropiados de animales
- El evitar o reducir al mínimo la incomodidad, estrés y dolor, siempre y cuando sea compatible con una buena ciencia
- El uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia
- El establecimiento de metas y objetivos en el experimento
- Brindar un manejo apropiado a los animales, dirigido y realizado por personas calificadas
- La conducción de experimentos en animales vivos sólo por, o bajo la, estricta supervisión de personas calificadas y con experiencia

Todos los residuos biológicos derivados del estudio se manejaron de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos.

En la mayoría de los experimentos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (90 mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal utilizando como vehículo una solución inyectable de NaCl al 0.9%.

5.1.1. Selección de ratones. Se utilizaron ratones machos de 2.5 meses de edad donados por el bioterio de la Universidad Panamericana y cuidados bajo los estándares descritos en la norma.

Se formaron dos grupos con cada grupo etario formado por 10 ratones; el primero fue el grupo control, el segundo correspondió al grupo tratado con Epi.

5.1.2. Tratamiento. A los animales se les aplicó una dosis de Epi (1 mg/kg de peso corporal) cada 12 hrs. durante 15 días vía intragástrica mediante una cánula 18G (3.81 cm largo con punta esférica de 2.25 mm de diámetro) siguiendo las recomendaciones para el manejo de roedores. Se mantuvieron en bioterio estéril bajo ciclos de luz de 12 hrs. Al grupo control se les administró solamente el vehículo (DMSO al 2 %) por la misma vía

5.1.3. Obtención de los corazones. Al finalizar el tratamiento se realizó el sacrificio de los animales, se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 90 mg/kg de peso corporal (Pfizer uso veterinario al 6.3 % m/v). Después se realizó una incisión bilateral en el tórax para exponer el corazón al cual se le inyectó 300 μ L de KCl para mantenerlo en diástole, posteriormente los corazones fueron retirados y pesados en balanza analítica. Cada corazón se lavó con solución PBS al 1X y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Los corazones fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C.

5.2. Anticuerpos.

5.2.1. Primarios.

- mTOR (Cell Signaling Technology, anticuerpo monoclonal hecho en conejo).
- Fosfo mTOR (Cell Signaling Technology anticuerpo monoclonal hecho en conejo).
- PI3K p 85 (Cell Signaling Technology anticuerpo policlonal hecho en conejo).
- Fosfo PI3K p85 (PHO-PI3K p 85), (Cell Signaling Technology, anticuerpo policlonal hecho en conejo).
- PKB (Akt, Cell Signaling, Technology, anticuerpo policlonal hecho en conejo).
- Fosfo PKB (PHO-AKT, Cell Signaling Technology, anticuerpo monoclonal hecho en conejo).
- P70S6K (Cell Signaling Technology, anticuerpo monoclonal hecho en conejo).
- Fosfo P70S6K (THR₃₈₉, Cell Signaling Technology, anticuerpo policlonal hecho en conejo).

5.2.2. Secundario.

- Anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra y acoplado a peroxidasa de rábano (Invitrogen)

5.3. Epicatequina.

(-)-Epicatequina $\geq 90\%$ (-)-*cis*-3,3',4',5, 7 Pentahidroxi flavano, (2*R*,3*R*)-2-(3,4-Dihidroxifenilo)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopirano-3,5,7-triol. Sigma-Aldrich, St Louis, EE. UU.

Capítulo 6

6. Metodología.

6.1. Tratamiento de ratones con Epi.

Al inicio del tratamiento los ratones fueron pesados, el promedio del peso corporal tuvo un valor de 20 mg, la administración de Epi se hizo vía intragástrica cada 12 horas con una dosis de 1 mg/kg. Por ello se tomaron 20 μ L de la solución stock y llevados a un volumen de 300 μ L por cada ratón. Se preparó un volumen final de 3.6 mL, teniendo un exceso de 2 dosis. Todas las diluciones fueron guardadas a -70 °C. Para el grupo control se prepararon alícuotas de 3.6 mL de vehículo que también fue guardada a -70 °C.

6.2. Extracción de proteínas totales de corazón de los ratones.

Se pesaron tres corazones en una balanza analítica. Posteriormente en tres morteros de porcelana estériles se realizó la maceración de la muestra con nitrógeno líquido. Cada corazón macerado fue depositado a un tubo eppendorf de 1.5 mL frío, se le adicionó 300 μ L de amortiguador de lisis para radioinmunoprecipitación (RIPA) (Santa Cruz Biotechnology) adicionado con PMSF al 1%, ortovanadato de sodio al 1% y un coctel de inhibidores de proteasas al 1%, por cada 100 mg de tejido, se incubaron durante 10 minutos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 4° C durante 10 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante fue recuperado en un tubo frío de 1.5 mL. Por último, se fraccionó en tubos de 0.6 mL para ser guardados a -70° C.

6.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford utilizando BSA. Por cada muestra se utilizaron 5 μ L de sobrenadante, de los cuales la absorbancia correspondiente fue interpolada en la ecuación obtenida mediante la relación lineal de las variables.

6.4. Electroforesis desnaturalizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida separadores del 11% y del 4% para los geles concentradores utilizando los reactivos descritos en el apéndice.

Cada muestra fue preparada en un tubo eppendorff de 0.6 mL, donde se colocaron 50 μ g del extracto de proteína, más amortiguador de carga en proporción 2X. Posteriormente las muestras se calentaron a baño maría en ebullición por 5 minutos. Al terminar el periodo de calentamiento las muestras fueron colocadas en el gel utilizando 2.0 μ L de marcador de peso molecular (MP) Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Finalmente se cerró el sistema eléctrico y se dejaron correr a 70 V durante 180 min.

6.5. Transferencia a membrana de nitrocelulosa en sistema húmedo.

Se preparó el amortiguador para la transferencia y se enfrió a 4 °C. Posteriormente con amortiguador de transferencia se humectaron las fibras, los filtros, y la membrana. Una vez fuera el frente de corrida del gel se armó el sándwich como en la siguiente figura 6:

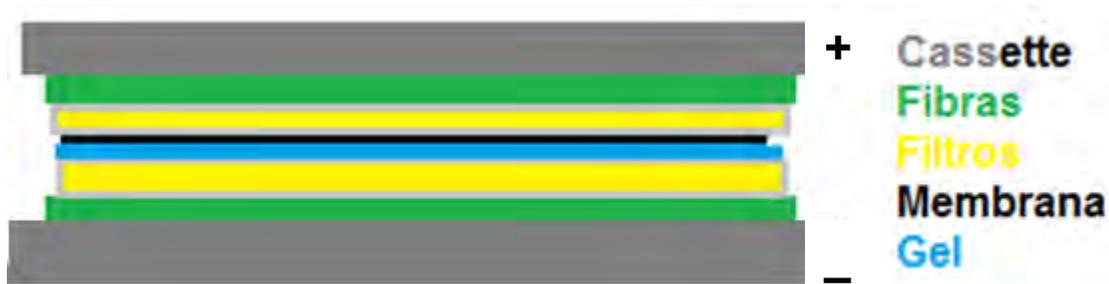


Figura 6 Casete de transferencia de proteínas, en el centro se encuentra la membrana de nitrocelulosa en contacto con el gel de poliacrilamida. Las proteínas migran del gel a la membrana de nitrocelulosa mediante un campo eléctrico ya que las proteínas tienen una carga negativa por efecto del detergente SDS.

Finalmente la cámara fue cubierta con hielo y se transfirieron las proteínas a 350 Amp durante 180 min. Al terminar el periodo de transferencia la membrana se tiñó con rojo de Ponceau.

6.6. Caracterización de proteínas por ensayos de Western Blot.

Para la realización de los western blots, la membrana fue cortada de acuerdo al peso molecular de cada proteína a evaluar, usando como base el marcador de peso en kDa.

Después de ser cortadas las membranas fueron bloqueadas en solución de leche al 5% en PBS durante una hora.

Al concluir el periodo de bloqueo se colocó el anticuerpo primario apropiado según lo indica la tabla 2:

Tabla 2 Diluciones y tiempos de incubación de Ab. Cada anticuerpo primario fue incubado con la membrana durante 3 h y después de 4 lavados con PBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 40 min.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Dilución del anticuerpo primario	Dilución del anticuerpo secundario
NCL	95	1:10,000	1:120,000
mTOR	289	1:2,000	1:100,000
PHO-mTOR	289	1:500	1:50,000
PI3K	85	1:500	1:40,000
PHO-PI3K	85	1:500	1:40,000
P70S6K	70-85	1:1,500	1:40,000
PHO-P70S6K	70-85	1:1,000	1:40,000
AKT	60	1:2000	1:50,000
PHO-AKT	60	1:500	1:40,000

El revelado se realizó en el equipo CDgit con el kit de luminiscencia Super Signal™ West Femto Chemiluminescent Substrate de Thermo Scientific.

Capítulo 7

7. Resultados.

7.1. Obtención de los corazones de los ratones tratados y no tratados con Epi.

Con el fin de obtener la relación peso corazón/peso corporal, se extrajeron los corazones de los ratones de los grupos Ctr y Epi., de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 5.1.3. Para tener en diástole al corazón y que estuviera lo más dilatado posible se administró KCl. La figura 7 muestra corazones representativos del grupo tratado con Epi y del grupo Ctr.

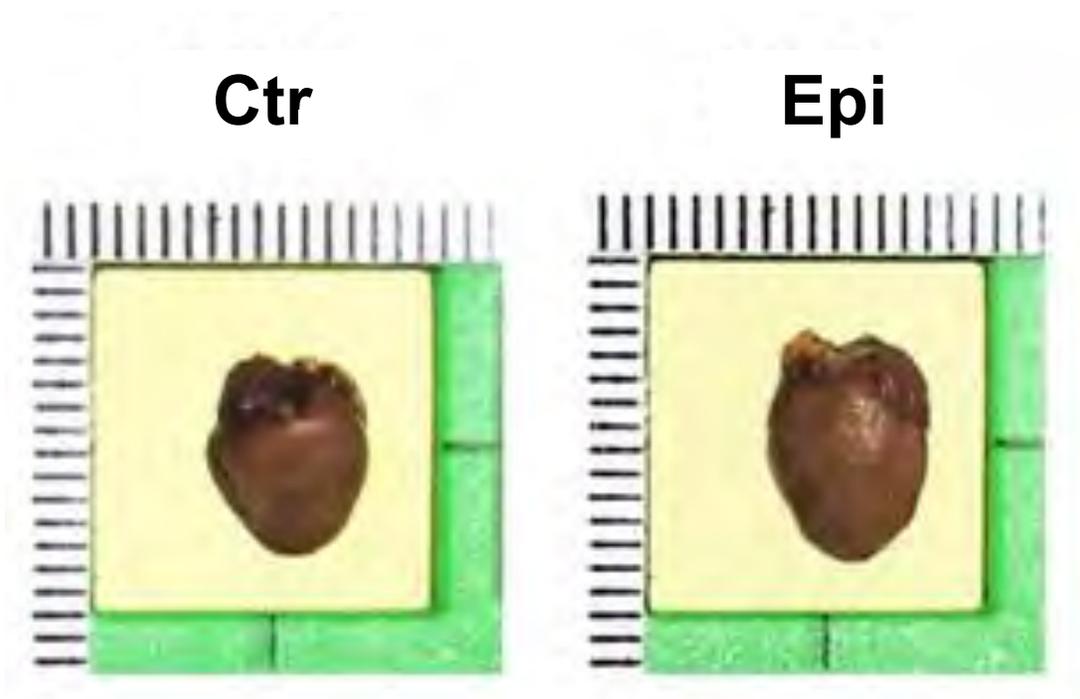


Figura 7 Impacto de la Epi en el crecimiento del corazón. La figura muestra un corazón representativo de ratón del grupo tratado con Epi (derecha) el cual es de mayor tamaño al compararlo contra el del grupo no tratado Ctr (izquierda).

7.2. Obtención de la relación peso corazón/ peso corporal.

Durante el tratamiento se monitorieó el peso de cada ratón para el ajuste de la administración de la Epi. En la tabla 3 se muestran los valores de los pesos el día 1 y el día del sacrificio (día 14). Se obtuvieron los promedios correspondientes a cada grupo los cuales fueron se muestran en la figura 8, sin embargo no se observaron diferencias significativas ya que el promedio de los pesos corporales entre los dos grupos era similar; en el grupo Ctr. fue de 31.28 g mientras que en el grupo Epi de 32.19 g. Sin embargo en la figura 7 se muestra la fotografía de los corazones extraídos de los ratones, en donde se observa que el representante del grupo tratado con Epi, es de mayor tamaño que el del grupo Ctr, lo cual se comprobó cuando el promedio de los pesos de los corazones para el grupo Ctr de 159.71 mg y en el grupo Epi de 204.76 mg, al obtener los porcentajes correspondientes de cada uno se obtuvo que los corazones de los ratones tratados con Epi son 28.20% más grandes que los corazones del grupo Ctr (figura 9).

Tabla 3 Pesos corporales y de los corazones de los ratones Ctr y Epi, durante el tratamiento.

Control	Día 1	Día 7	Día 14	Corazón (mg)
1	27.8	28.99	30.08	152.7
2	30.72	29.59	31.26	161.2
3	29.59	30.22	32.9	160.6
4	30.13	30.09	30.61	164.3
5	29.28	31.21	29.32	144.2
6	31.21	34.27	33.48	162.3
7	34.13	33.07	34.43	140.6
8	27.27	27.88	28.73	172.1
9	33.35	31.20	32.16	162.7
10	31.46	29.76	29.81	176.4
		Promedio	31.28	159.71
		D. E.	1.80	11.19
Epi	Día 1	Día 7	Día 14	Corazón (mg)
1	30.64	33.45	33.52	160.2
2	31.61	32.81	33.61	189.6
3	33.14	31.88	34.46	232.9
4	36.15	33.85	31.76	195.2
5	28.17	29.02	28.29	199.3
6	27.55	27.32	29.13	201.9
7	30.65	29.51	31.76	204.1
8	33.31	33.91	33.68	228.9
9	33.28	27.07	28.85	209.9
10	25.12	34.95	36.84	225.6
		Promedio	32.19	204.76
		D. E.	2.77	21.55

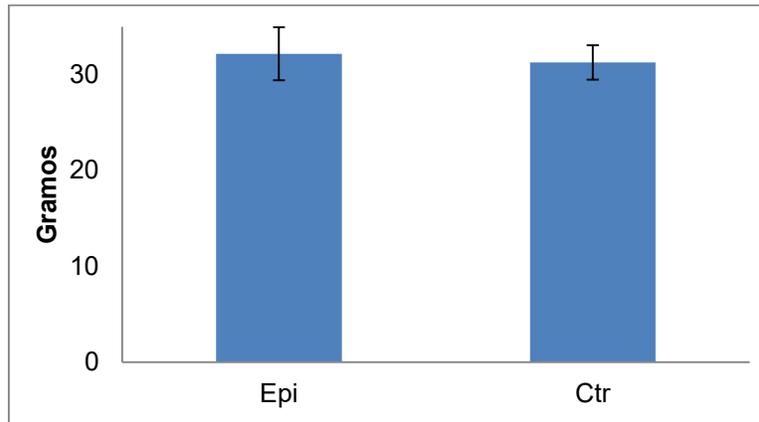


Figura 8 El consumo de Epi no afecta al peso corporal. Se graficaron los promedios de los pesos de los ratones obtenidos el día 14 y no se observan diferencias significativas entre los individuos de ambos grupos.

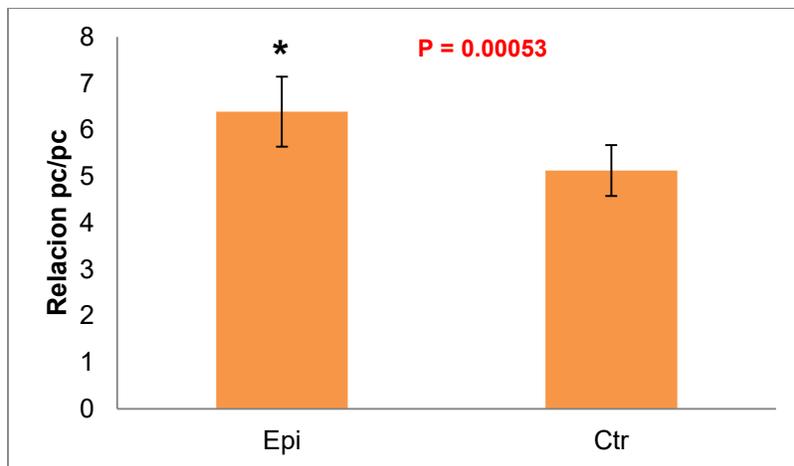


Figura 9 La Epi causa HC en ratones sanos.

7.3. Obtención de un extracto de proteínas totales de los corazones de ratones tratados y no tratados con Epi y transferencia a la membrana de nitrocelulosa.

Después de la extracción de proteínas se realizó la cuantificación de las mismas por el método de Bradford, obteniendo un promedio de concentraciones de 7.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteína total de para el grupo Ctr, mientras que para el grupo Epi fue de 7.67 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. También se determinó la integridad de estas mediante el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida cargando por cada pozo 50 μg de extracto, en la figura 10, panel izquierdo, se muestra un gel al 11% teñido con azul de Coomassie en el cual se colocaron 80 μg de proteína por carril, donde se observó una carga homogénea en cada carril. En la figura 10, panel derecho se muestra la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo de Ponceau al 2%. A partir de este resultado y con ayuda del marcador de peso molecular podemos identificar la localización de las proteínas en la membrana que posteriormente fue cortada para la realización del Western Blot.

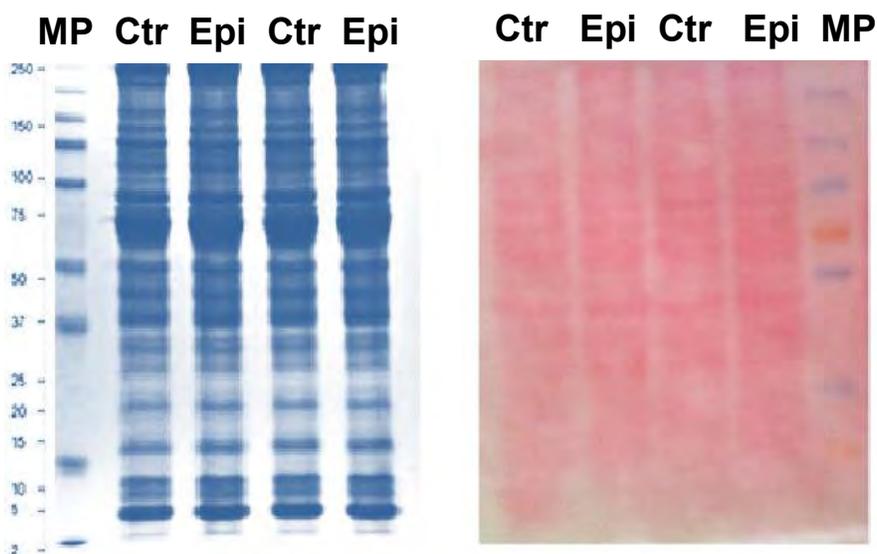


Figura 10 Integridad de proteínas. Panel Izquierdo. Gel de poliacrilamida al 11% teñido con Azul de Coomassie cargado con 80 μg de proteína por cada carril. Panel Derecho. Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo de Ponceau al 2%. (Izquierda). MP= Peso Molecular

7.4. Evaluar la concentración de las proteínas involucradas en la vía PI3K-AKT.

Después de observar el aumento del tamaño de los corazones de los ratones sometidos al tratamiento, se procedió a confirmar si era causada por una HCF, para ello se estandarizaron concentraciones óptimas para los anticuerpos de las proteínas involucradas en la vía de señalización PI3K-AKT. Una vez realizado lo anterior se realizaron los ensayos de Western Blot para determinar la cantidad relativa de las proteínas que conforman la vía de señalización PI3K-AKT. Al analizar las densitometrías se observó que en el grupo tratado con Epi había una mayor cantidad de proteína PI3K, AKT y mTOR totales, lo cual no ocurría con P70S6K, sin embargo en el caso de las proteínas fosforiladas no pasaba lo mismo ya que existía mayor cantidad de PHO-AKT, PHO-mTOR, P70S6K y no de PHO-PI3K lo cual se muestra en el panel de la derecha de la figura 11, lo que nos indicó que la vía de señalización se encontraba encendida. Para comprobar lo anterior, se realizó una comparación estadística entre los dos grupos, utilizando una t-Student, con una n de 4 obtuvimos una P menor a 0.05 en cada una de las proteínas, como se puede observar en los gráficos del panel derecho de la figura 11. Los datos obtenidos indicaban que en el grupo de ratones tratados con Epi contenían una mayor cantidad de proteínas tanto totales y fosforiladas.

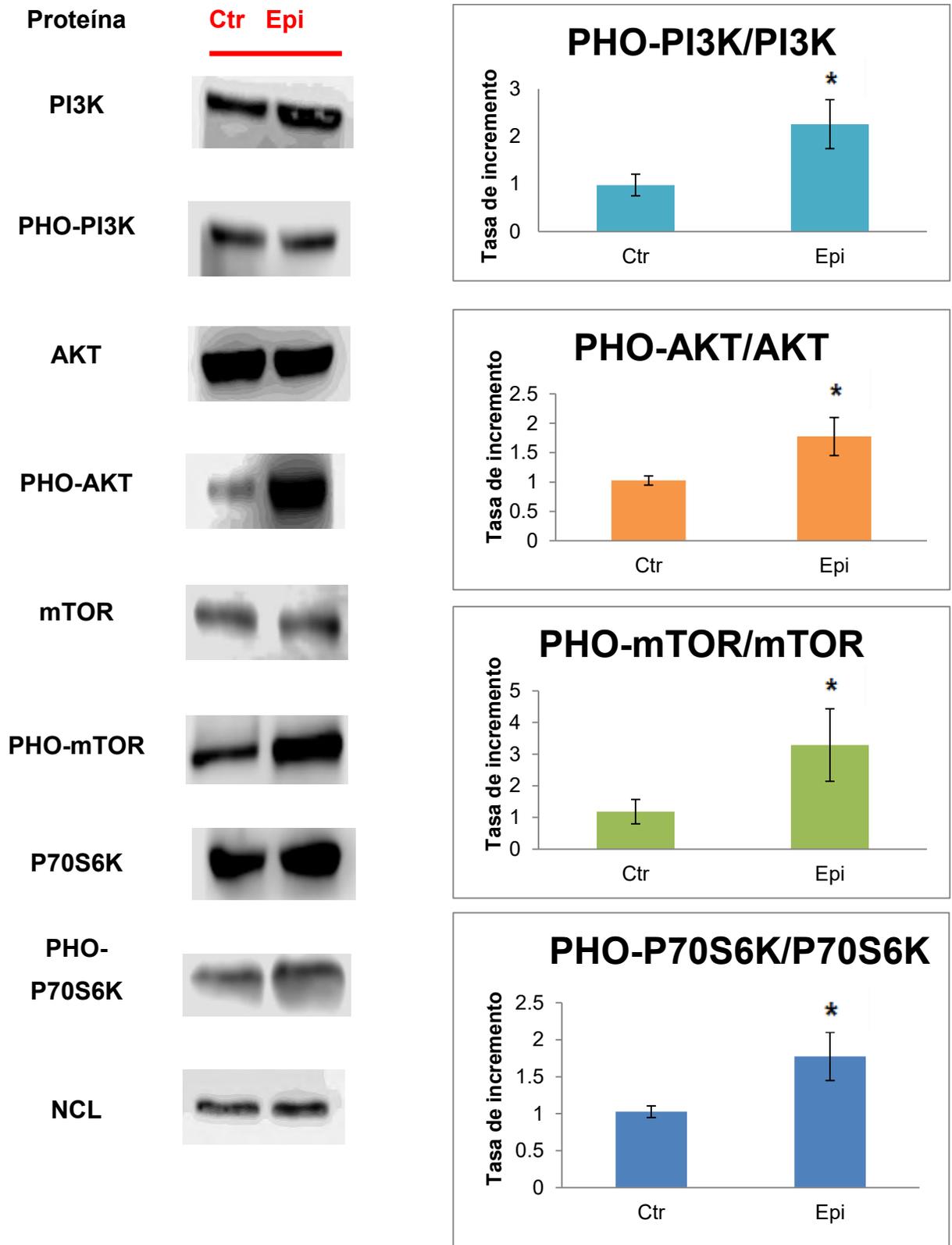


Figura 11 Activación de la vía PI3K-AKT por el consumo de Epi. Con una $P < 0.05$ y una $n = 4$, observamos una mayor actividad medida por la fosforilación de las proteínas de la cascada de señalización en los corazones de los ratones tratados con Epi en comparación a los Ctr.

Capítulo 8

8. Discusión de resultados.

La HC, patológicamente también se ha definido como aumento absoluto de la masa ventricular (MV). Cuando se presenta en humanos el peso del corazón supera los 200 g³³. También se ha propuesto que el peso del corazón es la medida de masa más importante, pues constituye el elemento indispensable para diagnosticar hipertrofia cardíaca en individuos post mortem³⁴. En algunos modelos murinos se ha demostrado la presencia de HC al realizar una relación Peso Corazón/Peso Corporal, uno de ellos es el ratón mutante dnPI3K, nulos para el gen de la proteína PI3K, en este modelo se ha observado que los ratones al ser sometidos a estímulos generadores de hipertrofia, como es el bandeo de la aorta y ejercicio excesivo, el corazón no han incrementado su tamaño.^{3, 18} Con los datos que obtuvimos realizamos el cálculo la relación Peso Corazón/ Peso Corporal, y con un valor de $P < 0.001$ se observó que existe una diferencia significativa entre los dos grupos y se confirmó que los corazones de los ratones administrados con Epi, presentan algún tipo de HC.

El incremento en el tamaño del corazón se ha atribuido al incremento de factores hormonales como la insulina y el factor de crecimiento, los cuales han sido ligados a la activación de la vía de señalización PI3K-AKT¹⁹, por ello evaluamos los niveles de concentración de las proteínas implicadas en esta vía, a través de la técnica de Western Blot.

Evidencias sustanciales en modelos murinos han demostrado el papel crítico de la vía PI3K, donde se ha sugerido su activación a través del receptor de IGF-1, que está relacionado con el desarrollo de una hipertrofia de tipo fisiológico.¹⁷ La mayoría de los trabajos se han centrado en la regulación de la maquinaria de síntesis de proteínas y principalmente en la interacción de PI3K, con la vía mTOR, ya que tiene un papel central en la regulación de la traducción del mRNA.^{35, 36} Por

otra parte se ha propuesto que la Epi puede activar esta vía de señalización y podría generar HCF.

Los resultados indican que tras dos semanas de administración de Epi, aumento el tamaño del corazón. Tras analizar las concentraciones relativas de las proteínas involucradas en la vía de señalización PI3K-AKT, se observó que en las muestras provenientes de los ratones tratados con Epi aumentó la cantidad de proteínas fosforiladas. Esto muestra que hay un aumento en la actividad de la cascada de señalización, es decir, cuando PI3K es fosforilada por un receptor tipo tirosinacinas recluta hacia la membrana plasmática a AKT a través de su interacción con dominios de homología con pleckstrina (PH)³⁶. La fosforilación de la AKT en los aminoácidos Thr₃₀₈ y Ser₄₇₃ activa a PKB que se encuentra como trímero inactivo, permitiendo su autofosforilación en otros residuos aminoacídicos promoviendo la formación de un complejo de PKB que se activa y es independiente de fosfolípidos³⁷. Este puede dissociarse de la membrana plasmática y viajar al citosol, al núcleo o a otros orgánulos para fosforilar otras proteínas. En este caso monitoreamos la actividad de la cinasa p70S6K, activada por la fosforilación de su predecesora mTOR lo que repercute en la regulación transcripcional³⁶. La fosforilación de la proteína ribosomal S6 incrementa la síntesis de proteínas. En el modelo de caPI3K aumenta la fosforilación de esta proteína, sin embargo en el ratón dnPI3K disminuye su fosforilación.²² Esto demostró que la vía de señalización iniciada por PI3K está estrechamente relacionada con el aumento de tamaño del corazón a través de la síntesis de proteínas resultado de la fosforilación de P70S6K⁸ y además está involucrada en un posible desarrollo de una HCF³. En nuestro experimento con la administración de Epi incrementó la cantidad de proteína mTOR fosforilada y por ende la síntesis de proteínas dependientes de la actividad de la cinasa S6 aumentando el dinamismo en la maquinaria de traducción, obteniendo mayor cantidad de proteínas y favoreciendo el crecimiento celular³⁶. Sin embargo estos resultados no son suficientes para determinar si la Epi es capaz de generar una hipertrofia de tipo fisiológico.

Capítulo 9

9. Conclusiones.

En este trabajo demostramos que la vía de señalización PI3K-AKT es activada por la Epi, provocando un crecimiento hipertrófico en el corazón de ratones sanos siguiendo el patrón de una HCF, con un estímulo de una duración de 14 días. Nuestros resultados sugieren que se desarrolló una hipertrofia que también ha sido descrita en corazones de atletas y que se ha señalado como benéfica para la salud. Estos resultados podrían ser un indicio de un posible tratamiento médico a futuro en pacientes con problemas cardíacos, a base de compuestos presentes en la dieta de la población, sin embargo faltan experimentos que complementen esta información que podrían desarrollarse en un futuro próximo.

Capítulo 10

10. Referencias

- 1 **Macaya Miguel Carlos**; Libro de la salud cardiovascular del hospital clínico San Carlos; Fundación BBVA 2007. Capítulo 2; Pág. 35.
- 2 **Jairo Acuña Olmos, et al**; Texto de Cardiología; Sociedad Colombiana de cardiología y cirugía cardiovascular; 2009, Capítulo 7, Pág.
- 3 **Julie R. McMullen, et al**; Phosphoinositide 3-Kinase (p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy; PNAS 2003; 100; 12355–12360.
- 4 **Ennis Irene L., Eduardo M. Escudero**; Hipertrofia Cardíaca. 2008
- 5 **Juan Eduardo Carreño, et al**; Hipertrofia cardíaca: eventos moleculares y celulares; Rev Esp Cardiol. 2006; 59:473-86.
- 6 **Molkentin JD, et al**; Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy; Annu Rev Physiol; 2001;. 63: 391-426.
- 7 **Passier R, et al**; CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF-2 transcription factor in vivo; J Clin Invest. 2000; 105(10):1395-406
- 8 **McMullen JR, et al**; Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase (p110 α) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. PNAS USA; 2007; 104; 612–617.
- 9 **Nolly Mariela Beatriz**; “Hipertrofia cardíaca patológica: estudio experimental de su modificación con el ejercicio–vías de señalización Intracelular involucradas”. Tesis Doctoral 2012 Universidad Nacional de La Plata – Facultad de Ciencias Exactas.
- 10 **Sek Won Kong, et al**; Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. Physiol Genomics. 2005; 21:34-42.
- 11 **Ruppert C, et al**; Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. PNAS USA. 2013

110; 7440-7445

- 12 **Lijnen P, et al;** Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes; *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:949-970
- 13 **Akhter SA, et al;** Targeting the receptor–Gq interface to inhibit *in vivo* pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 1998; 280: 574–577.
- 14 **Wettschureck N, et al.** Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Gaq/Ga11 in cardiomyocytes. *Nat. Med.* 2001; 7: 1236–1240.
- 15 **Benjamin J. Wilkins, et al;** Calcineurin/NFAT Coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy; *Circ Res.* 2004; 94; 110-118.
- 16 **Pérez-Díaz Iván, et al.** Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales At₁ y At₂: características y su papel en el funcionamiento celular; *REB* 2006 25: 55-60.
- 17 **McMullen JR, et. al;** The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110 alpha) pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 4782–4793.
- 18 **Dickson LM, et al;** Differential activation of protein kinase b and p70S6K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic b-cells (INS-1); *J Biol Chem.* 276; 21110-21120
- 19 **Komuro Issei,** Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development; *Jpn Circ J.*; 2001; 65 (5):353-358.
- 20 **Julie R McMullen et al;** Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure; *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34; 255-262
- 21 **Francisco Correa-Segura, et al;** Mecanismos moleculares involucrados en las estrategias mecánicas para evitar el daño por reperfusión en el miocardio isquémico.; *Bioquímica;* 2009; 34; 137-149.
- 22 **Shioi T, et al;** The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 2000; 19; 2537-2548.

- 23 **Mehta PK, et al;** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292; C82-97.
- 24 **Bernardo BC, et al.** Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010; 128; 191-227.
- 25 **Roskoski R Jr.** ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation.; *Pharmacol Res.* 2012; 66; 105-143.
- 26 **Olivares Reyes Jesús Alberto, et al;** Bases moleculares de las acciones de la insulina; *REB* 2008; 27; 9-18.
- 27 **Van Empel VP, et al;** Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act; *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 487-499.
- 28 **Coffer PJ, et al.** Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J.* 1998; 335 (Pt 1):1-13.
- 29 **Ramirez-Sanchez I, et al;** (-)-Epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways; *Hypertension.* 2010; 55; 1398-1405
- 30 **S. Martínez-Flórez, et al,** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002; 17; 271-278
- 31 **Abd El Mohsen MM, et al;** Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33; 1693-1702.
- 32 **Natsume M, et al;** Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat; *Radic Biol Med.* 2003; 34; 840-849.
- 33 **Suárez C, et al;** Pesos en corazones normales de Venezuela. *Gac Méd Caracas* 2004; 112:42-48.
- 34 **Maron BJ.** Contemporary insights and strategies for risk stratification and prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2010; 121; 445-456.

- 35 Christopher G. Proud;** Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy, *Cardiovas Res*, 2004, 63, 403– 413
- 36 Vivanco I. et al;** The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev*, 2002, 2:489-501.
- 37 Cantley LC;** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296; 1655-1657.