



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**CUAUTILÁN**

**“EFECTO DEL LQM319 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL  
BIOMARCADOR NF- $\kappa$ B EN EL INFARTO  
MIOCÁRDICO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA  
**ZÁRATE CALLEJA EFRÉN**

ASESORAS:  
**Dra. Luisa Martínez Aguilar**  
**Dra. Ma. Del Rocío Bautista Pérez**  
**M. En C. Jazmín Flores Monroy**

**CUAUTILÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO 2013**



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

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
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 a comunicar a usted que revisamos la: Tesis

**Efecto del LQM319 sobre la expresión del biomarcador NF-kB en el infarto miocárdico**

Que presenta la pasante: Efrén Zárate Calleja

Con número de cuenta: 409022102 para obtener el Título de: Licenciado 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 HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón	
1er. SUPLENTE	MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
2do. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	

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



## AGRADECIMIENTOS

***“Lo importante en la vida no es el triunfo sino la lucha. Lo esencial no es haber vencido, sino haber luchado bien.” (Barón Pierre de Coubertin)***

*Porque en la vida los conocimientos y experiencias buenas o malas se aprenden y adquieren a través de los años, en casa con la familia, amigos y compañeros y en la escuela, considerada nuestra segunda casa; porque todos somos parte de este mundo y cada uno de los que aquí hago mención forman parte del mío.*

*Y como un testimonio de mi infinito aprecio y agradecimiento por toda una vida de esfuerzos y sacrificios siempre con cariño y apoyo cuando más lo necesite, deseo de todo corazón que mi triunfo Profesional lo sientan como suyo.*

*Siempre creí que el escribir los agradecimientos de la tesis sería la parte más fácil de hacer. Sin embargo, ahora que estoy aquí sentado no creo que existan las palabras suficientes que me ayuden a describir todo lo que siento en este momento ¡Terminé mi tesis! ¡Después de tanto tiempo y trabajo lo logré! Debo confesar que este momento siempre lo vi muy lejos y aunque estoy a un pasito de titularme no puedo creer que una de las metas más grandes e importantes de mi vida se vea realizada tan pronto.*

*Primeramente debo agradecer a Dios por todo lo que me ha dado y permitirme tener este recorrido por el camino de la sabiduría que inició hace aproximadamente 19 años, por darme el regalo más grande que pude recibir, “mi familia” por tenerlos a ellos que siempre han estado a mi lado llenando mi vida de amor y de alegría. Gracias por estar a mi lado en cada momento ser mi guía y mi protección, por las bendiciones que he recibido durante toda mi vida, por darme la vida y permitirme compartir contigo y con todos mis seres queridos el más grande logro que hasta ahora he cumplido. Gracias Dios por brindarme a estos dos Ángeles como PADRES pero sobre todo por permitirme tener a mi MADRE aun a mi lado.*

*A ustedes PAPÁ y MAMÁ como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y formación profesional. Porque sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todos sus desvelos, ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por lo que soy y por todo el tiempo que les robé pensando en mí MUCHAS GRACIAS.*

*A mi papá Ismael Z. por apoyarme en todo momento de mi vida y por siempre exigirme más. Gracias por trabajar tanto para nosotros, por preocuparte que nunca nos haya faltado nada, a pesar de tu arduo trabajo cotidiano de sol a sol; por enseñarme que siempre debo luchar hasta conseguir lo que me propongo. Por ser el ejemplo más fiel de sacrificio,*



*constancia y dedicación. Por enseñarme que no debo conformarme y que siempre debo ir por más, ¡Gracias por todo! ¡TE AMO PAPÁ! ¡NADXHELII STALÉ!*

*A una Gran mujer y Gran MADRE, Griselda C. a pesar de todo lo que has o hemos sufrido aun te tengo aquí a mi lado, eres claro ejemplo de ser una mujer luchona y maravillosa, porque a pesar de todas esas adversidades vividas nunca te dejaste vencer y siempre seguiste adelante. Gracias por el amor que me brindas, gracias por enseñarme a ser responsable, gracias por cuidarme a lado de mi papá desde hace 22 años + 9 meses y estar siempre pendiente de mí. ¡Gracias por todo! ¡TE AMO MAMÁ! ¡NADXHELII STALÉ GUNA SICARÚ!*

*FINALMENTE A LOS DOS GRACIAS POR CONFIAR Y CREER EN MI y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí. SHIANGA SICARU LATÚ.*

*Hago un espacio para recordar y agradecer a dos personas que físicamente ya no los tengo a mi lado pero sé que donde quiera que estén, me están cuidando y están orgullosos de mi, MI ABUELO Abel Zárate† y una gran mujer que a pesar de solo conocerte 7 años te sigo extrañando mi ABUELA Dionicia Orozco†.*

*A mi hermano Abel que siempre me apoyó, me brindo consejo y regaños pero siempre estuvo en este camino, a mi cuñada Nelvis por sus consejos y a los dos por los momentos de risa. ¡Gracias por todo! ¡Los AMO! ¡NADXHIEE' LATÚ!*

*A mi hermosa familia, que me brindan amor, cariño, comprensión, consejos y regaños de los buenos, a la Familia Zárate López, Calleja Orozco, Orozco Zárate y López Zárate. A mi tía Estrella Calleja que fue como mi segunda Mamá por un tiempo y a su esposo mi tío Manuel Tornez, gracias por sus sabios consejos y gracias por su apoyo cuando lo he necesitado. LOS AMO.*

*A una familia que me ha adoptado como su hijo la familia Luis Trinidad, a mis tíos, a mis primos hoy considerados como mis hermanos a Constantina (Tinita), Roque y Marisol, gracias por recibirme en su núcleo familiar, gracias por sus consejos, gracias por estar en las buenas y en las malas conmigo y entre pleitos y enojos de primos hoy somos inseparables. LOS QUIERO MUCHO.*



*Como sabemos para adquirir conocimientos se tiene que pasar por diferentes etapas de estudios y durante este camino de adquisición de conocimientos, hubieron maestros que merecen tener un espacio en esta tesis como agradecimiento al conocimiento y apoyo brindado en el camino.*

*Todo inicio hace aproximadamente 10 años. En mi faceta de primaria quiero dar las Gracias a la Profesora Juana López L. que fue la pionera en retirarme del oscurantismo en el que vivía e iniciar a regarme con conocimientos; posteriormente Agradezco a la Profesora Rosa Elvira Velasco porque continuó regando el arbolito con conocimientos. Gracias a las Dos por confiar en mí en cada momento y dedicarme tiempo, porque ahora ese arbolito creció y está dando su primer fruto.*

*En mi faceta de Secundaria quiero agradecer al Maestro Jesús Ordaz Antonio por brindarme su amistad y sus conocimientos sobre el área de las ciencias químico-biológicas y ser el pionero en inculcarme el amor por esta área y el amor por la ciencia.*

*Siempre al concluir una etapa el ser humano inicia o debe iniciar otra y así como las aves migran en busca de alimentos yo fui en busca de conocimientos. Para cursar mi bachiller tuve que migrar, en donde encontré a buenas personas, amigos y maestros agradezco a estos últimos por sus conocimientos enseñados en cada una de sus clases y por ofrecerme una amistad. Al Médico Thomas Montaña el que me inculcó el amor por la ciencia de la salud y conocimientos sobre esta área; a la Maestra Rosa Elvia buena asesora, gracias por brindarme conocimientos y su apoyo; al Q.B Román, la segunda persona en brindarme conocimientos y el amor por el área químico- biológica.*

*A un gran maestro y gran amigo Marco Antonio Serrano Nangüelu, gracias por aportar su respectivo conocimiento a este árbol, gracias por sus consejos ya que por uno de ellos hoy estoy aquí terminando de estudiar lo que quería y en la escuela que no quería pero de la cual hoy me siento orgulloso.*

*En el bachiller conocí a tres grandes personas, amigos y hermanos (Bi'ches'), Ignacio Salinas, Ramón J. Toledo y Rony Cruz S., que junto con mi amigo y hermano de la infancia y de cada una de las etapas como estudiante preescolar-bachiller Gilberto Martínez Matus, fuimos llamados los "Bacteriófagos" queridos por unos y odiados por otros, pero gracias a trabajar juntos nació esta amistad que hasta ahora tenemos, excelentes amigos y equipo de trabajó; a ellos les hago también un reconocimiento de soportarme como persona, a pesar de mi carácter o bien defectos, con ustedes aprendí muchas cosas, pasamos momentos buenos y malos pero cada uno inolvidable.*



*Hago un espacio para agradecer a dos grandes hermanos y amigos desde la infancia al Lic. Rogelio Blas y Raúl Escobedo Blas. Cada uno de ellos estuvo conmigo en los buenos y malos tiempos, gracias por sus consejos, regaños y momentos de risa. También a mi hermana Isidra G. Ruiz (Lupita) y a mi amiga Sheila Gpe. Gracias por escucharme y platicar conmigo siempre. L@S QUIERO MUCHO...¡NADXHIEE' LATÚ BI'CHE CAÁ!.*

*Si la persona quiere seguir inculcándose de conocimientos tiene que ir en busca de ellos, por eso emigre a esta ciudad desde mi hermoso y bello pueblo, a pesar de que mi sueño no fue estudiar en la UNAM, hoy soy PUMA de corazón.*

*A mi llegada a este mundo desconocido, conocí a unas grandes personas a la Sra. Roselia Escobar y su esposo Sr. Mariano Ruiz, que ambos forman una gran familia junto con sus hijos Mariano David, Aline y su sobrina Silvia Gabriela. Ellos me adoptaron como parte de su familia, sin tener alguna relación consanguínea y actualmente yo los adopte como mis tíos y primos. Gracias tíos por ofrecerme un lugar donde quedarme, gracias por la confianza que me brindaron a mí y a mi familia, gracias por su apoyo y cariño, gracias por sus consejos, que me han dado en estos años y gracias por permitirme ser parte de su familia. LOS QUIERO MUCHO. NADXHIELII IRÁ TU'STALÉ.*

*Y a una nueva familia que forme cuando me independice: Jairo, Sughey, Gabriela y Gabriel García, con los que compartí buenos y malos momentos pero siempre me brindaron su apoyo y actualmente a mis primos-hermanos-amigos Adalberto L. Zárate, Gustavo López y Axel A. Ruiz con los que he pasado tanto gratos momentos como malos pero siempre brindándonos apoyo cuando lo necesitamos. LOS QUIERO. Y también al nuevo miembro Miguel Trejo por su apoyo y amistad.*

*A mis amig@s y algunos como mis herman@s que conocí durante la carrera, unos al inicio otros en el camino pero todos mis amigos y parte importante: Jorge Méndez (Brody), Gerardo A. (Fredy), Rubén R. (Amigo), Alberto Cortés, Alfredo Cisneros (Furbi), Noemí Bello, Diana D.(Bulebu), Sofía P. (hermanita), Karina L., Verónica V., José Merlán, Giovanna D., Selene Ramos, V. Hugo, Arly S., Sandra Tobón, N. Carolina (Caro), P. Izaret, Sarita, Diana N. (Chakala), Irene, Lulú, Mayra, Rebeca Montero y Evelin Karina. Cada uno de ustedes me brindo su amistad y muchos, sino es que todos, soporto mi forma de ser, gracias por sus consejos, gracias por buenos y malos momentos, por las risas, por las convivencias y por su apoyo. También un agradecimiento a la familia de algunos de ellos que me han recibido de la mejor manera y me han brindado su confianza, amistad y consejos. LOS QUIERO. PD. Y una disculpa por si se me olvida poner a alguien, saludos.*



*A una gran persona, amiga, compañera, que al igual que el resto de mis amigos o la mayoría conocí en tercer semestre, pero iniciamos una buena amistad en 5º semestre y desde entonces entre diferencias, enojos, momentos malos y muchos buenos, seguimos siendo amigos y actualmente sucedió lo que ya no esperábamos, ser novios, si a mi Novia que quiero mucho Karina E. Conde gracias por tus consejos, regaños, cariño, por los buenos momentos que hemos pasado juntos, por el apoyo en cada momento TKM....NADXHIELII STALE BA'DUXHAPA SICARU.*

*A mis compañeros de servicio social por su amistad, confiar en mí para poder desarrollar este proyecto, Raúl S. (primo), Nancy V., Verónica Zuñiga, Karen Pérez, Rosy Monroy, Daniela N., Yessica F., Sandra Cortés (Sandrita) gracias por esos buenos momentos de platicas, risas, consejos, los cuales fueron agradables. LOS QUIERO.*

*A mis maestros o doctores que merecen ser mencionados en esta tesis la Dra. Patricia Ramírez Noguera, IQ Mauricio Vicuña, Q.F.B Rosalba Bonilla, Dr. Salvador Fonseca, M.C Beatriz Maya, M. en C Ana Laura, M. en C. Natahriel Soto, Dra. Alma Lucila, Dr. Víctor Zendejas, MVZ Gabriela, MVZ Ángel Martínez, M. C Maritere, M.C Leticia Arellano, QFB Beatriz González, gracias por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, por exigirme ser mejor cada día ya que gracias a eso hoy me doy cuenta que los límites no existen siempre y cuando tú te lo propongas, a la coordinadora QFB Laura Gricelda por el apoyo brindado en mi estancia en la carrera. A todos MUCHAS GRACIAS.*

*A la M.C Jazmín Flores Monroy, ya que en un principio me dio su amistad y consejos, pero principalmente mis agradecimientos por llevar a cabo la oclusión de mis ratas para producir el IAM y poder realizar este proyecto. MUCHAS GRACIAS por esto y por ser mi Coasesora.*

*A la Dra. Luisa Martínez Aguilar responsable del laboratorio de Farmacología del Miocardio, por ofrecerme la oportunidad de ser uno de sus tesisas, por brindarme la confianza y apoyo para sacar adelante este proyecto que me propuso y hoy estamos terminando. Gracias por a su formación hoy culmino uno de mis sueños. Gracias por formar parte de mi superación y por las enseñanzas que me brindó para ser mejor cada día y el siempre decirme busca mas allá o bien el no ser conformista, también por enseñarme a trabajar en equipo, el ser constante, responsable y algo disciplinado bueno disciplinado no solo a nivel escolar si no que en cada uno de los aspectos de mi vida. Muchas gracias por su apoyo, comprensión y su confianza, muchas gracias por ser mi asesora de tesis. Y gracias por ofrecerme beca de Tesis mediante el apoyo de la dirección general de asuntos del personal*





*académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo al proyecto PAPIIT-IN212213-3 y a la Cátedra CONS-26 FESC-UNAM. Muchísimas Gracias.*

*Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, en especial a la Dra. Rocío Bautista Pérez responsable del laboratorio de Fisiología Renal por el apoyo brindado en cada momento para poder realizar este proyecto, por regañarme si se cometió algún error, por ponerme a leer y llevar a cabo la redacción de esta tesis, por no dejarme solo al momento de realizar las técnicas moleculares, gracias por formar parte de mi superación y por las enseñanzas de sus conocimientos que me brindo, por ofrecerme su tiempo y atención para que todo saliera bien y el siempre decirme busca mas allá, también por enseñarme a trabajar en el laboratorio, el ser constante, responsable y ser disciplinado no solo a nivel escolar si no que en muchos de los aspectos de mi vida. Muchísimas gracias. Agradezco también al Instituto Nacional de Cardiología por el apoyo al proyecto 12-766.*

*Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la máxima casa de estudios del país y mí segunda casa durante cuatro años, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, por permitirme formar parte de la institución más importante de este país y por darme la oportunidad de llenarme de orgullo al ser universitario. Porque durante mi estancia en la Facultad se me brindaron todos los recursos necesarios tanto para mi formación profesional como personal. Porque en ella conocí a personas maravillosas que influyeron en mi crecimiento.*

***“Empieza por hacer lo necesario, después lo que es posible y sin darte cuenta estarás haciendo lo imposible” Francisco de Assis***



# ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

Índice de figuras.....	I
Índice de tablas.....	II
Índice de Gráficas.....	III
Abreviaturas.....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos particulares.....	3
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>4. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
4.1 Causas del infarto agudo de miocardio.....	4
4.2 La arteriosclerosis.....	6
4.2.1 Formación de la lesión y placa.....	7
4.2.2 Placa vulnerable.....	9
4.2.3 Ruptura.....	10
4.2.4 Trombosis.....	10
4.2.5 Agregación plaquetaria.....	11
4.2.6 Fibrinólisis y retrombosis.....	12
4.3 Infarto miocárdico.....	12
4.3.1 Tipos de infarto al miocardio .....	12
4.3.1.1 Infarto al miocardio subendocárdico.....	13
4.3.1.2 Infarto de miocardio transmural .....	14
4.3.2 Infarto Agudo al miocardio.....	14
4.4 La arterioesclerosis y el factor de transcripción nuclear $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).....	15
4.4.1 Factor de Transcripción Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) .....	15
4.4.2 La activación y función del NF- $\kappa$ B .....	17
4.4.3 Señalización mediada por la activación del NF- $\kappa$ B.....	21
4.4.4 Genes dependientes de NF- $\kappa$ B.....	25
4.5 Transducción de señales y el NF- $\kappa$ B: La activación de la Vía Canónica del NF- $\kappa$ B y las Enfermedades cardiovasculares .....	27
4.5.1 Las subunidades transcripcionales.....	29
4.5.2 Los inhibidores citosólicos .....	30
4.6 El NF- $\kappa$ B y la enfermedad cardiovascular .....	30



4.6.1	Objetivos transcripcional del NF- $\kappa$ B en células cardiovasculares.....	31
4.6.2	Infarto de miocardio y lesión por reperfusión.....	32
4.7	Relación del Sistema Renina Angiotensina (SRA) con el Infarto Agudo al Miocardio (IAM) .....	34
4.7.1	Breve descripción del SRA y el NF- $\kappa$ B.....	34
4.7.1.1	El Sistema Renina-Angiotensina.....	35
4.7.1.1.1	Vías alternas de generación de la Ang II.....	39
4.7.1.1.2	Las nuevas angiotensinas.....	40
4.7.1.1.3	La Ang II y la respuesta inflamatoria vascular.....	41
4.7.1.1.4	Vinculación de SRA con la aterosclerosis.....	43
4.7.1.1.5	Acciones proaterogénicos de Ang II.....	44
4.7.1.1.6	El reclutamiento de células mononucleares.....	45
4.8	Fármacos utilizados en el tratamiento del (IAM) .....	47
4.8.1	Tratamiento en el post-infarto.....	48
4.8.1.1	Captopril: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) .....	48
4.8.1.2	Mecanismo de acción de los IECAs.....	48
4.9	Compuesto tiomorfolínico 4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol (LQM319).....	50
<b>5.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
6.1	Inducción del infarto miocardio por oclusión de la arteria coronaria.....	55
6.2	Extracción de tejido.....	55
6.3	Calculo de porcentaje del área de infarto.....	55
6.4	Aislamiento de RNA (Método de Trizol) .....	56
6.5	RT-PCR.....	56
6.5.1	Retrotranscripción Inversa.....	56
6.5.2	PCR.....	57
6.6	ELISA.....	58
6.6.1	Homogenado para estimar la síntesis de proteínas NF- $\kappa$ B .....	58
6.6.2	Determinación de proteínas citoplasmática y citosólica por el método de Bradford.....	58
6.6.3	Determinación de la actividad del NF- $\kappa$ B/p65 mediante el Kit ActivELISA.....	59



6.7 Análisis Estadístico.....	59
<b>7.RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>8.DISCUSION .....</b>	<b>67</b>
<b>9.CONCLUSIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>10.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>77</b>
<b>11.REFERENCIAS.....</b>	<b>78</b>



## Índice de figuras

**Figura 1.** Infarto agudo de miocardio.

**Figura 2.** Estudios experimentales. Oclusión de la arteria circunfleja en perros.

**Figura 3.** El desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

**Figura 4.** Evolución de la acumulación de placa en la arteria coronaria hasta la necrosis del tejido.

**Figura 5.** Progresión de la arterosclerosis hasta causar el infarto del área sin irrigación sanguínea.

**Figura 6.** Importancia de los macrófagos en las placas vulnerables.

**Figura 7.** Ruptura y trombosis de la placa de ateroma inestable.

**Figura 8.** Tipos de infarto de miocardio por localización.

**Figura 9.** Tipos de Infarto de miocardio por tamaño.

**Figura 10.** Representación esquemática de NF- $\kappa$ B como integrador en la aterogénesis

**Figura 11.** Familia de proteínas NF- $\kappa$ B.

**Figura 12.** Los miembros de la familia NF- $\kappa$ B de factores de transcripción.

**Figura 13.** Representación esquemática de los miembros de los mamíferos de Rel/NF- $\kappa$ B y familias de proteínas I $\kappa$ Bs.

**Figura 14.** Diagrama esquemático que muestra las subunidades conocidas de IKK y sus supuestos motivos funcionales y estructurales.

**Figura 15.** La red de señalización que activa NF- $\kappa$ B y cómo las interacciones combinatorias a nivel promotor/ complejo amplificador para determinar la especificidad de la acción NF- $\kappa$ B mediante la modulación de redes dependientes de transcripción de NF- $\kappa$ B.

**Figura 16.** Activación de la vía canónica NF- $\kappa$ B.

**Figura 17.** I $\kappa$ B mediada por la exportación nuclear de subunidades NF- $\kappa$ B.

**Figura 18.** Efectos paradójicos de la activación del NF- $\kappa$ B en el corazón.

**Figura 19.** Los efectos de bloqueo genético de NF- $\kappa$ B después de la isquemia reperfusión (I/R) y la oclusión coronaria permanente (PO).



**Figura 20.** Una visión simplificada de la circulación del 'clásico' del sistema renina-angiotensina.

**Figura 21.** Esquema general de las fases del Sistema Renina-Angiotensina (SRA).

**Figura 22.** Efectos de péptidos de angiotensina y prorenina/renina mediada por sus correspondientes receptores.

**Figura 23.** Papel de Ang II en la respuesta inflamatoria en la lesión vascular.

**Figura 24.** Mecanismos proaterogénicos para Ang II producido en la pared del vaso

**Figura 25.** Esquema clásico del sistema renina angiotensina ECA y su inhibición mediante los IECA.

**Figura 26.** Estructura química del Captopril.

**Figura 27.** Molécula de la Changrolina en tres regiones.

**Figura 28.** Síntesis y Estructura química del compuesto Tiomorfolínico 4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol (LQM319).

**Figura 29.** Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio que muestra a los RNAs de cada grupo de trabajo, las áreas sin infarto y las áreas con infarto del ventrículo izquierdo.

**Figura 30.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra a los DNA de cada grupo de trabajo, con sus dos áreas del ventrículo izquierdo, las áreas sin infarto y las áreas con infarto.

**Figura 31.** Esquema general hipotético de cómo el compuesto LQM319 y el Captopril podrían estar llevando a cabo la activación del NF- $\kappa$ B/p65.

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Diferentes aspectos en la redefinición del infarto agudo al miocardio.

**Tabla 2.** Una lista breve de los genes dependientes de NF- $\kappa$ B que pueden afectar la decisión entre la muerte celular o supervivencia y lesiones o protección en el Corazón.

**Tabla 3.** Efectos de estimulación de los receptores de Ang II.

**Tabla 4.** Porcentaje de eficacia de fármacos comerciales vs compuestos sintetizados en FESC-1.

**Tabla 5.** Potencia de un tóxico en función de la DL50.



## Índice de gráficas

**Gráfica 1.-** Porcentaje de área de infarto de los grupos con Infarto Miocárdico (IM), IM + Captopril e IM + LQM319, después de las 48 h de oclusión de la arteria coronaria descendente.

**Gráfica 2.-** Curva estándar del Factor NF- $\kappa$ B/p65.

**Gráfica 3.-** Concentración de proteínas en las áreas sin infarto de cada uno de los grupos de trabajo a nivel nuclear y citoplasmático.

**Gráfica 4.-** Concentración de proteínas en las áreas con infarto de cada uno de los grupos de trabajo a nivel nuclear y citoplasmático.

**Gráfica 5a.-** Densitometría del NF- $\kappa$ B(p65)/GADPH en las áreas sin infarto de los diferentes grupos de trabajo (Control, IM, IM+ Captopril e IM + LQM319).

**Gráfica 5b.-** Densitometría del NF- $\kappa$ B(p65)/GADPH en las áreas con infarto de los diferentes grupos de trabajo (IM, IM+ Captopril e IM + LQM319).



## Abreviaturas

<b>AGE</b>	Productos Finales de Glicosilación Avanzada
<b>AMPRI</b>	Amino Peptidasa Regulada por Insulina
<b>Ang I</b>	Angiotensina I
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>Ang III</b>	Angiotensina III
<b>Ang IV</b>	Angiotensina IV
<b>ARA II</b>	Antagonistas de los Receptores AT1
<b>AT<sub>1,2</sub></b>	Receptor de Ang II
<b>BM</b>	Biomarcadores
<b>CABG</b>	Injerto de Derivación de la Arteria Coronaria
<b>CLMV</b>	Células de Músculo Liso Vascular
<b>COX<sub>1</sub></b>	Ciclooxigenasa 1
<b>COX<sub>2</sub></b>	Ciclooxigenasa 2
<b>ECA</b>	Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>ECM</b>	Células de Músculo Liso
<b>eNOS</b>	Sintasa de Óxido Nítrico endotelial
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>G-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
<b>GM-CSF</b>	El Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
<b>GRR</b>	Región Rico en Glicina
<b>HIF1</b>	Factor Inducible por Hipoxia 1
<b>I/P</b>	Pre-acondicionado isquémico
<b>I/R</b>	Isquemia-reperfusión
<b>ICAM-1</b>	Molécula de Adhesión Intercelular
<b>IDR</b>	Inhibidores Directos de la Renina
<b>iECA</b>	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IM</b>	Infarto Miocárdico
<b>IAM</b>	Infarto agudo al miocardio
<b>iNOs</b>	Sintasa de Óxido nítrico inducible





<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidores kappa B
<b>LAD</b>	Arteria Descendente Anterior
<b>LBP</b>	Proteína de unión a LPS
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LDL-ox</b>	LDL oxidadas
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>LQM</b>	Laboratorio de Química Medicinal
<b>LZ</b>	Cremallera leucina
<b>MAPK</b>	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
<b>MCP-1</b>	Proteína-1 Quimiotáctica de Monocitos
<b>M-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias Macrófagos
<b>MEK</b>	Mitógenos Cinasa Cinasa
<b>MEKs</b>	Mitógenos Cinasa Cinasa Cinasa
<b>MMP</b>	Prometaloproteinasas
<b>NEMO</b>	Subunidad Reguladora (IKK $\gamma$ )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear de Transcripción kappa B
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Nervioso
<b>PAI-1</b>	Activador del Plasminógeno
<b>PC</b>	Precondicionamiento isquémico
<b>PCI</b>	Intervención Coronaria Percutánea
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento transformante de plaquetas
<b>PDTC</b>	Pirrolidina ditiocarbamato
<b>PHD1</b>	Prolilhidroxilasa 1
<b>PKC</b>	Proteína Cinasa C
<b>PO</b>	Oclusión Coronaria Permanente
<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa 2 A
<b>PP2B</b>	Calcineurina
<b>RAGE</b>	Receptor para AGE
<b>RHD</b>	Dominio homólogo Rel (Rel Homology Domain)
<b>ROS</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>RT-PCR</b>	Técnica de transcripción inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final
<b>SCA</b>	Síndromes Coronarios Agudos
<b>SCF</b>	Factor de Células Madre
<b>SRA</b>	Sistema Renina Angiotensina



<b>SRR</b>	Región Rica en Serina			
<b>ST</b>	Segmento ST			
<b>TAD</b>	Dominios de Transactivación			
<b>TF</b>	Factor Tisular			
<b>TLR</b>	Receptor parecido a Toll			
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa			
<b>t-PA</b>	Activador de Plasminógeno Tisular			
<b>UPA</b>	Plasminógeno Tipo Urocinasa			
<b>VCAM-1</b>	Molécula de Adhesión Celular Vascular			
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento	Endotelial	Vascular	



## 1.- INTRODUCCIÓN

El infarto agudo del miocardio (IAM) es una necrosis isquémica del músculo cardíaco secundaria a una anoxia celular prolongada y representa la causa número uno de muerte a nivel mundial, nuestro país no es la excepción. Estimándose 500,000 decesos en los Estados Unidos y alrededor de 80,000 en nuestro país (Alexanderson, 2006). Por lo anterior, se considera importante llevar a cabo un proyecto que busque determinar el papel que desempeña el Factor Nuclear NF- $\kappa$ B en el proceso inflamatorio en el IAM, ya que actualmente las técnicas diagnósticas convencionales empleadas en la práctica clínica, entre ellos la coronariografía, no permite estudiar la actividad de las lesiones coronarias y en estudios recientes se ha sugerido que el empleo de marcadores de la inflamación ayudaría a la identificación de pacientes con riesgo de padecer eventos cardiovasculares (Kaski, 2000).

Por ello adquiere gran importancia estudiar el Factor Nuclear NF- $\kappa$ B como parámetro de diagnóstico, el cual fue descubierto en 1986 por Sen y Baltimore. El NF- $\kappa$ B regula numerosos genes entre los cuales se encuentran: las citocinas, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL) 1, 6 y 8, factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos (G-CSF, M-CSF, GM-CSF), MCP-1, el factor tisular (TF), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1). Cada uno está involucrado en una respuesta inflamatoria (L. Martin 1988). La importancia de los procesos inflamatorios en los eventos coronarios agudos se confirma, una vez más, con la observación del aumento de la actividad de este factor de transcripción nuclear, tanto en modelos animales como en humanos y se correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad coronaria. Demostrando que existe una correlación directa entre actividad del biomarcador NF- $\kappa$ B y severidad de las lesiones coronarias (Alexanderson, 2006). Por esta razón, en el presente trabajo de tesis se busca determinar el efecto del compuesto tiomorfolínico [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) en el infarto miocárdico sobre la expresión y síntesis de NF- $\kappa$ B mediante el uso de técnicas moleculares como RT-PCR y ELISA, respectivamente. Este compuesto ha mostrado ser eficaz en el infarto miocárdico reduciendo el área necrosada y disminuyendo las arritmias postoclusión. Se espera que el biomarcador de inflamación NF- $\kappa$ B después de la oclusión coronaria modifique su expresión y síntesis en respuesta a la exposición a [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) asociando estos eventos con su farmacológica en el miocardio.



## 2.- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto del compuesto tiomorfolínico 4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol (LQM319) sobre la expresión del génica y en la síntesis de la proteína del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) mediante técnicas moleculares en el Infarto miocárdico inducido por la oclusión de la arteria coronaria en ratas Wistar macho.

### 2.2 Objetivos Particulares:

- Determinar si hay cardioprotección con el tratamiento mediante el índice del área de infarto en el ventrículo izquierdo del corazón de ratas Wistar después de 48 h de oclusión coronaria sin y con tratamiento del compuesto [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) o de Captopril.
- Evaluar el efecto del [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) sobre la síntesis de NF-κB en el área con y sin infarto miocárdico del ventrículo izquierdo de ratas Wistar, mediante la técnica de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) de ratas con y sin tratamiento del 4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol (LQM319) o de Captopril.
- Evaluar el efecto del [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) sobre la expresión del NF-κB en el área con y sin infarto miocárdico del ventrículo izquierdo de ratas Wistar, mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa de punto final (RT-PCR) de ratas con y sin tratamiento del [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) o de Captopril.



### **3.- HIPÓTESIS**

Sí el compuesto tiomorfolínico [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) tiene efecto sobre la expresión y síntesis del factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B) en el Infarto agudo del miocardio (IAM) en ratas Wistar, entonces se espera que la síntesis y su expresión se vea modificada después del tratamiento.

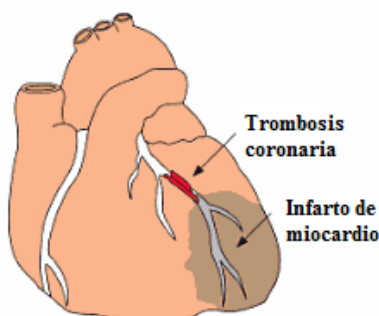


## 4.- ANTECEDENTES

Los síndromes coronarios agudos (SCA) por aterotrombosis previamente considerados como la expresión final de una enfermedad por depósito de colesterol, actualmente se exige entender a la aterogénesis como una compleja interacción de factores de riesgo, células de la pared arterial, elementos hemostáticos y mensajes moleculares. Estudios experimentales y clínicos establecen a la inflamación como un componente fundamental no sólo en todos los estadios vasculares de la arteriosclerosis sino que también participa en las complicaciones locales miocárdicas y sistémicas de este proceso fibroproliferativo (Serrano M., 2001, Libby 2005 ).

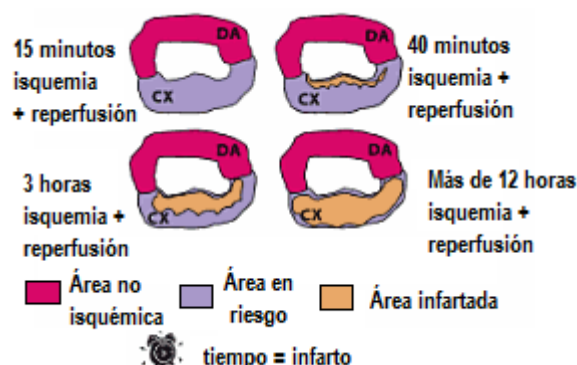
### 4.1.- Causas del infarto agudo de miocardio

La enfermedad que subyace tras el infarto agudo de miocardio es de forma casi invariable, la arterioesclerosis avanzada de las arterias coronarias. 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 la red de 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 coágulo que puede llegar a obstruir de forma completa y brusca la luz de la arteria, interrumpe el flujo sanguíneo, dejando una parte del músculo cardíaco sin irrigación. Cuando esto sucede, esa parte del corazón deja de contraerse. Si el músculo cardíaco carece de oxígeno y nutrientes durante demasiado tiempo, normalmente más de 20 minutos, el tejido de esa zona muere y no se regenera, desarrollándose así un infarto agudo de miocardio (**Figura 1**) (López, 2009).



**Figura 1.-** Infarto agudo de miocardio. 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 coágulo 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 (López, 2009).

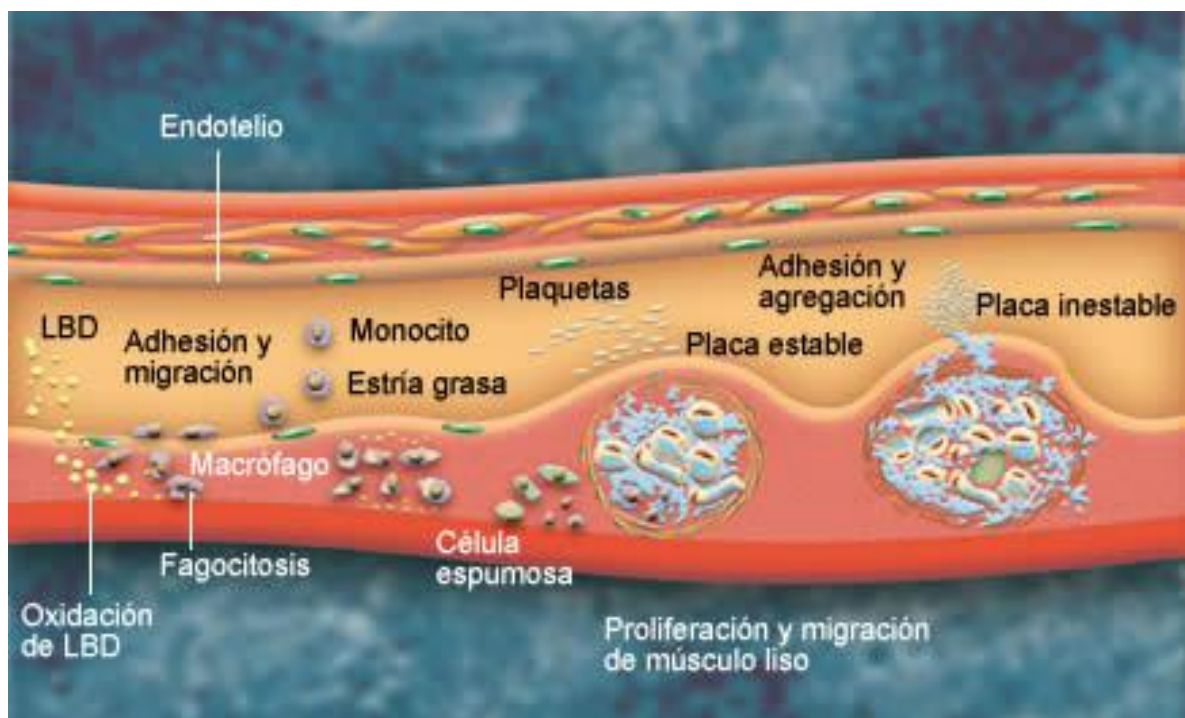
La formación del trombo que ocluye la luz de las arterias coronarias suele ser independiente del grado de obstrucción que la placa de ateroma haya provocado previamente en dicha luz. Esto explica por qué muchos pacientes no presentan ningún síntoma antes de sufrir de forma aguda e inesperada un ataque al corazón. Las placas de ateroma que no obstruyen de manera significativa la luz coronaria pueden pasar durante años inadvertidas y la enfermedad arteriosclerótica puede no ser reconocida hasta el momento brusco de la rotura de la placa y la oclusión completa del vaso con la subsiguiente aparición del infarto agudo de miocardio (López, 2009). Además de la arteriosclerosis y la trombosis de las arterias coronarias, otras causas de infarto de miocardio son extraordinariamente raras. Se han descrito casos de infarto provocados por la embolización dentro de las arterias coronarias de fragmentos de coágulos provenientes de otros lugares o por la embolización de fragmentos de verrugas bacterianas procedentes de una endocarditis de la válvula aórtica. También se ha descrito la oclusión aguda de las arterias coronarias en caso de arteritis o inflamación de la pared coronaria o en caso de disección en la pared de la raíz aórtica que afecte al ostium (origen) de una arteria coronaria. Igualmente, se han descrito oclusión coronaria o infartos en pacientes con mucha hipertrofia del músculo cardíaco en los que existe un desequilibrio extremo del balance entre el flujo sanguíneo aportado por las coronarias y las necesidades de un músculo hipertrofiado o aumentado. También estudios experimentales han demostrado que con oclusión de las arterias se puede causar el infarto y la relación entre el tiempo de oclusión de la arteria y el tamaño del infarto (**Figura 2**).



**Figura 2.**-Estudios experimentales. Oclusión de la arteria circunfleja en perros. Relación entre el tiempo de oclusión de la arteria coronaria y el tamaño del infarto. El espacio de tiempo en que la recanalización de la arteria es más eficaz para salvar el músculo cardíaco abarca las tres primeras horas que siguen a la oclusión coronaria. DA arteria coronaria descendente anterior. CX arteria coronaria circunfleja. American Journal of Cardiology 72 (1993 13G-21G)

## 4.2.- La Arteriosclerosis

La arterioesclerosis y sus manifestaciones clínicas del infarto miocárdico, accidente cerebrovascular y la insuficiencia vascular periférica son una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los hombres y mujeres. Incluye múltiples factores de riesgos como la hipertensión, la diabetes mellitus y el tabaquismo, estos trastornos están implicados en la patogénesis de esta enfermedad inflamatoria crónica de las arterias. El desarrollo de lesiones arterioescleróticas tempranas puede subdividirse en iniciación, la expansión y la progresión de las placas (Reclutamiento de células musculares lisas en la íntima, deposición de colágeno y la formación de una capa fibrosa), (**Figura 3**). Durante la iniciación y la expansión de las estrías grasas y monocitos circulantes son reclutados en la íntima arterial que se transforman en lípidos congestionados, células espumosas de macrófagos. El endotelio arterial en estas regiones se activa y expresa la inducción de moléculas de adhesión leucocitaria y quimiocinas. Producción de citocinas y factores de crecimiento dentro de las lesiones pueden amplificar el reclutamiento de monocitos, estimular la proliferación de macrófagos e inducir la migración del músculo liso de la media a la íntima del vaso. En la íntima las células de músculo liso, presentan depósito de colágeno y otras proteínas que conducen a la formación de la capa fibrosa (Libby, 2005).



**Figura 3.** El desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Kumar, 2007).

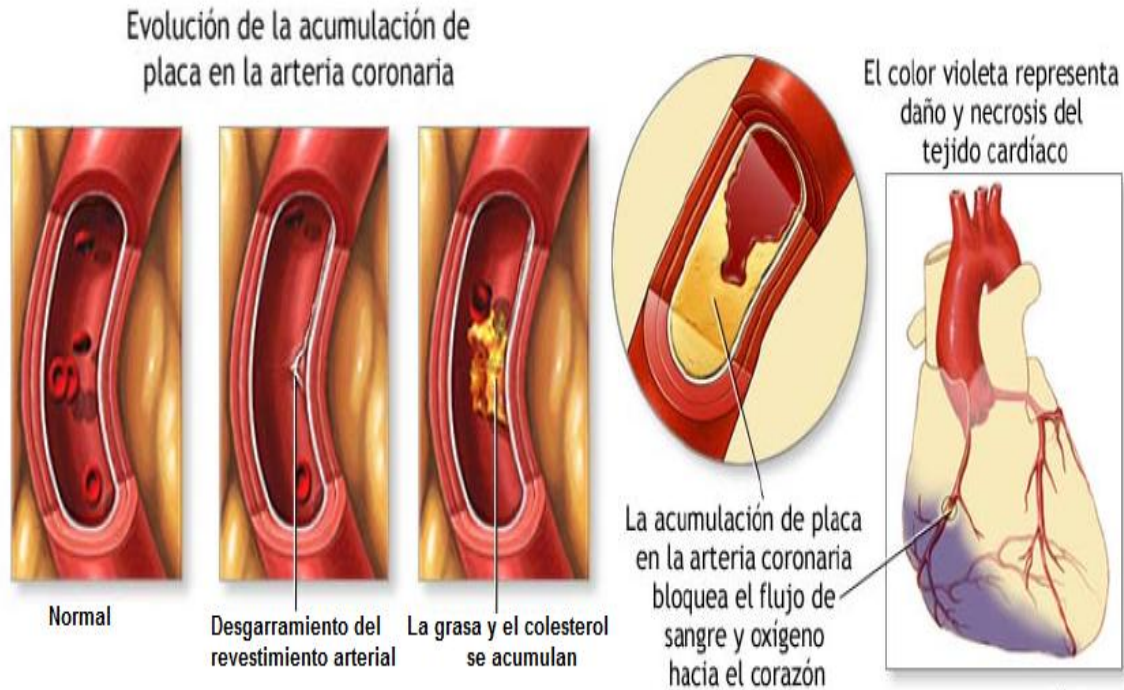




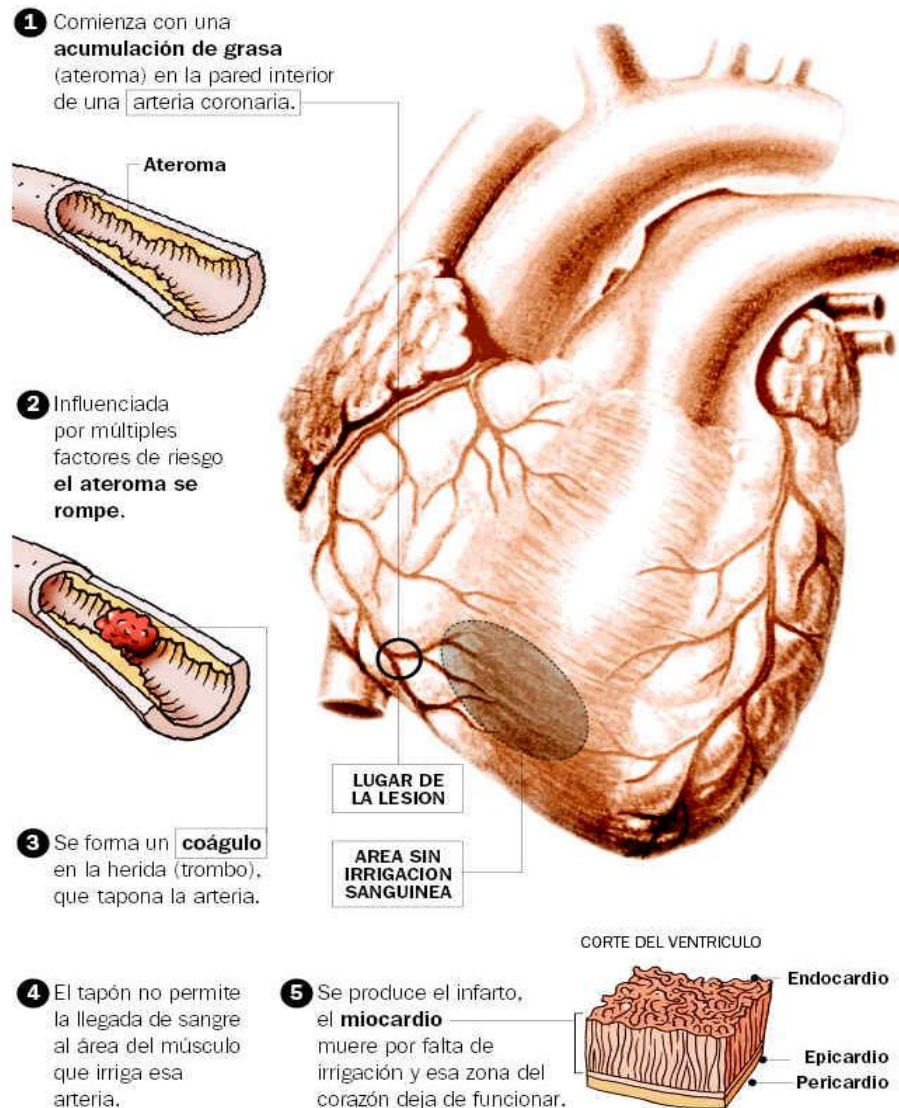
#### 4.2.1.- Formación de la lesión y placa

Cuando el endotelio de la pared arterial se enfrenta a factores de riesgo proinflamatorios y vasoconstrictores como dislipidemia, hormonas, hipertensión, productos de glucooxidación asociados a hiperglucemia o citocinas proinflamatorias derivadas del exceso de tejido adiposo, aumenta la expresión de las moléculas de adhesión lo que promueve adhesión leucocitaria. La trasmigración de estos leucocitos depende en gran parte de la expresión de citocinas reguladas a través de señales asociadas a los históricos factores de riesgo para arteriosclerosis. Una vez que los leucocitos se adhieren a la pared, (fagocitos mononucleares y linfocitos T) envían un mensaje a las células del endotelio y del músculo liso de la pared arterial (Libby, 2005). Los mensajes mayores que se intercambian entre los diferentes tipos de células involucradas en la aterogénesis dependen de mediadores de inflamación e inmunidad, incluyendo moléculas pequeñas como mediadores lipídicos, prostanoïdes y otros derivados del ácido araquidónico (leucotrienos). Otros autacoides como histamina, clásicamente regulan el tono vascular y aumentan la permeabilidad vascular. Recientemente la atención se ha enfocado sobre proteínas mediadoras de inflamación e inmunidad, incluyendo citocinas y componentes del complemento. Hace una década las citocinas virtualmente eran desconocidas para el cardiólogo, hoy son piedra angular en esta especialidad. Como consecuencia mayor del proceso inflamatorio subyacente al ateroma inicial, las células del músculo liso migran de la media a la íntima. Estas células proliferan y elaboran una rica y completa matriz extracelular. En concierto con las células endoteliales y monocitos, secretan una matriz de metaloproteinasas en respuesta a varias señales oxidativas, hemodinámicas, inflamatorias y autoinmunes (Libby, 2005). Esta matriz, en balance con sus inhibidores tisulares endógenos, modula numerosas funciones de las células vasculares, incluyendo activación, proliferación, migración y muerte celular, así como la formación de nuevos vasos, remodelación geométrica, reparación o destrucción de la matriz extracelular de las arterias y del miocardio. Ciertos constituyentes de esta matriz como los proteoglicanos ligados a lipoproteínas, prolongan su residencia en la íntima y produce mayor susceptibilidad y modificación oxidativa. La respuesta inflamatoria se sostiene y propaga a través de productos modificados de lipoproteínas como fosfolípidos oxidativos y productos avanzados de glucosilación oxidativa. Conforme la lesión avanza se presenta la calcificación por mecanismos similares a los relacionados con la osteogénesis. Además de la proliferación y muerte celular (incluyendo apoptosis) que comúnmente ocurre en lesiones

ateroscleróticas establecidas, la muerte de macrófagos puede llevar a depósitos extracelulares de factor tisular. Los lípidos extracelulares acumulados en la íntima pueden coalescer y formar el clásico corazón necrótico-lipídico de la placa. La forma incipiente, reversible de lesión coronaria aparece tempranamente en la vida y evoluciona en el adulto a una placa de ateroma madura que es la causante de cardiopatía isquémica (**Figura 4 y 5**) (Libby,2005).



**Figura 4.** Evolución de la acumulación de placa en la arteria coronaria hasta la necrosis del tejido. (Aguilar, 2008)



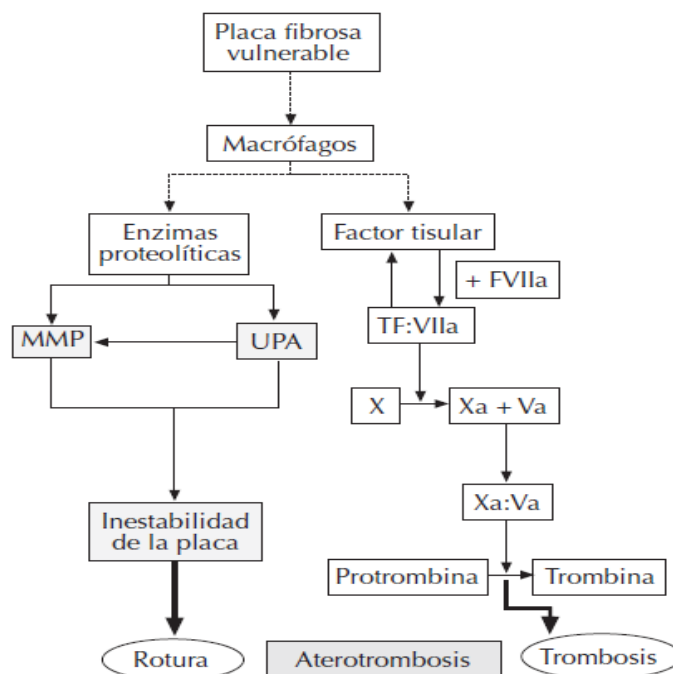
**Figura 5.** Progresión de la arterosclerosis hasta causar el infarto del área sin irrigación sanguínea (Congreso Europeo de Cardiología 2004)

#### 4.2.2.- Placa vulnerable

La sociedad de corazón americana la define como lesiones en fase 2, tipo va de contenido rico en lípidos y cubierta fibroendotelial delgada. Este tipo, generalmente no es obstructiva y (estenosis < 50%) tiene un núcleo lipídico blando en forma semilunar con abundantes células espumosas, macrófagos y linfocitos T activados. Cuando se rompe y se observa agregación plaquetaria y trombosis se convierte en fase 3, tipo VI, que constituye la “placa inestable”, sustrato patológico de los SCA. Los macrófagos y las células espumosas, presentes tanto en el núcleo ateromatoso como en la capa fibrosa, tienen una participación primordial en la vulnerabilidad de la lesión (**Figura 6**) (Stary, 1995).

### 4.2.3.- Ruptura

Es un fenómeno frecuente, sin embargo es probable que una buena parte cursen sin expresión clínica. Se acompaña de trombosis mural y de hemorragia dentro de la placa que puede condicionar una oclusión total o subtotal. Además de la erosión superficial y la fisura profunda, se han identificado otros mecanismos como hemorragia intraplaca y erosión de un nódulo calcificado. La ruptura ocurre con mayor frecuencia en la porción delgada denominada “hombros” o “cuernos”, en donde la colágena está disminuída y la inflamación tiene importante acción a través de enzimas proteolíticas que disuelven la matriz. En la ruptura también participan otros factores biológicos, mecánicos y hemodinámicos (Dalager, 1999, Stary, 1995, Libby, 2005).

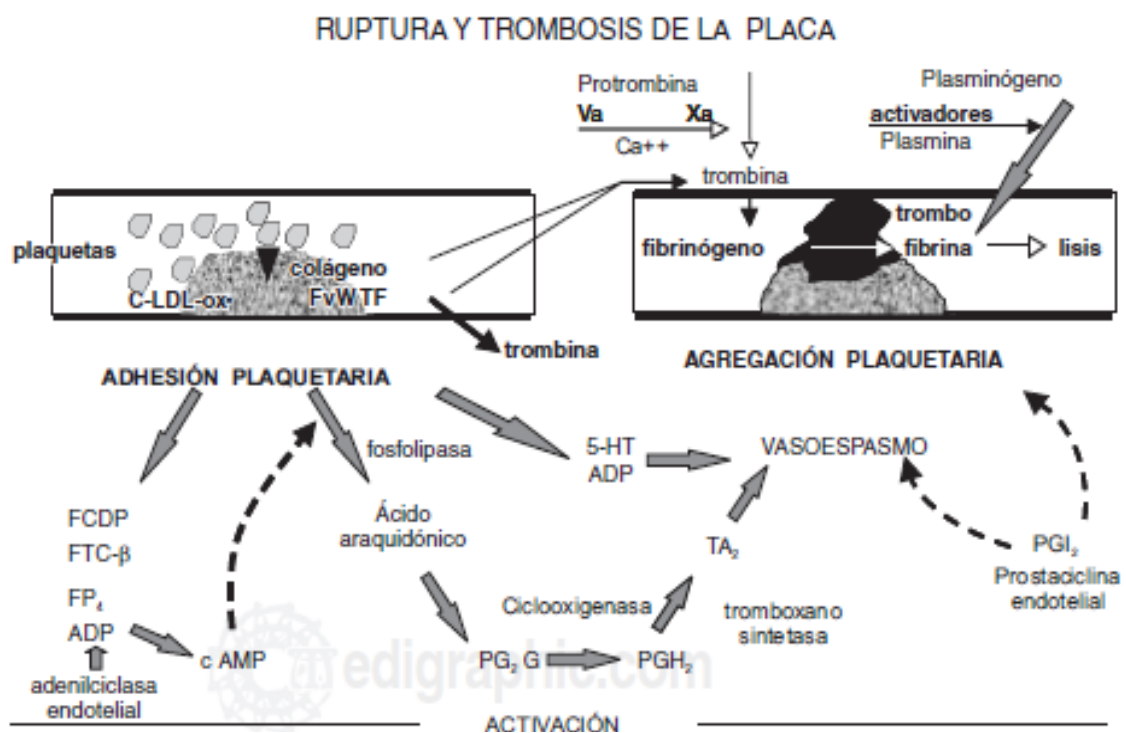


**Figura 6.-** Importancia de los macrófagos en las placas vulnerables. Los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas avanzadas expresan elevadas proporciones de activador del plasminógeno tipo urocinasa (UPA), que mediante la generación de plasmina provocará directamente o indirectamente a través de la activación de prometaloproteinasas (MMP), liberadas también por los macrófagos, la degradación de la matriz extracelular y el debilitamiento de capa fibrosa favoreciendo su rotura. El factor tisular (TF) producido por los macrófagos puede acelerar la formación masiva de un trombo en el lugar de la rotura y contribuir con ello a la oclusión fatal de la luz vascular (T. Padró, 2005).

### 4.2.4.- Trombosis

Se observa en más del 80% de los SCA por ruptura profunda y es el mecanismo más importante en infarto con elevación del ST. El 20% restante se debe a otros mecanismos previamente mencionados (**Figura 7**) (Aguilar, 2008). La trombosis se inicia con actividad plaquetaria seguida de formación fibrina y termina con la

activación de la fibrinólisis endógena, con fenómenos dinámicos de retrombosis y lisis espontánea. La agregación plaquetaria mediante el enlace del fibrinógeno con los receptores GPIIb/IIIa, determinan la activación de la cascada de la coagulación con mayor generación de trombina a través de la vía intrínseca. La trombina se adhiere a las plaquetas y actúa sobre el fibrinógeno del trombo plaquetario (trombo blanco) formando una malla de fibrina que se enlaza al plasminógeno y eritrocitos, formando un trombo rojo mural adherido a la pared del vaso. La vasoconstricción local mediada por tromboxano A<sub>2</sub> y endotelinas contribuye a disminuir el lumen vascular y determina, conjuntamente con el trombo mural, la oclusión total o subtotal del vaso coronario (Stary, 1995, Libby, 2005).



**Figura. 7.** Ruptura y trombosis de la placa de aterosclerosis inestable. Adhesión, activación y agregación plaquetaria. Vasoespasmo. Activación de la cascada de la coagulación. Formación del trombo de fibrina. Activación de la plasmina. Fibrinólisis (Faga,2004, Aguilar,2008).

#### 4.2.5.- Agregación plaquetaria

El equilibrio entre el endotelio y las plaquetas se pierde con la ruptura y exposición de componentes trombogénicos como la LDL-ox, factor tisular y moléculas macroadhesivas como el factor Von Willebrand y el colágeno subendotelial, con lo que se promueve la adhesión plaquetaria a través de receptores glucoproteínicos de superficie como GPIIb y GPIIIa, estableciendo una red de plaquetas en el sitio de la lesión endotelial. Las plaquetas se activan a través de un número importante de agonistas como difosfato de adenosina, tromboxano A<sub>2</sub> y serotonina secretados por



los gránulos plaquetarios, epinefrina circulante y trombina. Como resultado de ésta activación se inicia el proceso de agregación plaquetaria mediado por las GPIIb/IIIa, estructuras receptoras de enlace con el fibrinógeno circulante y el factor de Von Willebrand, con lo que se constituye la vía final de agregación plaquetaria y formación del trombo (Stary, 1995, Libby, 2005).

#### **4.2.6.- Fibrinólisis y retrombosis**

Las cadenas de fibrina-plasminógeno activan el sistema fibrinolítico al liberar activadores tisulares como t-PA y u-PA (urocinasa) que transforman el plasminógeno unido a la fibrina en plasmina, iniciando la degradación de fibrina y lisis del coágulo. La plasmina tiene efecto sobre el fibrinógeno, fibronectina y trombospondina e impide la adhesión de las plaquetas del endotelio dañado. Esta lisis endógena mediada por la vía intrínseca se complementa con el sistema extrínseco mediado por el factor XII. La reperfusión por lisis mejora la perfusión del miocardio en riesgo y las microembolias de fibrina (Llevadot, 2004, Stary, 2005).

### **4.3.- Infarto miocárdico**

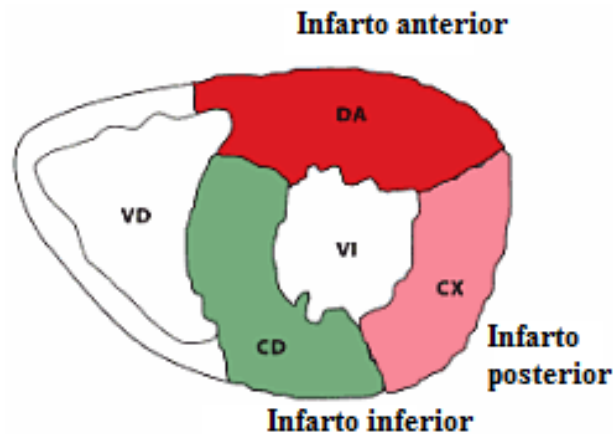
Se produce cuando muere una zona del músculo del corazón (sufre una necrosis). Está producido por la reducción del riego sanguíneo coronario, generalmente está precipitado por una trombosis o hemorragia en una zona aterosclerótica de una arteria coronaria. Hay muchas complicaciones como las arritmias, la insuficiencia cardíaca e incluso la muerte súbita (Fagan, 2004, Fuentes, 1998).

#### **4.3.1.- Tipos de Infarto al miocardio**

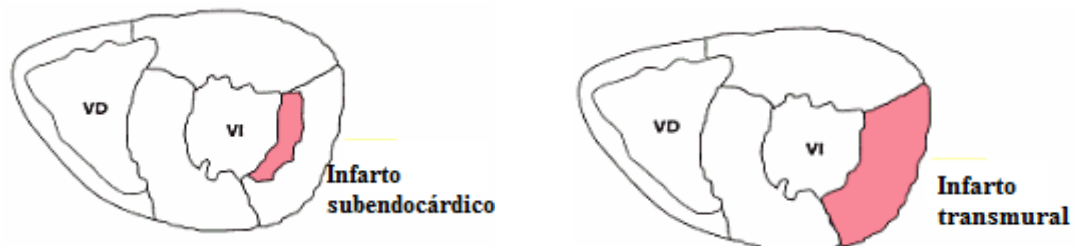
No todos los infartos agudos al miocardio son iguales. La localización y el tamaño van a definir el tipo de infarto, ambas características son definitivas para determinar el pronóstico del paciente que ha sufrido este episodio cardíaco. La localización exacta y el tamaño del infarto dependerán fundamentalmente del lugar y del tamaño del lecho vascular perfundido por el vaso obstruido. Habrá que tener en cuenta también la duración de la oclusión y la existencia previa de vasos colaterales. Estos nuevos vasos pueden haberse formado mucho tiempo atrás y haber estado nutriendo, mejor o peor, la parte de miocardio o músculo cardíaco que no es irrigada por la arteria coronaria obstruida. De forma general, cuando se obstruye la arteria descendente anterior, aparecerán infartos anteriores o anterolaterales, si se obstruye la arteria circunfleja se producirán infartos posteriores o posterolaterales y cuando la



afectada es la coronaria derecha se desarrollan infartos inferiores o inferolaterales (**Figura 8**) (López 2009).



**Figura 8.-** Tipos de infarto de miocardio por localización (I); VD: Ventrículo derecho; VI: Ventrículo izquierdo; DA: Arteria coronaria descendente anterior; CX: Arteria coronaria circunfleja; CD: Arteria coronaria derecha (Fagan,2004).



**Figura 9.-** Tipos de Infarto de miocardio por tamaño (II) VD: Ventrículo derecho; VI: Ventrículo izquierdo (Fagan,2004).

El infarto miocárdico se divide en: a) infarto de miocardio subendocárdico el cual afecta a la capa más interna del miocardio b) infarto de miocardio regional ó transmural que afecta a todo el espesor del segmento miocardio (**figura 9**) (López, 2009, Méndez, 2003).

#### 4.3.1.1.- Infarto al miocardio subendocárdico

Es un infarto de la capa subendocárdica del miocardio. Hay una aterosclerosis difusa en las tres arterias principales. El infarto está provocado por un aumento de la demanda de oxígeno, hipotensión y espasmo vascular. Esto no implica una trombosis superpuesta. La lesión es menos grave que la de infarto transmural y puede ser difusa o regional (López, 2009, Méndez, 2003).



#### 4.3.1.2.- Infarto de miocardio transmural

El infarto transmural afecta a todo el espesor del miocardio. Generalmente implica la oclusión de una arteria coronaria importante que provoca la isquemia de la región específica del corazón. El infarto miocárdico transmural está causado por el cambio agudo de una placa (ulceración, fisura o hemorragia) que provoca una trombosis, agregación plaquetaria y vasoespasmo (raramente). La oclusión completa de un vaso puede provocar un infarto ya que pueden haberse desarrollado colaterales que ayudan a la perfusión. Casi todos los infartos afectan al ventrículo izquierdo, el 15% afectan a ambos ventrículos y el 3 % solo el derecho. Las arterias generalmente infartadas son: (López, 2009; Méndez, 2003).

- Descendente anterior izquierda (50%) que afecta a la pared ventricular anterior izquierda y al tabique ventricular.
- Arteria coronaria derecha (30%) que afecta a las paredes ventriculares izquierdas inferior y posterior y al ventrículo derecho.
- Arteria circunfleja izquierda (20%) que afecta a la pared ventricular lateral izquierda.

#### 4.3.2.- Infarto agudo al miocardio (IAM)

El IAM conocido también como ataque al corazón, es la necrosis o muerte de una porción del músculo cardíaco que se produce cuando se obstruye completamente el flujo sanguíneo en una de las arterias coronarias. Infarto significa “necrosis por falta de riego sanguíneo”, agudo se refiere a “súbito”, mio a “músculo” y cardio a “corazón”. Las manifestaciones del infarto aparecen de forma 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 administración (López, 2009).

También el IAM se define en relación a las características clínicas, electrocardiográficas (ECG), bioquímica y patológica (Tabla I). La Organización Mundial de la Salud sobre la base de estudios de prevalencia, definió el IAM mediante la presencia de por lo menos dos de los criterios siguientes: 1) dolor torácico sugestivo de isquemia típico o atípico; 2) elevación de marcadores de macro necrosis; 3) cambios ECG característicos con presencia de ondas Q patológicas. Por la reciente aparición de biomarcadores (BM) de daño celular agudo, técnicas de imagen y nuevas evidencias sobre la fisiopatogenia del infarto sin elevación del ST





surgió la necesidad de buscar una nueva definición actual que permita estandarizar estudios epidemiológicos y clínicos (Alexanderson, 2006, P.Porela 1999).

**Tabla 1.** Diferentes aspectos en la redefinición del infarto agudo del miocardio.

Patológico	Muerte celular miocárdica
Clínica	Síntomas isquémicos
Bioquímica	BM de muerte celular en estudios de sangre
Electrocardiograma (ECG)	Evidencias de tejido con pérdida de actividad eléctrica (ondas Q)
Alteraciones funcionales	Reducción o pérdida de perfusión tisular. Anormalidades en la contractilidad parietal del corazón

#### **4.4.- La aterosclerosis y el Factor de Transcripción Nuclear $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

Aunque las complicaciones clínicamente significativas de la aterosclerosis, tales como: las placas de ulceración, la ruptura, la trombosis, la inestabilidad y el avance de las placas arterioescleróticas; la comprensión de los mecanismos de la formación de la lesión temprana ofrece la esperanza de intervenir para retrasar o prevenir la progresión de la lesión y las complicaciones. Un grupo selecto de factores de transcripción puede ser crítico para la iniciación y la expansión de las lesiones, así como en la protección de la pared del vaso y la formación de la lesión aterosclerótica, en este panorama, nos centraremos en el factor NF- $\kappa$ B cuya activación se ha relacionado con la aparición de la aterosclerosis (Tucker,2001).

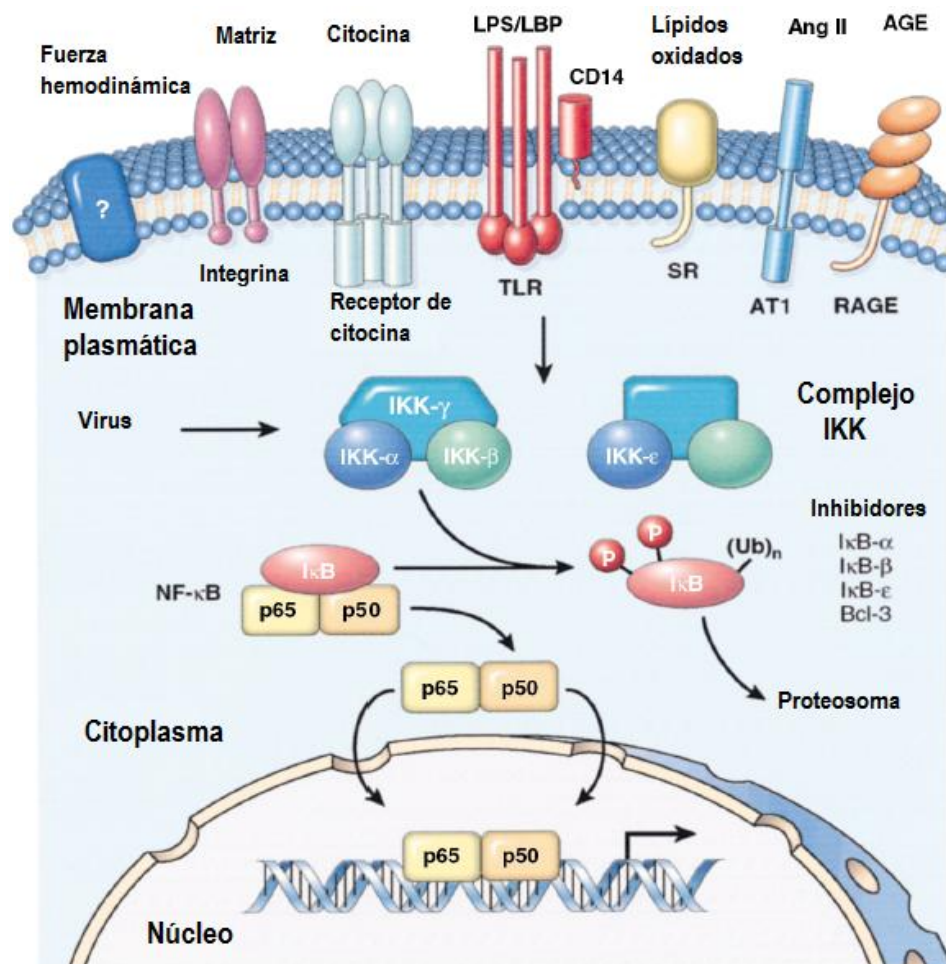
##### **4.4.1.- Factor de Transcripción Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B)**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción multifuncional que está implicado en la regulación de diversos fenómenos biológicos y en múltiples estados de enfermedad, incluyendo el desarrollo de las células B, el cáncer, la inflamación, la inmunidad innata y adaptativa, el crecimiento y muerte celular, respuesta al estrés, el crecimiento y remodelación del tejido, caquexia, aterosclerosis, asma, artritis, enfermedades inflamatorias, diabetes, accidente cerebrovascular y problemas cardiovasculares. Descubierta por primera vez en 1986 por Sen y Baltimore (W. Keith, 2003). El NF- $\kappa$ B se ha definido como un factor de transcripción ubicuo detectado de forma inactiva casi en todas las células y cuya activación involucra la regulación de más de 200 genes en diversos tejidos (Hernández, 2008, W. Keith,



2005). El NF- $\kappa$ B activa una variedad de genes diana relevantes para la fisiopatología de la pared del vaso, incluyendo citocinas, quimiocinas, y moléculas de adhesión leucocitaria, así como genes que regulan la proliferación de las células y median la supervivencia celular.

El NF $\kappa$ -B también activa el gen del I $\kappa$ B- $\alpha$  con la reposición de su inhibidor citoplasmático propio. Restaurada la expresión de I $\kappa$ B- $\alpha$ , disminuye la activación y la expresión del NF- $\kappa$ B dependiente de los genes. El sistema NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B es autoregulatorio y asegura que la inducción de la activación del NF- $\kappa$ B sea transitoria y regrese a la célula a su estado de reposo. La modulación fisiológica y la activación patológica del sistema NF- $\kappa$ B pueden contribuir a los cambios de expresión que ocurren durante la aterogénesis (Tucker, 2001). Se ha demostrado que el factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B) puede ser activado por diversos estímulos o moléculas en un estado patológico o bien por la interacción con agentes patógenos o no patógenos, muchos de los diversos agentes asociados con el inicio de la formación de la lesión interactúan con receptores específicos como pueden ser por fuerza hemodinámica, citocinas, lipopolisacáridos (LPS), angiotensina II (Ang II) y lípidos oxidados (LDLox)(Figura 10).

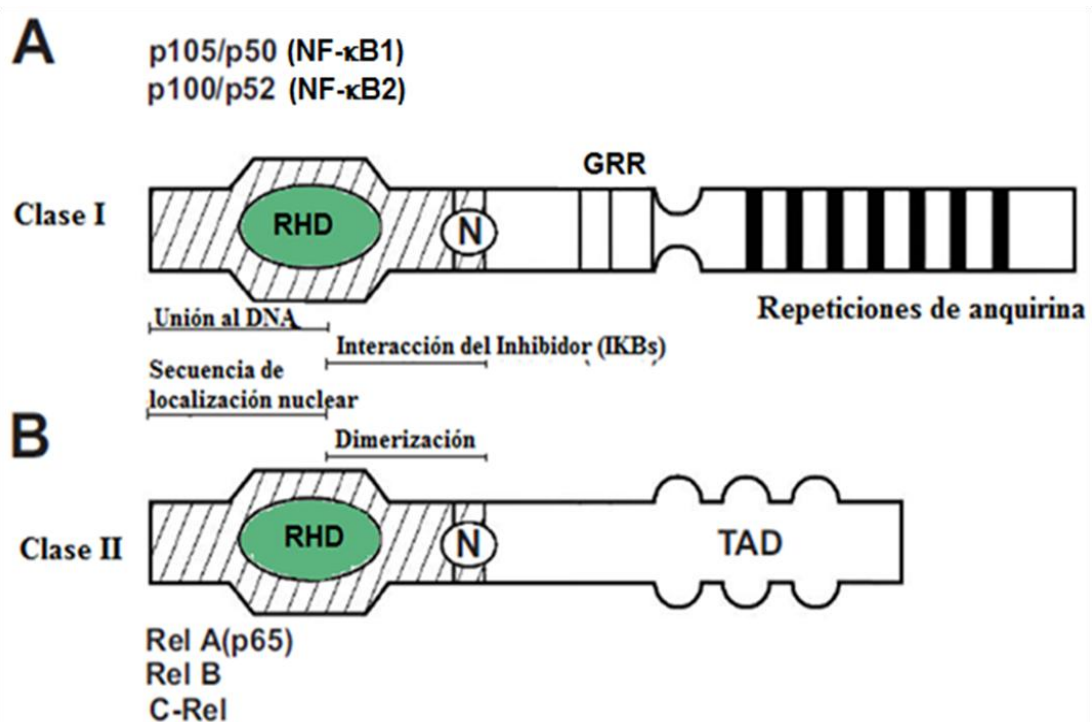


**Figura 10.-** Representación esquemática de NF- $\kappa$ B como integrador en la aterogénesis. Muchos de los diversos agentes asociados con el inicio de la formación de la lesión interactúan con receptores específicos. La angiotensina II (Ang II), citocinas, productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) o lípidos oxidados se unen al receptor de Ang II (AT1), receptores de citocinas, el receptor para AGE (RAGE) o el receptor scavenger (SR), respectivamente. LPS interactúa con un complejo de proteína de unión LPS (LBP), CD14 y un receptor de tipo toll (TLR). Los mecanismos por los que las fuerzas hemodinámicas son percibidas por las células vasculares son sólo parcialmente apreciados pero puede implicar receptores específicos o enlaces entre el citoesqueleto, integrinas y ECM (células de músculo liso). La unión del ligando por la mayoría de estos receptores da como resultado el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la activación de las cinasas intermedias (no mostradas). Estos eventos conducen finalmente a la activación de un complejo de IKK. El mejor complejo caracterizado como cinasa consta de IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  y el componente estructural IKK- $\gamma$ , aunque otros complejos similares pueden existir. El complejo activado IKK fosforila específicamente a I $\kappa$ Bs, que luego se someten a un proceso de poliubiquitinación rápida antes de la degradación por el proteosoma. Después de la liberación del inhibidor, los dímeros del NF- $\kappa$ B se translocan desde el citoplasma hasta el núcleo, donde se unen a genes diana y estimulan la transcripción de conjuntos específicos de genes relevantes en la fisiopatología de la pared del vaso (Modificado de Tucker, 2001).

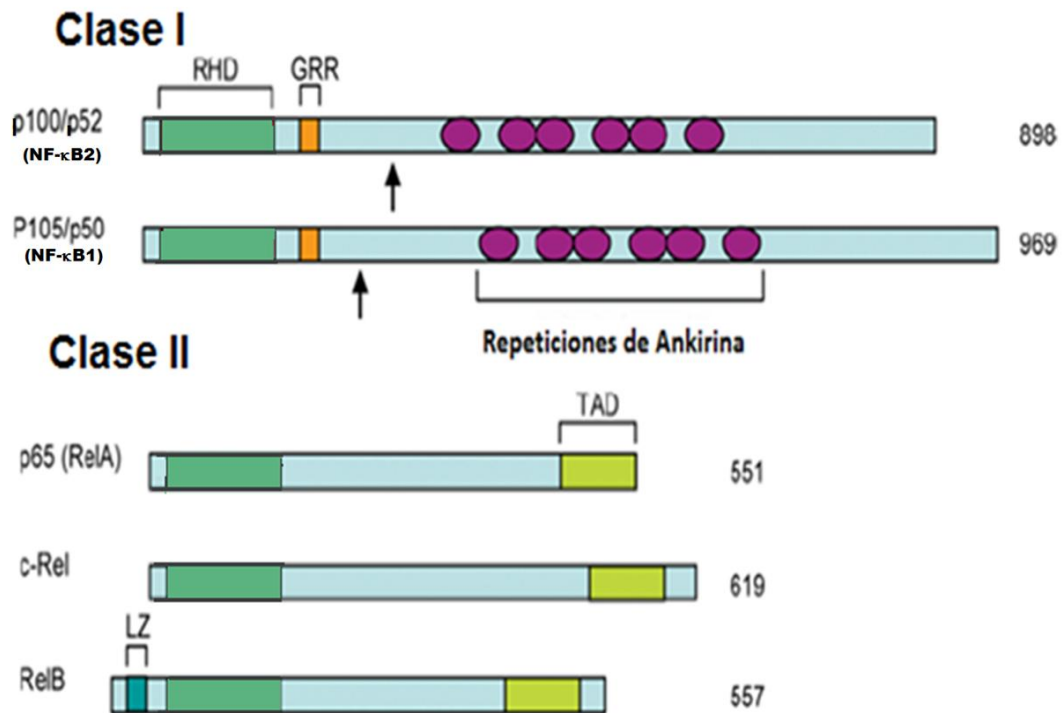
#### 4.4.2.- La activación y Función del NF- $\kappa$ B

La familia de factores de transcripción eucarióticos Rel/NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco proteínas relacionadas estructuralmente y se dividen en dos clases. Las de clase I son las proteínas p105/p50 o NF- $\kappa$ B1, p100/p52 o NF- $\kappa$ B2 y las de clase II p65/Rel A p75/c-Rel y p68/RelB como se muestra en la **Figura 11 y Figura 12** (Gentzon, 2006, Hernández, 2008, Latanich, 2009). Todos los miembros de ésta

familia se caracterizan por la presencia de un dominio común conservado llamado RHD (Rel Homology Domain), llamado así por el oncogén v-rel el primer miembro de la familia descrita. El RHD es de aproximadamente 300 aminoácidos de longitud. El dominio RHD tiene varias funciones a través de él, los miembros de esta familia se unen y forman homo o hetero-dímeros, las formas más comunes están constituidas por los hetero-dímeros p50/p65 o p52/p65. Este dominio además es el sitio de unión para sus inhibidores: los I $\kappa$ Bs, contiene las secuencias de localización nuclear y las secuencias de unión al ADN (Salomón, 2008, W. Keith, 2005). La actividad del NF- $\kappa$ B depende de su localización celular. Si está en el citoplasma se encuentra formando un complejo trimérico con alguno de sus inhibidores (I $\kappa$ B) que oculta sus secuencias de destino nuclear y es por tanto, transcripcionalmente inactivo.

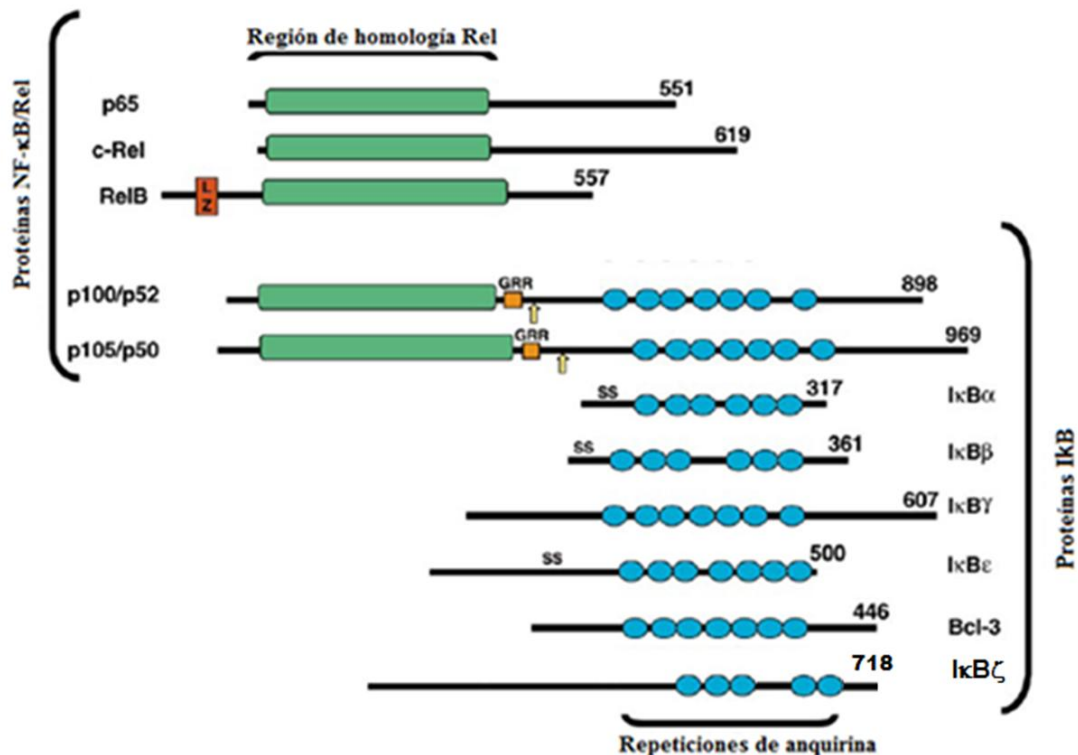


**Figura. 11.** Los miembros de la familia NF- $\kappa$ B de factores de transcripción. La familia del NF- $\kappa$ B se compone de 5 factores de transcripción, divididos en dos clases. La clase I p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) y subunidades precursoras p100/p52 (NF- $\kappa$ B2) contienen C-terminales en las repeticiones anquirina y regiones interiores ricas en glicina (GRR), esenciales para la determinación del sitio de escisión. Las proteínas de clase II Rel A(p65), Rel B y c-Rel contienen uno o más C-terminal de dominios de transactivación. Cada uno de los cinco factores, muestran en su parte el N-terminal del dominio conservado de Homología Rel (RHD) cuyas funciones son numerosas. GRR, Región Rico en Glicina, N, Secuencias de localización Nuclear, TAD (Sitio de Transactivación) (Modificado de Salomón 2008).



**Figura 12.** Familia de proteínas del NF- $\kappa$ B. Las cinco proteínas de mamíferos Rel están relacionadas [P65 (de RelA), c-Rel, RelB, p100/p52 y p105/p50] contienen una RHD, que media su dimerización y unión al ADN. Sólo RelA, c-Rel, y RelB contienen un TAD C-terminal. p100 y p105 contienen repeticiones de anquirina (óvalos de color púrpura), que median su unión a dímeros del NF- $\kappa$ B con el fin de secuestrarlos en el citoplasma. p100 y p105 requieren de ubiquitina para el procesamiento proteolítico de la porción C-terminal para generar las subunidades p52 y p50 del NF- $\kappa$ B, respectivamente (el punto de escisión está indicado con una flecha). El número de aminoácidos en cada proteína se da en el lado derecho. GRR, región rico en glicina, LZ, cremallera leucina, TAD, RHD, Dominio de Homología Rel (Sitio de Transactivación) (Modificado de Kim 2010).

Cuando el I $\kappa$ B se fosforila, éste es ubiquitinado, lo que permite su reconocimiento por el proteosoma que lo degrada, liberando al dímero del NF- $\kappa$ B (por ejemplo: p50/p65) que se trasloca al núcleo, donde activa a sus genes blanco. Los I $\kappa$ Bs fueron identificados originalmente como factores que inhiben la actividad del NF- $\kappa$ B debido a una interacción proteína-proteína. Los I $\kappa$ Bs constituyen una familia de al menos 8 miembros: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p105, p100 y Bcl3, que están involucrados en el control de la activación del NF- $\kappa$ B (**Figura 13**) (Gentzon, 2006, Kim 2010). Los I $\kappa$ Bs se unen a los dímeros del NF- $\kappa$ B a través de motivos conservados de anquirina y bloquean estéricamente la función de sus secuencias de localización nuclear, lo que permite su retención en el citoplasma.



**Figura 13.-** Representación esquemática de los miembros de los mamíferos Rel/NF- $\kappa$ B y familias de proteínas I $\kappa$ Bs. Los números de los aminoácidos de cada proteína se enumeran a la derecha; las secuencias de mamíferos corresponden a las proteínas humanas. Las flechas apuntan hacia la ubicación aproximada de los residuos COOH-terminal de p50 y p52 (tras el procesamiento de p105 y p100, respectivamente). Los pares de residuos de serina necesarios para la degradación inducible de I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  son representados por SS; LZ, cremallera leucina; GRR, región rica en glicina; SRR, región rica en serina. El número y la posición de repeticiones de anquirina se determinaron sobre la base de la homología y la estructura de rayos X de I $\kappa$ B $\alpha$  (Modificado de Rothwarf 1999).

Para que el NF- $\kappa$ B tenga acceso a su sitio de acción en el núcleo; el complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B debe ser disociado a través de la fosforilación de su inhibidor. Este proceso que en primera instancia parece tan sencillo, requiere la participación interactiva y también guiada por procesos de fosforilación de proteínas citoplásmicas que se encuentran por arriba en la vía de activación del NF- $\kappa$ B, llamada cinasas de los inhibidores de I $\kappa$ B (IKK). Los I $\kappa$ Bs mejor estudiados son el  $\alpha$  y el  $\beta$ , ambos se fosforilan en respuesta a diferentes estímulos en los residuos de serinas: S32 y S36. Una vez que los I $\kappa$ Bs se han fosforilado, se inicia un proceso de ubiquitinación y de su degradación en el proteosoma (Keith, 2005, Kim 2010, Rothwarf 1999). Este mecanismo libera al NF- $\kappa$ B, ya que al desaparecer el inhibidor, se descubre la secuencia de localización nuclear y permite al dímero ser translocado al núcleo, quedando de forma libre para unirse a promotores de genes con sitios de unión  $\kappa$ B e iniciar la transcripción de los mismos.



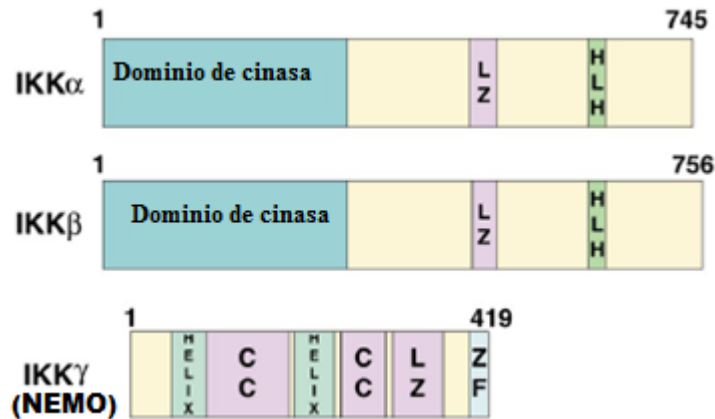
#### 4.4.3.-Señalización mediada por la activación del NF- $\kappa$ B

En la célula, los dímeros de NF- $\kappa$ B se complejan con una sola molécula de la familia I $\kappa$ B. Las proteínas I $\kappa$ Bs contienen motivos de repetición de anquirina de 30-33 aminoácidos que median la interacción y prevención de la función de las proteínas de la familia del RHD mediante la reducción o el bloqueo de su localización nuclear. La prevención de la localización nuclear de NF- $\kappa$ B es equivalente a evitar la acción del NF- $\kappa$ B sobre genes (Gentzon, 2006, Kim 2010, W. Keith 2005). Como consecuencia de la estimulación de la vía de señalización de las proteínas I $\kappa$ B, éstas son fosforiladas, lo que conduce a la degradación y/o la disociación del I $\kappa$ B del NF- $\kappa$ B. Esto permite que el NF- $\kappa$ B se trasloque al núcleo, donde se puede unir al ADN y contribuir a la expresión génica (Kim 2010). Aunque las proteínas I $\kappa$ B tienen serina múltiple y restos de tirosina que son fosforilados de manera regulada, la fosforilación específica de Ser32 y Ser36 de los I $\kappa$ Bs conducen a la ubiquitinación de sitio específicos y la degradación de I $\kappa$ B vía proteosoma mediada por proteólisis. Las proteínas I $\kappa$ Bs tienen otras Serinas análogas y que se someten a la fosforilación de la serina, ubiquitinación y degradación de una manera similar. Puesto que la activación de IKK es transitoria, la fosforilación del I $\kappa$ B es de pulso como en carácter, lo que conduce a un pico transitorio de localización y activación nuclear del NF- $\kappa$ B. Como las proteínas I $\kappa$ B son resintetizadas, especialmente el I $\kappa$ B $\alpha$ , se une a NF- $\kappa$ B en el núcleo y lo transporta al citoplasma al terminar su actividad. Este mecanismo de activación del NF- $\kappa$ B ha demostrado ser directo debido a la activación del complejo IKK, que se compone principalmente de múltiples cinasas de I $\kappa$ B (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) y la subunidad reguladora NEMO (IKK $\gamma$ ) (**Figura 14**) (Gentzon de 2006, Kim 2010, Keith 2005). Además del bien caracterizado complejo IKK, hay evidencia de la existencia de dos complejos adicionales que contienen isoformas nuevas de IKK. Estos se han descrito en un número limitado de tipos de células, y se desconoce si estos complejos desempeñan un papel en la señalización del NF- $\kappa$ B en el infarto. El complejo IKK está directamente activado por fosforilación, principalmente por el NF- $\kappa$ B que induce la cinasa (NIK). Sin embargo, el complejo IKK también puede ser activado por mitógenos activados por las proteínas cinasas cinasas (MEKKs), por mitógenos-activados por proteínas cinasas cinasa (MEK), ASK1, TAK1, y por la proteína cinasa C (PKC) (**Figura 15**). Curiosamente, los MEKKs están estructuralmente relacionados con NIK y junto con las MEK,





ASK1, TAK1, y PKCS, también se sabe que se activa la vía de proteína cinasa estimulada por mitógenos (MAPK). Esto explica probables aspectos de interferencia de señalización entre la MAPK y las vías de señalización de NF- $\kappa$ B. En otro nivel, cada una de las tres principales vías de MAPK p38, ERK, JNK se ha demostrado que fosforilan a p65 o p50 en algunos tipos de células, afectan a la actividad transcripcional. La señal principal por arriba de la señalización NIK/IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B es la vía de señalización de TNF- $\alpha$  (Keith, 2003, 2005, Brasier, 2006).



**Figura 14.-** Diagrama esquemático que muestra las subunidades conocidas del complejo IKK y sus supuestos motivos funcionales y estructurales. CC, en espiral bobina; Helix,  $\alpha$ - hélice; HLH, hélice-bucle-hélice, LZ, cremallera de leucina, ZF, dedo de zinc (Modificado de Rothwarf, 1999).

El NF- $\kappa$ B también puede ser activado por la fosforilación específica de Tyr42 del I $\kappa$ B. Este evento de fosforilación está mediada independientemente de la fosforilación de la serina y puede ocurrir al mismo tiempo o no. Esta vía está muy bien definida y parece ser activada por estímulos crónicos, especialmente aquellos que implican múltiples citocinas, incluyendo el factor de crecimiento nervioso (NGF), el interferón (IFN)- $\gamma$ , y en algunos tipos de células de estimulación crónica TNF- $\alpha$ . Se produce la fosforilación de Tyr42 subsiguiente a la activación de la proteína tirosina cinasa c-Src e implica la activación de dos cinasas adicionales de tirosina, p56 (LCK) y 70-ZAP. La fosforilación de la Tyr42 del I $\kappa$ B $\alpha$  resulta en la liberación no degradativa de moléculas inhibitoras I $\kappa$ B del NF- $\kappa$ B. Además de los sitios de fosforilación reguladoras discutidos, hay múltiples sitios de fosforilación en la porción C-terminal de los I $\kappa$ B. Aunque la fosforilación en algunos de estos sitios está implicada la modulación de la estabilidad de la proteína I $\kappa$ B, éstos no han demostrado ser suficiente para la regulación de la degradación del I $\kappa$ B y activación del NF- $\kappa$ B. La evidencia actual apoya la posibilidad de que las proteínas I $\kappa$ B reprimen la activación del NF- $\kappa$ B por dos mecanismos. En primer lugar, se unen con

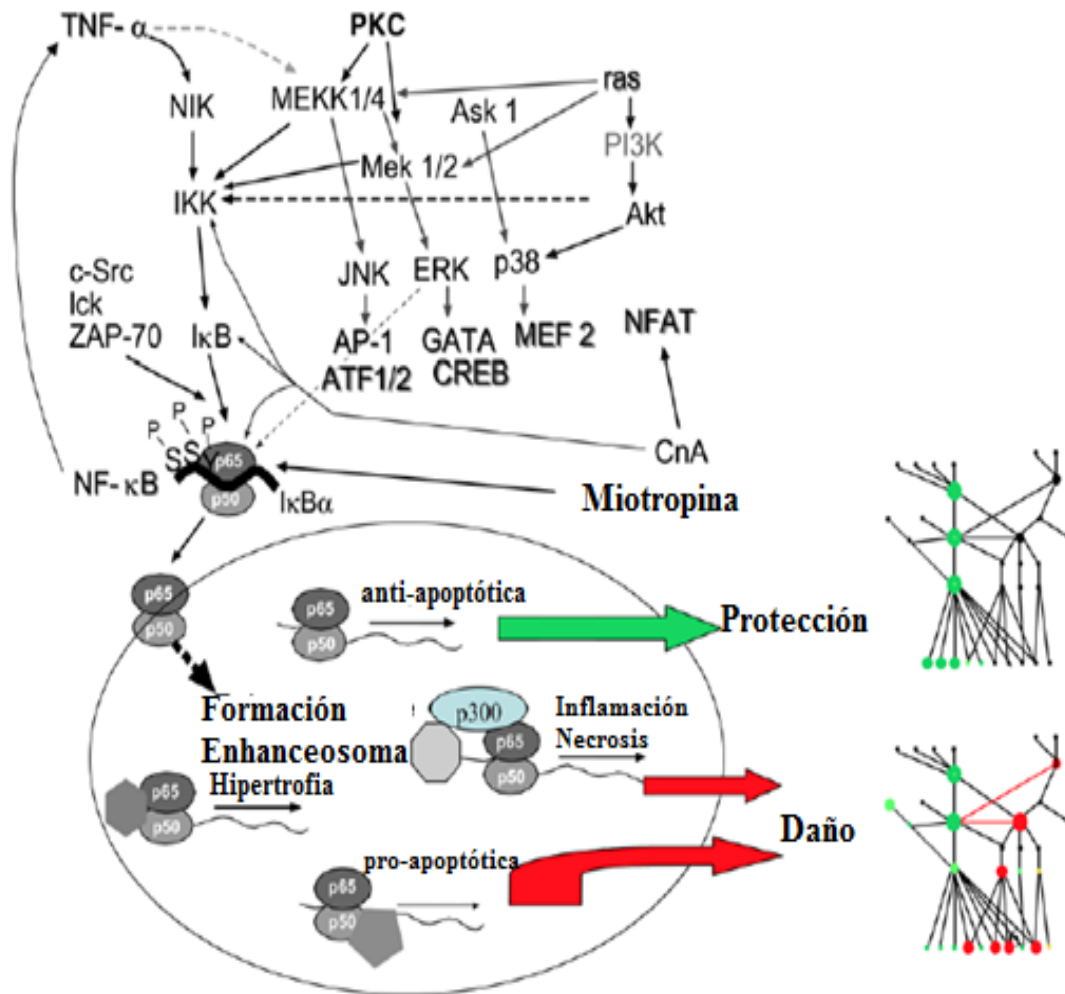




dímeros del NF- $\kappa$ B, manteniendo un equilibrio citoplasmático-nuclear que es desfavorable para la activación del NF- $\kappa$ B en ausencia de estimulación. En segundo lugar, seguro que las proteínas de I $\kappa$ B inhiben la actividad vinculante del NF- $\kappa$ B al ADN, lo que está bien documentado por I $\kappa$ B $\alpha$ . La acción de I $\kappa$ B $\alpha$  en el núcleo elimina la cromatina de NF- $\kappa$ B y sirve para disminuir los niveles nucleares de NF- $\kappa$ B y poner fin a su actividad (Keith, 2005, Brasier, 2010). Paradójicamente, el I $\kappa$ B y BCL3, no fosforilados se cree que actúan como chaperones para NF- $\kappa$ B y no afectan la unión al ADN de los dímeros NF- $\kappa$ B. Se ha demostrado que complejo nuclear NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  se une al ADN y se sabe que BCL3 actúa positivamente en la activación del NF- $\kappa$ B. De esta manera, estas proteínas I $\kappa$ B's pueden prevenir la acción del I $\kappa$ B $\alpha$ , prolongando de este modo la activación del NF- $\kappa$ B. De manera similar, una proteína de interés en el sistema cardiaco, la Miotrofina, se sabe que influye positivamente en la activación del NF- $\kappa$ B. La Miotrofina contiene repeticiones de anquirinas relacionadas con las proteínas  $\kappa$ B, asociados con NF- $\kappa$ B, y promueve la hipertrofia cardiaca. Múltiples vías de señalización afectan a la capacidad de NF- $\kappa$ B para unirse al ADN y para activar la transcripción de genes. Algunos de estos, incluyendo MAPK, PKC, PKA, Akt, NIK/IKK, CaMKIV y las vías de CK II, actúan directamente para fosforilar subunidades de NF- $\kappa$ B y el aumento de la transactivación del NF- $\kappa$ B depende de los genes. A la inversa, varias fosfatasas, incluyendo la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la calcineurina (PP2B), son capaces de defosforilar subunidades del NF- $\kappa$ B, así como de I $\kappa$ B $\alpha$ , con efectos correspondientemente opuestos en diferentes circunstancias (Keith, 2003, 2005). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que existe en medio de una red de cascadas de señalización y de redes transcripcionales. No está claro en qué medida el NF- $\kappa$ B-dependiente activa la expresión génica posterior a su translocación nuclear, la modificación post-translacional de subunidades del NF- $\kappa$ B y las interacciones entre las subunidades del NF- $\kappa$ B y otros componentes de genes específicos reguladores del NF- $\kappa$ B. Así, en la búsqueda de la base mecánica de determinados efectos de la biología y la enfermedad del NF- $\kappa$ B, se debe evaluar, cómo los genes dependientes del NF- $\kappa$ B están regulados en respuesta a diferentes estímulos para mediar efectos biológicos específicos o efectos fisiopatológicos. En este sentido, parece probable que la composición y el regulador de las interacciones entre el NF- $\kappa$ B y otras proteínas que comprenden el complejo amplificador (enhanceosomas) del NF- $\kappa$ B



dependientes subyacen la capacidad de NF- $\kappa$ B para activar determinados genes programados después de estímulos específicos (Brasier,2006 Keith 2005).



**Figura. 15.** La red de señalización que activa el NF- $\kappa$ B las interacciones combinatorias a nivel promotor/complejo amplificador para determinar la especificidad de la acción del NF- $\kappa$ B mediante la modulación de redes dependientes de transcripción de NF- $\kappa$ B. Múltiples cascadas de señalización activan o contribuyen a la activación de NF- $\kappa$ B por la modulación de su translocación nuclear y la modificación postraducciona. Después de la translocación al núcleo, el NF- $\kappa$ B es capaz de unirse a múltiples promotores, contribuyendo a la formación del complejo amplificador (enhanceosoma). Algunos genes se activan directamente por la acción de NF- $\kappa$ B, mientras que para otros promotores u otros componentes del complejo amplificador son limitantes de la velocidad. En última instancia, las interacciones específicas entre los componentes del del complejo amplificador, incluyendo NF- $\kappa$ B, determinan si el gen se transcribe, la amplitud de la activación (o represión) y la cinética de la activación. Dado que algunos de los otros factores de transcripción y co-factores se expresan o se activan con cascadas de señalización celular, el complejo amplificador representa un nivel de integración de la señal, además de los conocidos por estar involucrados en la activación del NF- $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B está situado en un centro importante en la red de señalización celular en general y la potencia específica de redes dependientes de transcripción del NF- $\kappa$ B determina efectos celulares específicos, como se indica. Los diagramas de la derecha representan diagramas ejemplares de red, que muestra cómo la integración diferencial de señales puede resultar en una salida diferente (protección frente a lesiones) los genes que se expresan dependen del NF- $\kappa$ B. (Sombra de puntos refleja actividad/niveles de expresión.) Modificado de Keith, 2005).



#### 4.4.4.- Genes dependientes de NF- $\kappa$ B

El NF- $\kappa$ B es conocido por regular más de 200 genes de expresión en numerosos tipos de células en respuesta a una variedad de estímulos. Una breve lista de genes dependientes del NF- $\kappa$ B conocidos por afectar la biología cardiovascular se presentan en la **Tabla 2**. El NF- $\kappa$ B regula los genes que afectan la producción de óxido nítrico, biosíntesis de prostaglandinas, el manejo del calcio, la función contráctil de cardiomiocitos, la supervivencia celular, la muerte celular, regulación del ciclo celular, respuesta a estrés, las proteínas antioxidantes, remodelación de la matriz extracelular, adhesión celular, factores natriuréticos, los genes de respuesta temprana, citocinas, receptores de citocinas, proteínas quimioatrayentes, la telomerasa y la proteína C-reactiva. Además, el NF- $\kappa$ B activa los genes que codifican la transcripción entre ellos las subunidades p65, c-Rel, NF- $\kappa$ B-1 y NF- $\kappa$ B-2, así como las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  y I $\kappa$ BL. De la identidad de estos genes, es obvio que el NF- $\kappa$ B juega un papel importante en múltiples aspectos potencialmente importantes en la biología cardiovascular normal, así como de la función de la fisiopatología cardíaca. Curiosamente, el NF- $\kappa$ B regula la expresión de genes que están involucrados en respuestas opuestas, tales como, el crecimiento o la muerte celular (Keith 2005, Kim 2010).

Delinear los detalles mecanicistas de esta red tiene importantes implicaciones para la comprensión del papel del NF- $\kappa$ B y sus genes “río abajo” en estados de enfermedad cardiovascular y de desarrollar intervenciones terapéuticas basadas en la optimización de los efectos beneficiosos y reducir o bloquear los efectos perjudiciales de la señalización del NF- $\kappa$ B (Keith, 2005).



**Tabla 2.** Lista breve de los genes dependientes de NF- $\kappa$ B que pueden afectar la decisión entre la muerte celular o supervivencia y lesiones o protección en el corazón. Los genes que son conocidos por regular o por tener sitios de unión de promotores de NF- $\kappa$ B en el ADN y activados o reprimidos después de I/R, o que participan en los procesos fisiopatológicos relacionados con I/R, protección cardiovascular o PC (precondicionamiento isquémico).

Tipo de Gen	Genes específicos
La muerte celular/apoptosis	FasL, Fas [CD95], Bax, p53 Bad, caspasa 8, caspasa 11
Otros genes activados y con efecto después de la lesión I/R o inflamación	Factor tisular-1, activador del plasminógeno[PAI-1], el receptor activador proliferador de peroxisoma g[PPAR $\gamma$ ]
Pro-supervivencia/anti-apoptóticas Genes cardioprotectores	Bcl-XL, Bcl2, IAP1 / 2, XIAP, A20, IEX-1 FGF1 / 2, $\beta$ -cristalina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), 12-lipoxigenasa (12-LO), receptor de adenosina A1.
Receptor de la bradicinina B1 Genes activados después de I/R que son modificados por PC isquémico	iNOS, Cox2, HO-1, proteínas de choque térmico 27,70, inhibidor del activador del plasminógeno-1
Los factores de transcripción implicados en la lesión I/R o cardioprotección NOS y la biosíntesis de prostaglandina Genes de manejo de calcio Genes relacionados con las citocinas	junB, NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, RelB, Stat5a, Stat1, Stat3, c-myc, c-myb, c-Rel, IRF1/2/4/7, A20 iNOS, nNOS, eNOS, Cox 1, Cox 2 PLN, SERCA, Ryr, calsecuestrina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , CT-1, LIF, TNFR1 [p80], TNFR2 [p75], TRAF1, TRAF2
Genes relacionados con NF- $\kappa$ B	p65, p50, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$
Genes de respuesta al estrés	angiotensina 11, citocromo p450, MAP4K1
Genes de adhesión celular	La fibronectina, ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, selectina E



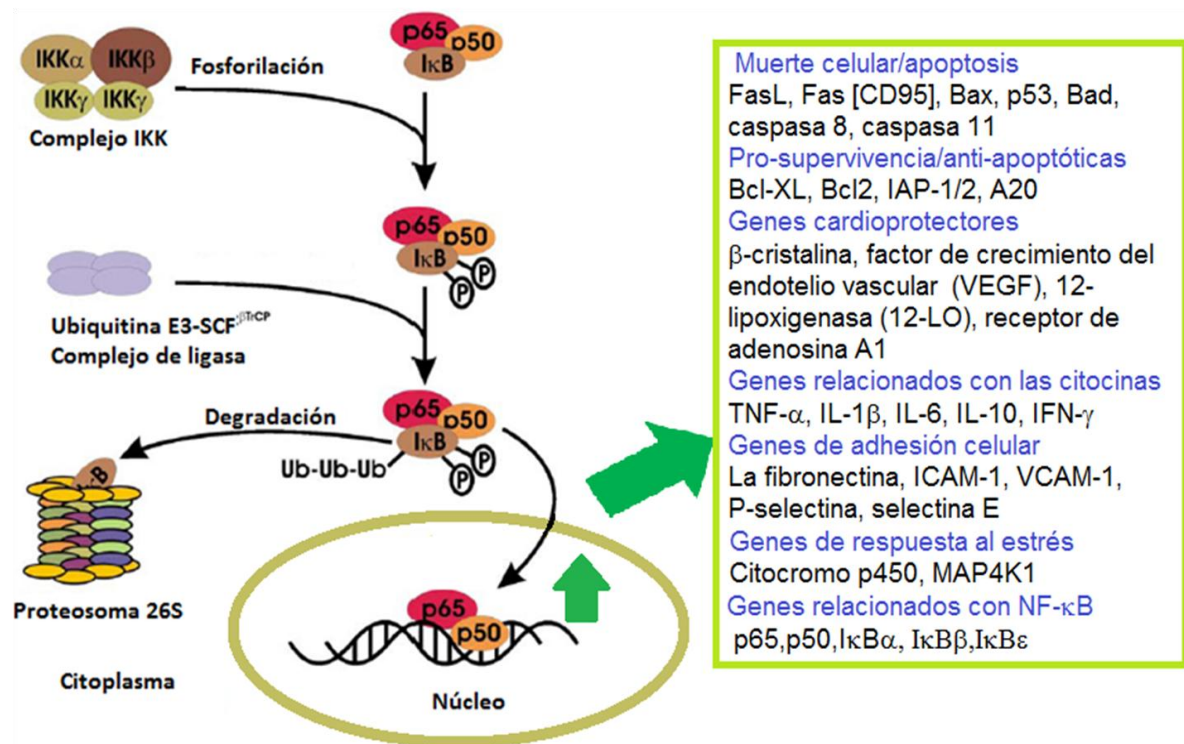
#### 4.5.- Transducción de señales y el NF- $\kappa$ B: La activación de la Vía Canónica del NF- $\kappa$ B y las Enfermedades cardiovasculares

Los estudios en células inmunológicas han proporcionado mucha de la información sobre los componentes ampliamente aceptados sobre la señalización de esta vía. Como se muestra en la **Figura 16**, ésta cascada, a menudo descrita como lineal y directa en vez de red, presenta enlaces de estímulos extracelulares a la activación de la expresión génica. La señalización de NF- $\kappa$ B se inicia a través de la fosforilación de estímulos inducidos de inhibidores- $\kappa$ B ( $I\kappa$ B) en dos residuos de serina conservados (es decir, Ser-32 y Ser-36) y/o un residuo de tirosina (Tyr-42). Este paso inicial, es esencial en la orientación para la degradación del  $I\kappa$ B que está normalmente catalizada por las cinasas inhibidoras kappaB (IKKs), que forman un complejo macromolecular de señalización que comprende una subunidad reguladora (IKK $\gamma$ ) (También denominado NF- $\kappa$ B esencial modificador o NEMO), y dos cinasas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) (R. Brasier, 2006). La Fosforilación del  $I\kappa$ B facilita su poliubiquitinación y su degradación subsiguiente. La pérdida del inhibidor desenmascara una secuencia de localización nuclear de dímeros del factor de transcripción, más comúnmente encontrados como el dímero p65/p50, promoviendo su translocación al núcleo, donde el NF- $\kappa$ B se une a secuencias específicas dentro de los promotores o regiones potenciadoras dentro de los genes diana (Gentzon, 2006, Brasier, 2006). La respuesta del NF- $\kappa$ B es a menudo transitoria ya que el factor de transcripción facilita su propia inactivación. Como se muestra en la **Figura 17**, el NF- $\kappa$ B activa la transcripción del gen de la proteína  $I\kappa$ B $\alpha$  y una vez expresada, el  $I\kappa$ B $\alpha$  re-ingresa en el núcleo donde se une y desplaza los dímeros NF- $\kappa$ B del ADN. Este complejo  $I\kappa$ B/NF- $\kappa$ B es entonces transportado fuera del compartimiento nuclear a través de un mecanismo de exportación nuclear mediada CRM1 y regresa al citoplasma como un complejo transcripcionalmente inactivo.

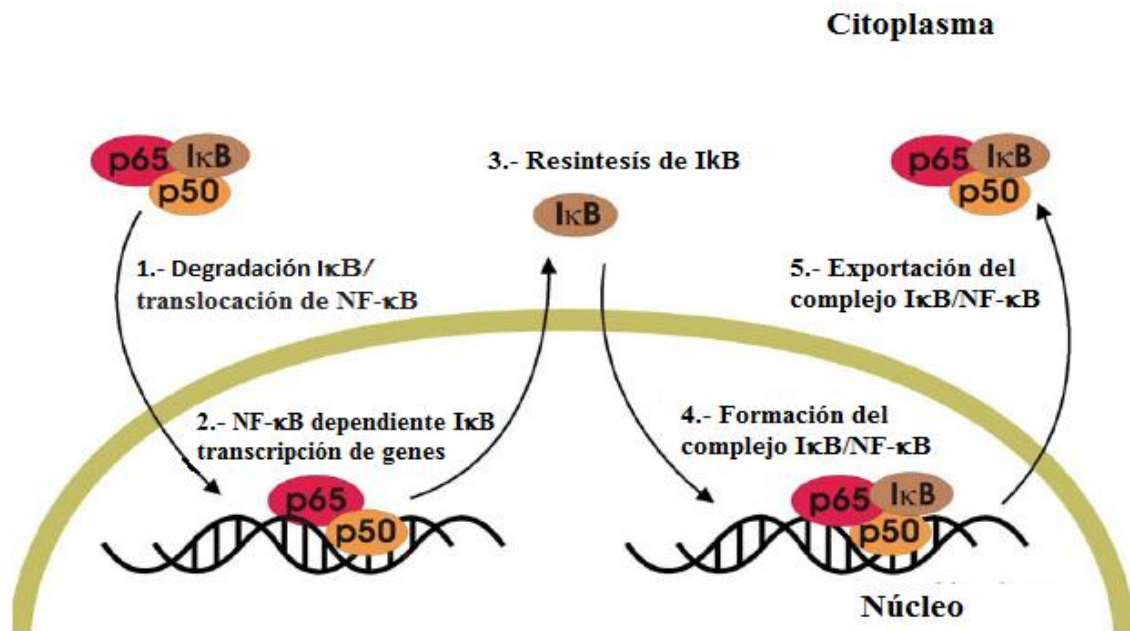
En los últimos años, muchos de los elementos clave de este itinerario lineal, canónico se han identificado en los miocitos cardíacos. Por ejemplo, la exposición de las células cardíacas a varios estímulos, incluyendo LPS, citocinas, especies reactivas de oxígeno e isquemia-reperfusión, activan IKK mediada por la fosforilación del  $I\kappa$ B $\alpha$ . Además, el intercambio del citoplasma al núcleo del dímero p65/p50 se ha confirmado en miocitos cardíacos, principalmente mediante una combinación de ensayo de movilidad electroforética que emplean  $\kappa$ B que contiene la secuencia de sondas combinadas con los ensayos de geles supershift que



confirman la identidad de las proteínas dentro de estos complejos de unión kappa B. Una apreciación creciente de NF-κB como un mediador central de diversas patologías cardíacas ha llevado a la idea de que la inhibición completa de esta vía será beneficiosa en el ajuste del estrés y la enfermedad cardíaca. Así, varios investigadores han utilizado el modelo clásico de activación del NF-κB para desarrollar estrategias terapéuticas que inhiben varios pasos en la cascada de señalización canónica. Por ejemplo, la inhibición farmacológica de la actividad IKK, con agentes tales como pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) y aspirina, o la inhibición de la vía proteolítica proteosoma con lactacistina o 132-MG, inhibe la activación de NF-κB vinculado con la hipertrofia cardíaca, la producción de citocinas de miocardio, el estrés oxidativo del miocardio y remodelación cardíaca (Gentzon 2006).



**Figura 16.-** Activación de la vía canónica del NF-κB. Los estímulos inducidos por la activación del complejo multimérico IKK, llevan a la fosforilación y la degradación mediada por el proteosoma del IκB. Este proceso libera dímeros del NF-κB y facilita su translocación desde el citoplasma al núcleo. La unión al ADN de dímeros de NF-κB facilita la activación o represión de la transcripción génica (Modificado de Gentzon, 2006).



**Figura. 17** I $\kappa$ B mediada por la exportación nuclear de subunidades NF- $\kappa$ B. (1) subunidades de NF- $\kappa$ B nuclear activa la transcripción de genes I $\kappa$ B. (2) El I $\kappa$ B resintetizada ingresa al núcleo se une a los dímeros NF- $\kappa$ B transcripcionalmente activos. (3) Complejos NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B se exportan al citoplasma. (4) dímeros NF- $\kappa$ B inactivos son retenidos en el citosol en reposo de Complejos NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B (Modificado Gentzon, 2006)

#### 4.5.1.- Las subunidades transcripcionales

En los miocitos cardíacos sólo p65, p50, p52 y RelB han sido identificados hasta la fecha. Aunque los estudios detallados que identifica todas las especies diméricas en corazón no se han realizado, parece que el NF- $\kappa$ B depende de la activación transcripcional o la represión regulada principalmente por dímeros de p65/p50 o p50/p50 respectivamente (Gentzon 2006). Varios estudios proporcionan indicios intrigantes de la importancia funcional de esta diversidad de señalización del NF- $\kappa$ B en el corazón. La Miotrofina/V1, se eleva en corazones dañados de humanos, así como en ratas espontáneamente hipertensas donde actúa como chaperón de la cremallera de NF- $\kappa$ B/p50 en el cambio de trans-activación de heterodímeros para trans-represión de homodímeros. Estos estudios revelan los reordenamientos intrigantes de las proteínas del NF- $\kappa$ B que podrían estar reguladas por mecanismos novedosos y subrayan la importancia de los cambios en los patrones de dimerización del NF- $\kappa$ B en la fisiopatología de la enfermedad cardíaca. Sin embargo, se requieren más estudios para poder caracterizar mejor los detalles moleculares de este proceso en condiciones normales e insuficiencia miocárdica. Los enfoques terapéuticos que cambian el equilibrio de dímeros NF- $\kappa$ B pueden ofrecer nuevos mecanismos para modificar la señalización NF- $\kappa$ B en las células del corazón (Gentzon 2006).



#### 4.5.2.- Los Inhibidores citosólicos

Como se representa en las **Figuras 16 y Figura 17**, una característica crucial de la señalización del NF- $\kappa$ B es el secuestro de dímeros inactivos del NF- $\kappa$ B en el citosol de las células quiescentes por la proteína inhibidora I $\kappa$ B. Las subunidades del NF- $\kappa$ B p100 (precursor de NF- $\kappa$ B/p52) y p105 (precursor de NF- $\kappa$ B/p50) se consideran como precursores de estas proteínas que cada una contiene una región C-terminal de repeticiones de anquirina homólogas a otros miembros de la familia I $\kappa$ B. Hasta la fecha, sólo I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100 y p105 se han identificado en el corazón. Cada una de estas proteínas exhibe una capacidad única para modular la duración de la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B. En concreto, el I $\kappa$ B $\alpha$  contiene una secuencia fuerte de exportación nuclear (NES), lo que le permite terminar la activación de genes regulados por el NF- $\kappa$ B mediante la unión al ADN y exportar los dímeros asociados al NF- $\kappa$ B hacia el citoplasma (**Figura 17**). A la inversa, el I $\kappa$ B $\beta$  carece de este dominio de transporte, una característica que permite a esta molécula facilitar la activación sostenida del NF- $\kappa$ B para antagonizar al I $\kappa$ B $\alpha$  mediante la exportación nuclear. El I $\kappa$ B $\epsilon$  tiene un NES débil y exposición moduladora del NF- $\kappa$ B de efectos intermedios entre el I $\kappa$ B $\alpha$  y I $\kappa$ B $\beta$ . En concreto, mientras el I $\kappa$ B $\epsilon$  es capaz de mediar la exportación nuclear de dímeros NF- $\kappa$ B pero es menos eficiente que el I $\kappa$ B $\alpha$  que produce un curso de tiempo más sostenido en la actividad del NF- $\kappa$ B nuclear. A pesar de las importantes funciones de estas diversas moléculas inhibitoras especializadas, poco se sabe de su función específica en las células del corazón (Gentzon 2006).

#### 4.6.- El NF- $\kappa$ B y la Enfermedad Cardiovascular

En el sistema cardiovascular, la activación de NF- $\kappa$ B está asociada con el rechazo de trasplantes, miocarditis, restenosis, lesión por isquemia/reperfusión miocárdica e infarto cardíaco, dilatación e insuficiencia cardíaca, hipertrofia de los cardiomiocitos y la aterosclerosis, donde desempeña múltiples funciones en la proliferación de células músculo liso, disfunción endotelial y ruptura de la placa. El NF- $\kappa$ B se activa en cardiomiocitos por TNF- $\alpha$ , proteínas G acoplados a agonistas y por estrés oxidativo. El NF- $\kappa$ B se expresa en una variedad de tipos de células en el sistema cardiovascular, incluyendo cardiomiocitos, células endoteliales, músculo liso, macrófagos y fibroblastos. Experimentalmente, el NF- $\kappa$ B está implicado en los fenómenos cardioprotectores incluyendo preconditionamiento isquémico (PC) y en





modos de cardioprotección farmacológica. Tomando en conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el NF- $\kappa$ B es principalmente anti-apoptótica y cardioprotector. Existen varias líneas de evidencia de que la activación del NF- $\kappa$ B está implicado en la provocación de la muerte celular después de I/R *in vivo*. Por lo tanto, existe una controversia sobre el papel de NF- $\kappa$ B en la muerte celular y en el infarto de miocardio después de lesión isquémica en el corazón (Keith, 2005).

El efecto del NF- $\kappa$ B en la supervivencia celular/apoptosis puede tener consecuencias para el desarrollo del sistema cardiovascular. La inhibición química de la activación del NF- $\kappa$ B por el inhibidor BAY 11-7085 en embriones de pollo afectó el desarrollo cardíaco a los 6 días después de la administración del inhibidor. Se conoce también que las subunidades del NF- $\kappa$ B están implicadas en el desarrollo cardíaco. Actualmente estudios genéticos usando órganos o células específicas “knockouts” están obligados a justificar las observaciones realizadas con el inhibidor farmacológico del NF- $\kappa$ B y estudiar más a fondo el efecto del NF- $\kappa$ B en el corazón sucesivamente. Mientras que en el adulto, el NF- $\kappa$ B puede presentar un papel beneficioso o bien perjudicial en el sistema cardiovascular. En la configuración de ciertas patologías, la vía de NF- $\kappa$ B está más o menos estimulada y conduce a alteraciones en la señalización y en consecuencia a la expresión génica, lo que contribuye a la patología de la enfermedad. La vía no canónica ha sido estudiada principalmente en los linfocitos y la información sobre el papel en otros tipos de células hace falta, es por lo cual se ha centrado en buscar la participación de la vía canónica en la salud y la enfermedad cardiovascular (Kim, 2010).

#### **4.6.1.- Objetivo transcripcional del NF- $\kappa$ B en células cardiovasculares**

El NF- $\kappa$ B regula muchos procesos en el sistema cardiovascular, incluyendo la inflamación, la supervivencia, diferenciación y la proliferación celular. Las citocinas pro-inflamatorias y productos microbianos inducen la señalización del NF- $\kappa$ B, lo que resulta en la regulación transcripcional de genes pro-inflamatorios, incluyendo citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Tabla 2), que promueven el proceso inflamatorio. El NF- $\kappa$ B también controla la viabilidad celular mediante la activación transcripcional de los inhibidores de la apoptosis (Tabla2) (Kim 2010, Keith, 2005).

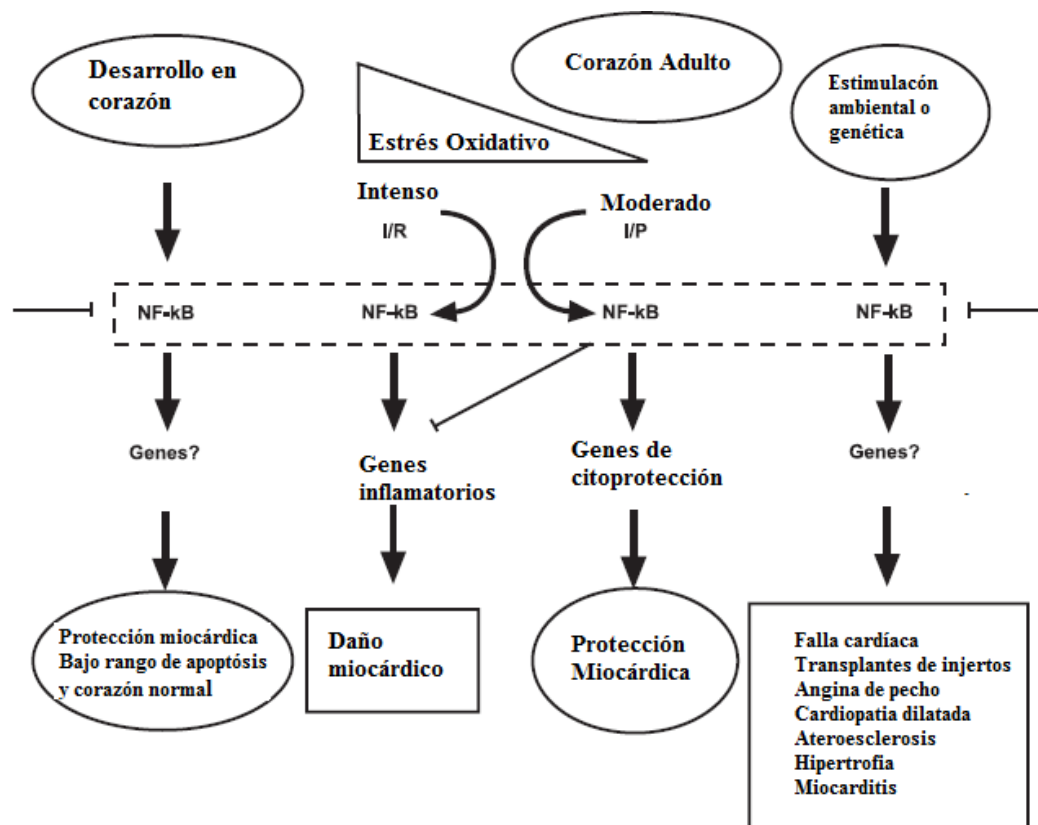


#### 4.6.2.- Infarto de miocardio y lesión por reperfusión

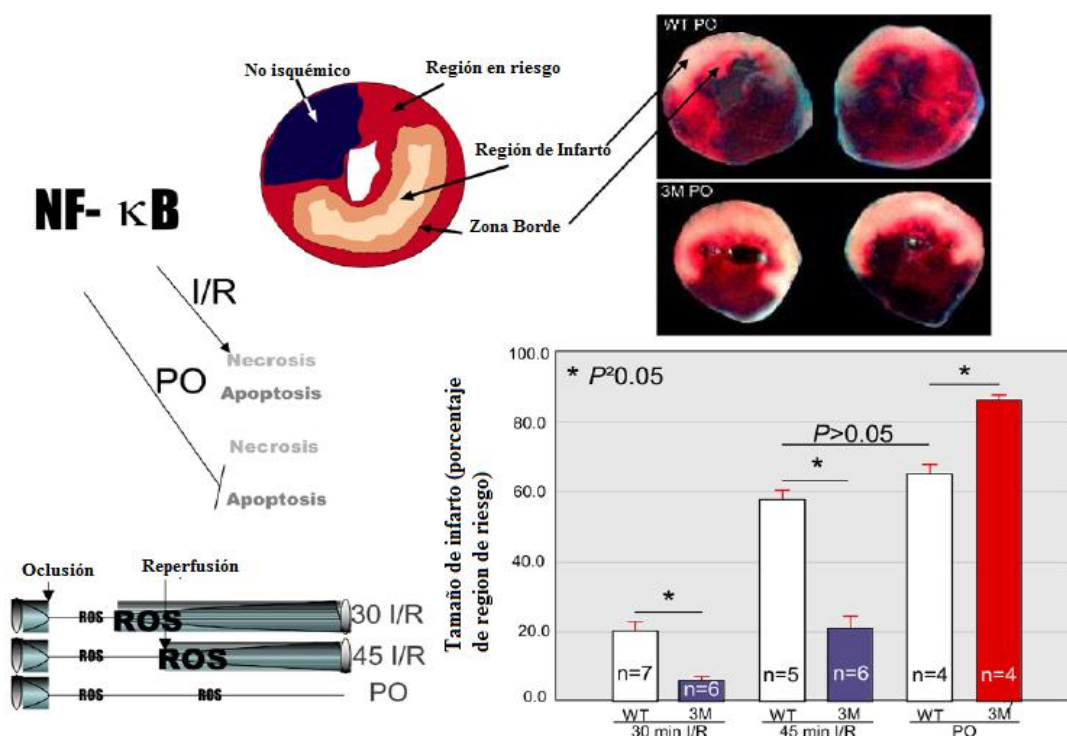
El IM se produce por la interrupción del suministro de sangre al corazón, típicamente como resultado de la ruptura de la placa aterosclerótica en una arteria coronaria. La reducción en la perfusión del miocardio posteriormente puede llevar a la muerte regional de los cardiomiocitos y pérdida de la función (infarto) (**Figura 18 y 19**).

Los tratamientos actuales empleados para restaurar el flujo sanguíneo en el miocardio isquémico trombolítico, incluyen; terapia, PCI (intervención coronaria percutánea) y CABG (injerto de derivación de la arteria coronaria), la cirugía. Paradójicamente, este proceso también puede causar lesión tisular mediante la activación de la inflamación miocárdica y apoptosis de los cardiomiocitos. El NF- $\kappa$ B es un regulador central de las respuestas cardíacas a la isquemia y la reperfusión. Es activada por citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF- $\alpha$  y la IL-1) y los ligandos endógenos para TLRs que se generan en respuesta a la isquemia/reperfusión. Además, la isquemia/reperfusión conduce a alteraciones en la disponibilidad de oxígeno que puede activar el NF- $\kappa$ B. En condiciones de normoxia, IKK $\beta$  se degrada en respuesta a la hidroxilación por una enzima llamada PHD1 (prolil hidroxilasa 1). La isquemia conduce a la hipoxia que puede suprimir la función PHD1, mejorando así la expresión IKK $\beta$  para la activación del NF- $\kappa$ B. La hipoxia también activa el NF- $\kappa$ B por fosforilación del I $\kappa$ B $\alpha$  en residuos de tirosina. Además de estos mecanismos, la hipoxia también eleva la expresión de subunidades del NF- $\kappa$ B a través de HIF1 (factor inducible por hipoxia 1) dependiente de la activación transcripcional de las subunidades de genes del NF- $\kappa$ B. La re-oxigenación de los tejidos hipóxicos durante la reperfusión también puede activar el NF- $\kappa$ B vía inducción de ROS. Los mecanismos moleculares que subyacen a la activación del NF- $\kappa$ B por ROS operan en múltiples niveles e incluyen ROS dependiente de la activación de IKK y ASK1 (señal de apoptosis de regulación de la cinasa 1, MAPKKK) (Keith, 2005). Así, la isquemia de miocardio o isquemia/reperfusión conduce a la activación de NF- $\kappa$ B en varios tipos de células en el miocardio, que a su vez induce proteínas pro-inflamatorias, incluyendo las proteínas de adhesión ICAM-1 y P-selectina, en células endoteliales coronaria, resulta en reclutamiento de leucocitos. Este proceso se ha documentado en numerosos estudios clínicos. Por ejemplo, Valen y colaboradores demostraron que la activación del NF- $\kappa$ B (p50/p65), va acompañado por un aumento en la expresión de ICAM-1, TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , en la isquemia/reperfusión de miocardio en el tejido auricular humano muestreada durante

la cirugía a corazón abierto. Como la inflamación puede conducir a la lesión de los tejidos, también se ha sugerido que la activación del NF- $\kappa$ B durante la isquemia/reperfusión de miocardio es perjudicial. Esta idea es coherente con la observación de que el bloqueo del NF- $\kappa$ B utilizando inhibidores farmacológicos u oligonucleótidos reduce el IM en modelos animales, el NF- $\kappa$ B también ejerce efectos protectores en el infarto miocárdico por isquemia/reperfusión. De hecho, los estudios en un modelo murino de IM reveló que la activación del NF- $\kappa$ B es esencial para la protección de los cardiomiocitos de la apoptosis a través de la inducción de genes citoprotectores incluyendo c-IAP1 y Bcl-2. El NF- $\kappa$ B puede regular positivamente la liberación de SCF (factor de células madre), que es responsable de la toma de referencia de (potencialmente beneficioso) células madre cardíacas al sitio de la lesión (Kim, 2010).



**Figura 18.-** Efectos paradójicos de la activación del NF- $\kappa$ B en el corazón. La interferencia con la activación de NF- $\kappa$ B puede resultar en la inducción de la apoptosis durante el desarrollo del corazón de pollo, que hacen tope al hablar de su regulación restringida. En el corazón de adulto especialmente en la isquemia reperfusión (I/R) hay un estímulo intenso generado por el estrés oxidativo, que permite la transcripción de proteínas pro-inflamatorias en las células endoteliales y causa daño miocárdico. Si, por el contrario, existe un estímulo de una intensidad moderada, como el del pre-acondicionado isquémico I/P, NF- $\kappa$ B activa genes anti-apoptóticos y el miocardio recibe protección. Además, en la I/P el NF- $\kappa$ B puede inhibir la activación de genes inflamatorios que en la I/R causan daño miocárdico asociada a I/R. Sin embargo, en las enfermedades cardíacas el NF- $\kappa$ B está desregulado y se activa constantemente (Modificado Hernández, 2008).



**Figura 19.-** Los efectos de bloqueo genético de NF- $\kappa$ B después de la isquemia reperfundida (I/R) y la oclusión coronaria permanente (PO). El diagrama de arriba a la izquierda muestra un corazón idealizado en sección transversal manchado para la evaluación del tamaño del infarto. A la derecha están las secciones representativas de tipo salvaje (arriba) y  $\kappa$ B $\alpha$  corazones 3M (abajo). La gráfica en la parte inferior derecha muestra los resultados de estos estudios con grupos de tipo salvaje y  $\kappa$ B $\alpha$  corazones 3M sometidos a I/R (30-minutos de oclusión, 24-horas de perfusión), I/R (45-minutos de oclusión, 24-horas de perfusión) o PO (24-horas oclusión coronaria, no de perfusión). A la izquierda de la gráfica es una representación de los protocolos utilizados por I/R y PO en estos estudios. Brevemente, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico, entubado, y se realizó la toracotomía lateral como se ha descrito previamente. Después de la toracotomía, un trozo de sutura de nylon 8-0 se colocó alrededor de la izquierda de la arteria descendente anterior (LAD) 2-3 mm desde la punta de la aurícula izquierda. Un trozo de tubo de silicona blanda se colocó entre la sutura y la arteria, y la isquemia se logró mediante la vinculación de la sutura. Oclusión coronaria fue de 30 minutos, 45 minutos, o era permanente (PO). El tamaño del infarto se determinó después de 24 horas como se describe. Estos datos apoyan que la actividad del NF- $\kappa$ B contribuye al desarrollo del infarto después de la I/R (es decir, más grande del infarto cuando NF- $\kappa$ B está bloqueada; pero es anti-apoptótica celular después de PO). Los datos reportados por Misra y colaboradores apoyan que después de PO, la actividad de NF- $\kappa$ B bloquea la apoptosis debido a la sobre regulación de genes anti-apoptóticos como Bcl2 y PAI-1. (Modificado de Keith 2005)

#### 4.7.- Relación del Sistema Renina Angiotensina (SRA) con el Infarto Agudo del Miocardio (IAM)

##### 4.7.1 Breve descripción del Sistema renina-angiotensina y el NF- $\kappa$ B

El SRA se ha convertido en uno de los enlaces esenciales en la patofisiología de la enfermedad vascular. La angiotensina II (Ang II), es el péptido principal del SRA, se consideró como una hormona vasoactiva pero en los últimos años, este punto de vista se ha modificado, por la de un factor de crecimiento que regula la proliferación/apoptosis y fibrosis. Recientemente, este punto de vista se ha



ampliado con un concepto novedoso. Se indica que la Ang II participa en la respuesta inflamatoria, actuando como mediador proinflamatorio. En las células vasculares residentes, la Ang II produce quimiocinas, citocinas y moléculas de adhesión, que contribuyen a la migración de células inflamatorias en la lesión tisular. Estos últimos efectos sobre la expresión génica están mediados, al menos en parte, a través del factor de transcripción nuclear-  $\kappa$ B. A través de estas acciones, la Ang II aumenta la inflamación vascular, induce la disfunción endotelial y al hacerlo mejora el proceso aterogénico. La Ang II también es un factor quimiotáctico y mitogénico para las células mononucleares. Además, otros componentes del SRA también podrían estar involucrados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. La Ang II comparte algunas de sus propiedades con Ang III, incluyendo la quimiotaxis y la producción de factores de crecimiento y quimiocinas. Todos estos datos demuestran claramente que la Ang II es una citocina y muestra la complejidad del SRA en procesos patológicos y proporciona algunas respuestas mecanicistas de los efectos beneficiosos del tratamiento con bloqueadores del SRA en las enfermedades cardiovasculares (Ruiz,200, Brasier, 2002).

#### 4.7.1.1.- El Sistema Renina-Angiotensina

Es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, en el que la renina escinde el decapeptido angiotensina I (Ang I) del dominio N-terminal del angiotensinógeno. El riñón es el único sitio conocido en donde la prorrenina es convertida en renina y la única fuente de renina plasmática. El hígado es el lugar más importante de expresión del gen del angiotensinógeno, pero el RNAm del angiotensinógeno se expresa en varios lugares extrahepáticos, incluidos el cerebro, grandes arterias, el riñón, tejido adiposo y el corazón. Se ha estimado que más del 85% de la angiotensina I se forma dentro de los tejidos, más que en el plasma. Hasta ahora no hay pruebas de que la síntesis local de angiotensinógeno afecte la velocidad de formación de angiotensina I en los tejidos (Santeliz, 2008).

El SRA está implicado en el control de la función cardiovascular y del equilibrio hidroelectrolítico e integrado por diferentes péptidos y enzimas que conducen a la síntesis de la Ang II. La Ang II se une y estimula receptores específicos, los AT<sub>1</sub>, responsables de las acciones clásicas del péptido como vasoconstricción, retención de agua y sodio o proliferación celular, y los AT<sub>2</sub> con efectos contrarios. Los AT<sub>1</sub> se expresan en numerosos territorios, mientras que los AT<sub>2</sub> se encuentran sólo en algunos órganos y se activan en condiciones de estrés (**Tabla 3**).


**Tabla 3. Efectos de estimulación de los receptores de Ang II.**

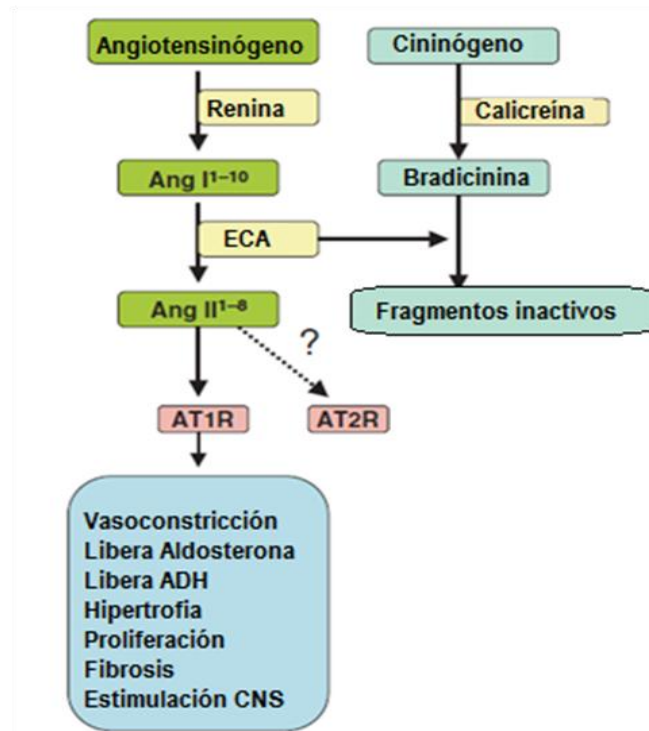
<b>Sitio</b>	<b>AT<sub>1</sub></b>	<b>AT<sub>2</sub></b>
<b>Arterias</b>	Vasoconstricción Induce apoptosis Hipertrofia vascular Aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando la angiogénesis y remodelación vascular Disminuye la expresión de los AT <sub>1</sub> Efecto inflamatorio vascular y endotelial	Vasodilatación Promueve la apoptosis del músculo liso Fomenta en forma indirecta la producción de ON por estimulación de la ENOs Bloquea la acción de radicales libres
<b>Corazón</b>	Contractilidad Aumenta la hipertrofia (proliferación de miocitos y colágena) Induce apoptosis	Antihipertrofia Disminuye la apoptosis de miocitos Disminuye la expresión de los AT1
<b>S.N</b>	Aumenta la act. simpática Aumenta H. antidiurética (Sed)	Neuroprotección (apertura de los canales rectificadores retrasados de K <sup>+</sup> y cierre de los canales de Ca <sup>++</sup> ) Reparación nerviosa Promueve la diferenciación celular
<b>Endotelio</b>	Aumenta la síntesis de radicales libres Induce apoptosis Disminuye síntesis de ON Aumenta la expresión del PAI1 (efecto procoagulante) Activa a la Cox-2 Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando la angiogénesis y remodelación vascular	Fomenta en forma indirecta la producción de ON por estimulación de la ENOs Regula la apoptosis Bloquea la acción de radicales libres Antiaterogénico Promueve la diferenciación celular Antiproliferativo Reparación de tejido Disminuye la expresión de los AT1
<b>Riñón</b>	Retención Na <sup>+</sup> Inhibición renina	Vasodilatación aferente
<b>Suprarrenales</b>	Libera catecolaminas Libera aldosterona	
<b>Otros</b>	Libera Ca <sup>++</sup>	Inhibe la proliferación y crecimiento celular, regula la Apoptosis y Bradicinina



El conocimiento del SRA se inició en 1889 con la descripción por Tirsted de la renina como una sustancia presora aislada del riñón de conejos y su esquema básico quedó establecido en 1957 cuando el grupo de Skeggs que describieron el angiotensinógeno como sustrato de la renina, tras haber descrito previamente la enzima convertidora de angiotensina (ECA), encargada de convertir la Ang I en Ang II. El descubrimiento de los receptores específicos y sobre todo, la introducción en terapéutica de los inhibidores de la ECA (iECA) y de los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> (ARAII) abrieron nuevos caminos terapéuticos y facilitaron la comprensión del SRA. Sin embargo, en ese momento, había un amplio escepticismo sobre el papel del SRA en la enfermedad cardiovascular. La aparición de un nuevo grupo de fármacos, los inhibidores directos de la renina (iDR), ha contribuido también a aumentar el interés por el SRA.

Como se ha comentado el esquema básico del SRA quedó establecido hace más de 50 años. Su activación se inicia con la liberación desde el riñón de la renina sintetizada en el aparato yuxtaglomerular. Esta enzima actúa sobre el angiotensinógeno, una globulina de origen hepático, constituida por 14 aminoácidos y la transforma en un decapeptido Ang I, que se convierte en el octapeptido la Ang II por acción de la ECA, que es también la responsable de la degradación de la bradicinina, un potente vasodilatador (**Figura 20**). Cuando en la década de los años 1970 se introdujo en terapéutica el Captopril, primer iECA, se conocía la importancia del SRA en el control de la presión arterial pero faltaba mucho por saber sobre su importancia en la enfermedad cardiovascular. Una intensa investigación básica y clínica ha permitido el descubrimiento de nuevos componentes y mejorar el conocimiento de los procesos fisiopatológicos que se relacionan con el SRA. No obstante, desde el punto de vista terapéutico el desarrollo ha sido mucho más lento (Morales,2010, Fyhrquist,2008).

.

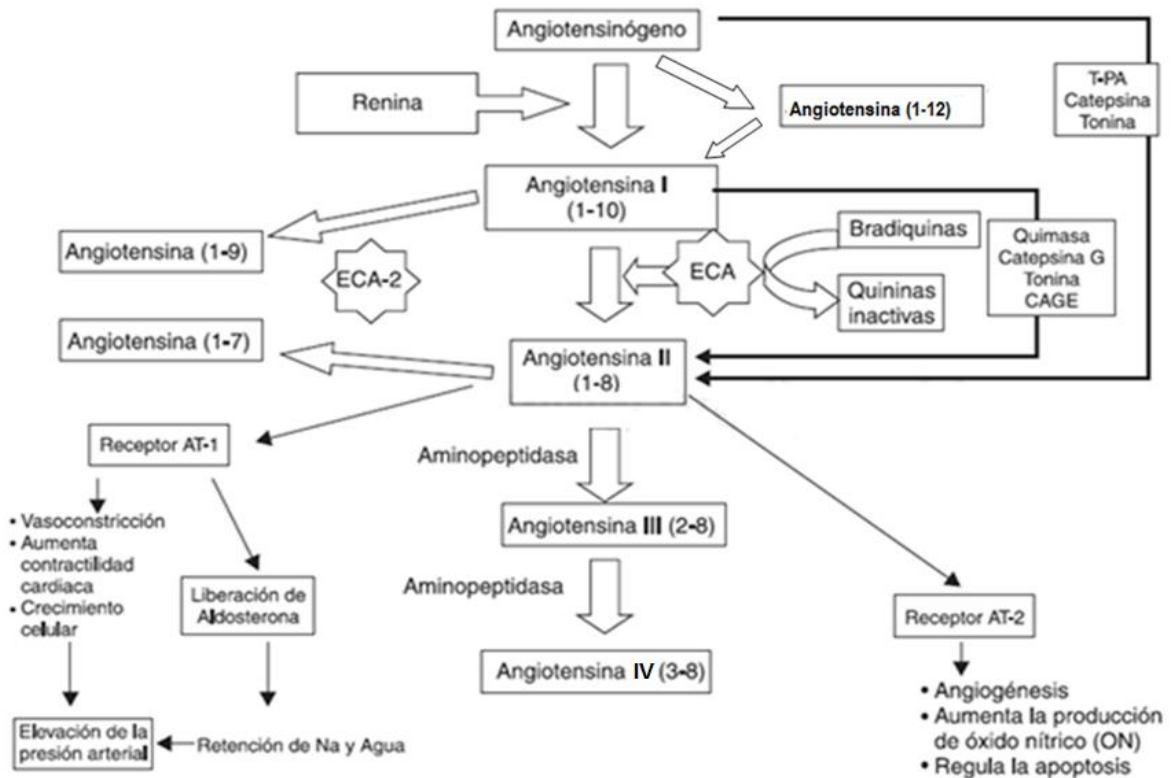


**Figura 20.-** Una visión simplificada de la circulación 'clásica' del sistema renina-angiotensina. Flechas enteras (→) Indican vías; la importancia clínica de los cuales se ha demostrado. Flecha de puntos (.....→) Indica la vía deducida a partir de experimentos con animales o en cultivos celulares, sin embargo, aún no se ha demostrado de forma concluyente que sea clínicamente relevante (Modificado de Fyhrquist, 2008).

El sistema se ha ido haciendo más complejo (**Figura 21**) y se han descrito nuevos componentes. La Angiotensina III (Ang III), es un heptapéptido que contiene los 7 últimos aminoácidos de la Ang II, por lo que se le conoce también como Angiotensina 2–8, que se produce por acción de la aminopeptidasa A sobre la Ang II. La Angiotensina IV (Ang IV) o Angiotensina 3–8, procede de la Ang III por acción de la aminopeptidasa N. Ambas son activas y la Ang III puede actuar, igual que la Ang II, sobre los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, mientras que la Ang IV tendría como diana una amino peptidasa regulada por insulina (AMPRI, en inglés IRAP). La Angiotensina 1–7 (Ang 1-7) es un heptapéptido con efecto vasodilatador y antiproliferativo, que se produce a partir de la Ang I por acción de una endopeptidasa o desde la Ang II por acción de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), enzima que puede también producir Angiotensina 1–9 (Ang 1-9) a partir de la Ang I. Este nonapéptido puede, a su vez, generar Ang 1-7 por acción conjunta de una endopeptidasa y de la ECA. Se ha descrito que la Ang 1-7 tendría su propio receptor en un Oncogén Mas. Además de estos nuevos péptidos no debe olvidarse la posibilidad de síntesis de Ang II por vías no relacionadas con la ECA, en especial gracias a la quimasa, una enzima con escaso papel en condiciones fisiológicas pero



que se sobre expresa en pacientes con enfermedad coronaria o renal y en diabéticos.



**Figura 21.-** Esquema general de las fases del Sistema Renina-Angiotensina (SRA) (Morales, 2010).

#### 4.7.1.1.1.- Vías alternas de generación de la Ang II

La angiotensina II puede ser enzimáticamente generada a partir de Ang I por quimasa (**Figura 22**) en ciertas condiciones patológicas. La quimasa se almacena en el complejo macromolecular con proteoglicanos de heparina en los gránulos secretores de los mastocitos. Para convertirse enzimáticamente activa, la quimasa complejada debe ser liberada de los gránulos de los mastocitos, por ejemplo por daño vascular causado por abombamiento u otros daños. Por lo tanto, la quimasa es enzimáticamente inactiva en el tejido vascular normal y puede producir Ang II sólo en las paredes arteriales dañadas o ateroscleróticas. Es de señalar que inhibidores endógenos de la proteasa de serina presentes en el fluido intersticial son potentes inhibidores de la quimasa (Fyhrquist, 2008). También, ahora se sabe que muchos tejidos, incluidos los vasos sanguíneos, riñón, corazón y cerebro son capaces también de generar en forma local Ang II a través de vías no dependientes de la ECA (vías no-ECA) como la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, (teniendo como sustrato la angiotensina I) y a través de la vía de catepsina, tonina y



activador del plasminógeno tisular (teniendo como sustrato el angiotensinógeno) (Santeliz, 2008, Brasier, 2002).

#### 4.7.1.1.2.- Las nuevas angiotensinas

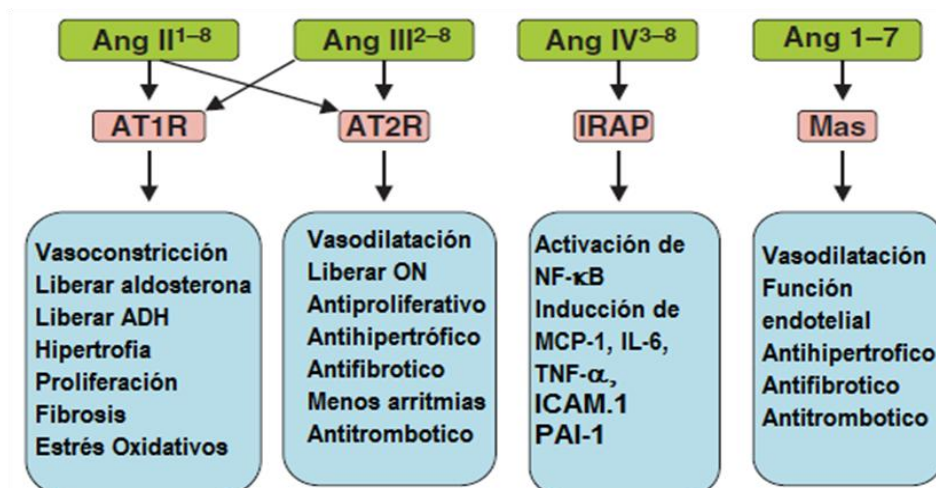
Como hemos comentado anteriormente además de la Ang I y la Ang II se han descrito otros 5 péptidos componentes del sistema. La angiotensina III o angiotensina 2-8 fue descrita en los años 70, puede causar vasoconstricción y liberación de aldosterona. Se genera a partir de Ang II por la aminopeptidasa A (**Figura 21**), la Ang III ejerce sus acciones, en principio, similares a las de Ang II, a través de receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Aunque la Ang II es considerada como el principal efector del RAS, la Ang III puede ser tanto o más importante en algunas acciones mediadas por los receptores AT<sub>1</sub> por ejemplo, la liberación de vasopresina.

La angiotensina IV o angiotensina 3-8 puede ser generada a partir de Ang III por aminopeptidasa N (**Figura 21**). Este péptido biológicamente activo ha captado el interés creciente tras el descubrimiento y clonación de los receptores de insulina reguladas amino peptidasa (IRAP), un sitio de unión y un receptor probable (AT<sub>4</sub>) de la Ang IV. Las acciones de la Ang IV mediadas por IRAP (**Figura 22**) incluyen vasodilatación renal, hipertrofia y la activación del NF-κB que conduce a una mayor expresión del inhibidor activador de plaquetas-I (PAI-1), proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α). Varios estudios sugieren que la Ang IV tiene importantes funciones reguladoras en la cognición, el metabolismo renal y daño cardiovascular. La Ang IV regula el crecimiento celular en fibroblastos cardíacos, células endoteliales y células de músculo liso vascular. Parece que la Ang IV está implicada en la respuesta inflamatoria vascular y podría por tanto desempeñar un papel en la fisiopatología cardiovascular (Santeliz,2008, Morales,2010, Fyhrquist,2008).

La angiotensina 1-7 es un heptapéptido, que se pensó durante mucho tiempo que carece de acciones biológicas, a pesar de los primeros informes sobre los efectos biológicos. La importancia de la Ang 1-7 fue destacado por el descubrimiento relativamente reciente de la ECA2. Esta enzima genera Ang 1-7 a partir de Ang II. La Ang 1-7 también puede ser generada a partir de Ang I o Ang II por otras peptidasas. Ya en 1988, se demostró que la Ang (1-7) liberaba vasopresina tan eficazmente como Ang II a partir de explantes de neurohipofisiaria. Se encontró que la Ang (1-7) tiene acciones opuestas a las de Ang II (**Figura 22**), a saber, los efectos de vasodilatación y antitrófico y amplificación de la vasodilatación causada por la bradisinina. Numerosos experimentos sugieren una interacción importante entre la

Ang (1-7) y los sistemas de prostaglandinas-bradiginina-NO. La Ang (1-7) se une al receptor Mas (**Figuras 21 y 22**) que media las acciones vasodilatadora y antiproliferativa del heptapéptido (Morales, 2010, Fyhrquist, 2008).

La Angiotensina1–9 es generada a partir de la Ang I por acción de la ECA2, enzima que también participa en la síntesis de Ang 1-7. Se desconoce el papel de este nonapéptido, pero cada vez hay más datos a favor de que la ECA2 pueda ser un importante regulador del SRA al ser capaz de degradar la Ang II y modular sus efectos presores. Su expresión aumenta en las células cardiacas después de un infarto, además existen concentraciones elevadas en el riñón y se ha postulado su papel renoprotector (Morales, 2010). El último componente del SRA descrito es la Angiotensina 1–12 (A1-12), procedente también del angiotensinógeno pero con 2 aminoácidos más que la Ang I, de momento sólo se ha demostrado su existencia en diferentes órganos y en tejidos de ratas, con concentraciones elevadas en el corazón y el riñón, sin embargo, son muy bajas en la pared vascular. Contrae las arterias aisladas de ratas e *in vivo* tiene efectos presores que no se producen si el animal es pretratado con IECA o ARAII, lo que sugiere que este nuevo componente del SRA puede ser un precursor de la Ang I y que sus efectos estarían mediados por conversión de la Ang II. No hay información sobre las enzimas que pueden participar en la síntesis de Ang 1-12 ni en su conversión en Ang I y Ang II (Morales,2010).



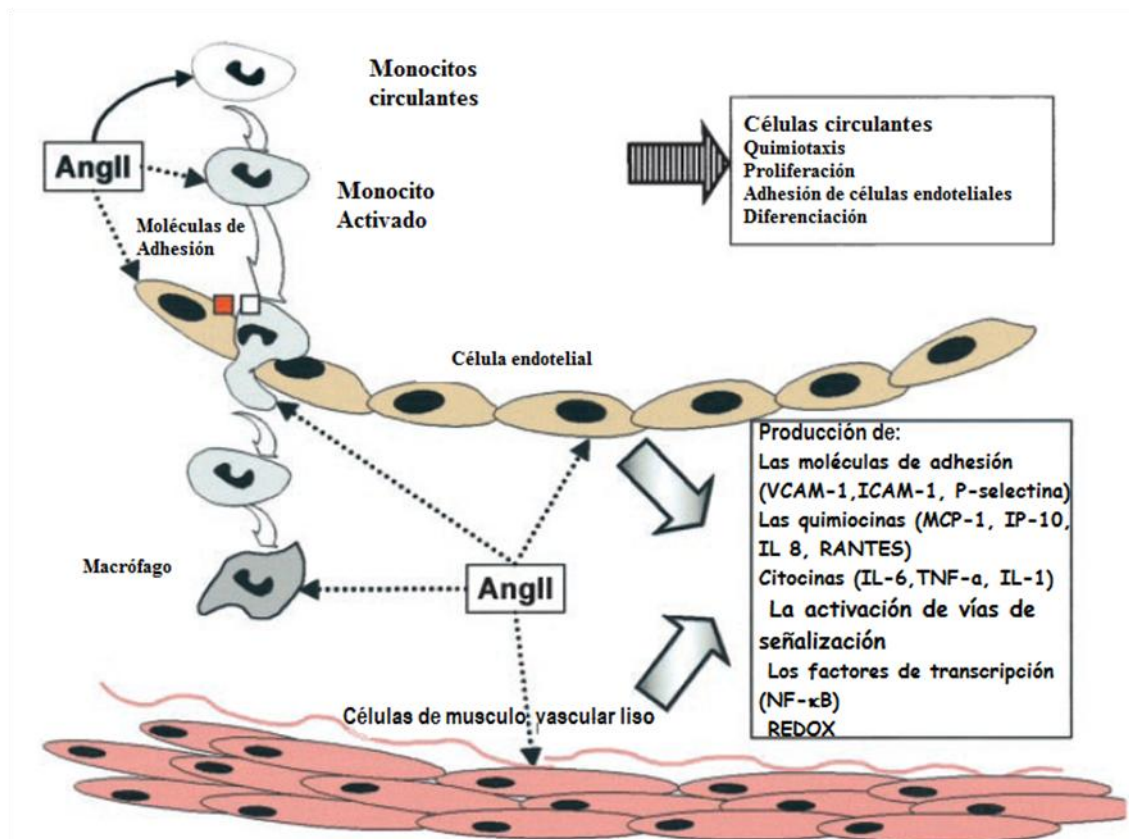
**Figura 22.** Efectos de péptidos de angiotensina y prorenina/renina mediada por sus correspondientes receptores (Modificado de Fyhrquist, 2008).

#### 4.7.1.1.3.- La Ang II y la respuesta inflamatoria vascular

Estudios recientes han demostrado que la Ang II es un potente agente proinflamatorio. La Ang II puede modular algunas respuestas de las células inmunológicas e inflamatorias, tales como la quimiotaxis, la proliferación y la



diferenciación de los monocitos en macrófagos (**Figura 23**). Además, los inhibidores de la ECA presentan propiedades inmunomoduladoras. La presencia de una respuesta inflamatoria en la pared arterial está descrita en las enfermedades vasculares, incluyendo la aterosclerosis y la hipertensión. La Ang II está implicada en esta respuesta a través de la liberación de varios mediadores proinflamatorios, incluyendo moléculas de adhesión, quimiocinas y citocinas. La Ang II induce la adhesión de monocitos y neutrófilos a las células endoteliales a través de la producción de P-selectina, molécula de adhesión intercelular de tipo 1 y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) en las células endoteliales vasculares y células de músculo liso *in vivo* e *in vitro*. Los pacientes hipertensos presentan niveles séricos elevados de moléculas de adhesión y los pacientes con enfermedad arterial coronaria tienen altos niveles de L-selectina en los leucocitos. La disfunción endotelial se caracteriza por el aumento en la adhesividad de los monocitos circulantes y la expresión de moléculas de adhesión como se observó en respuesta a la Ang II. En modelos animales, la Ang II produce disfunción endotelial, medida por el deterioro de la vasodilatación en respuesta a la acetilcolina, inhibidores de la ECA y mejora la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad arterial coronaria, lo que sugiere que la disfunción endotelial es un mecanismo importante que se promueve en la aterosclerosis por Ang II (Ruiz, 2001).



**Figura 23.-** Papel de Ang II en la respuesta inflamatoria en la lesión vascular. La Ang II activa las células mononucleares, causando la quimiotaxis y la proliferación directa. En tanto residente y células infiltrantes, Ang II, por NF-κB mecanismos de la vía y redox, hasta regula los mediadores proinflamatorios, tales como moléculas de adhesión, quimiocinas y citocinas (Modificado de Ruiz, 2001).

#### 4.7.1.1.4.- Vinculación de SRA con la aterosclerosis.

Una relación entre la actividad del SRA y el riesgo de infarto de miocardio (IM) fue sugerido más de una década atrás, cuando se demostró que la renina se asoció de forma independiente con el riesgo posterior de infarto de miocardio en un estudio prospectivo, de pacientes tratados moderadamente hipertensos, conviene más el uso de los inhibidores de la ECA en los últimos ensayos clínicos, en los que los efectos de los IECA producen reducción de eventos vasculares isquémicos. En modelos experimentales de aterosclerosis, un fuerte cuerpo de evidencia apoya el papel modulador del SRA en la aterogénesis. Las acciones vasoprotectoras de los inhibidores de la ECA sobre la reducción de la aterogénesis se han documentado ampliamente en animales de experimentación. Por ejemplo, en la aterosclerosis propensas a ApoE en ratones de deficientes (*ApoE<sup>-/-</sup>*), el fosinopril inhibidor de la ECA reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica en un 70% durante un tratamiento de 12-semanas. El mecanismo por el cual los inhibidores de la ECA reducen el tamaño de la lesión es algo controvertido porque ECA es una enzima

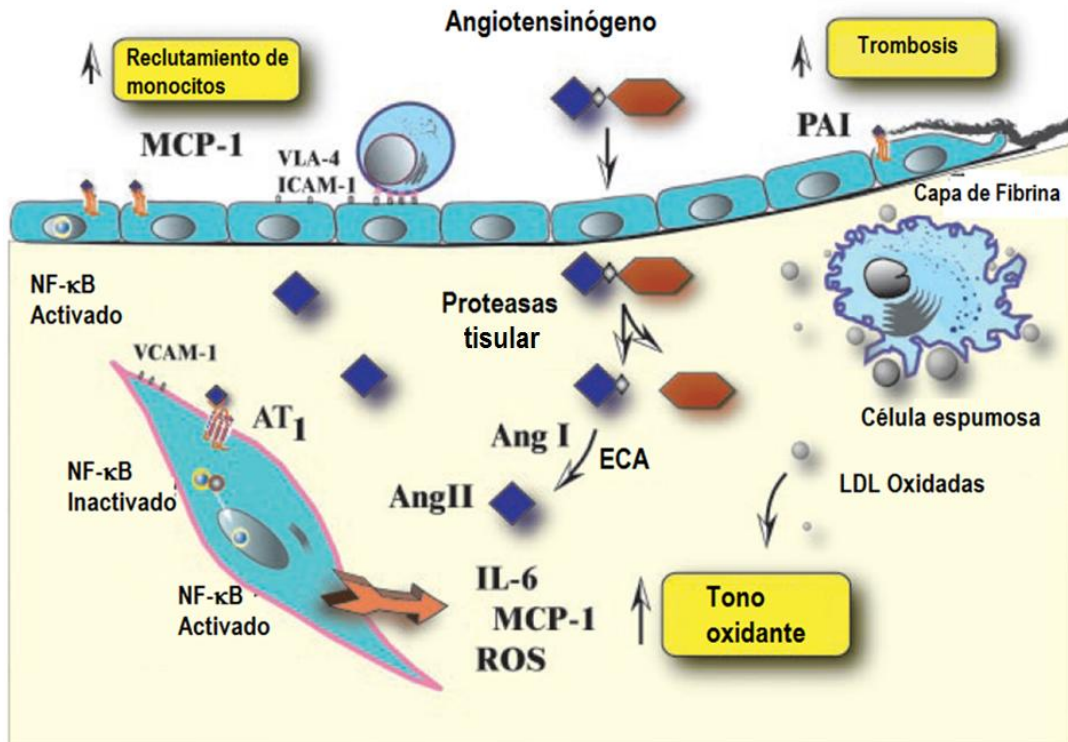


crítica para la destrucción del vasodilatador bradicinina y la formación del vasoconstrictor Ang II. En la disfunción de las células endoteliales, una alteración es una respuesta vasodilatadora a la acetilcolina, la cual es una de las primeras características fisiológicas de la aterosclerosis. En la actualidad, se entiende que las cininas parecen jugar un papel principal en la modulación de la función endotelial, ya que inhiben la agregación de plaquetas, estimulan la producción del activador del plasminógeno tisular, bloquean los efectos deletéreos de la LDL oxidada, reducen el estrés oxidativo en el endotelio y mejoran la sensibilidad a la insulina. Aunque los inhibidores de la ECA aumentan la producción de ON endotelial a través de la vía de la bradicinina, lo que influye en el tono vascular, no hay evidencia fuerte de que actualmente inhibidores de la ECA ejercen su efecto antiaterogénico principalmente a través de efectos indirectos sobre el metabolismo de cinina. El Valsartán redujo lesión intimal y el aumento de área de la luz en conejos hipercolesterolémicos. Aunque se necesitan más estudios que deben realizarse para determinar sus efectos en los seres humanos, estos datos sugieren que el bloqueo específico de la producción endógena de Ang II es antiaterogénico y sirve para reducir el tamaño de la placa (Brasier, 2002).

#### **4.7.1.1.5.- Acciones proaterogénicos de Ang II**

La Ang II tiene acciones potentes y diversas en todo el sistema cardiovascular, incluyendo la inducción de la vasoconstricción, la producción de aldosterona, hipertrofia cardíaca, proliferación celular del músculo liso vascular (VSMC) y ROS. La Ang II principalmente media su acción vascular a través del receptor tipo Ang II subtipo 1 (AT<sub>1</sub>), la proteína G 7-transmembranal-receptor acoplado a proteína expresada en las células endoteliales, monocitos y CMLV. La activación AT<sub>1</sub> induce una cascada de respuestas celulares, incluyendo la rápida activación de la fosfolipasa C y calcio intracelular y más tarde, los efectos más sostenidos mediados por cambios en la transcripción de genes (Brasier, 2002).





**Figura 24.-** Mecanismos proaterogénicos para la Ang II producido en la pared del vaso. Un diagrama esquemático de una placa aterosclerótica complejo. Angiotensinógeno circulante se puede escindir en el decapeptido, Ang I, por la acción de la renina o una variedad de proteasas tisulares. La Ang I se convierte rápidamente en el octapéptido vasoactivo la Ang II por la acción de la ECA producida por las células mononucleares de la placa aterosclerótica. La Ang II induce el reclutamiento de monocitos mediante la participación en la cascada de citocinas vascular mediante la mejora de la formación de ROS. ROS media la inducción de quimiocinas monocíticas (IL-6 y MCP-1) y moléculas de adhesión (VCAM y molécula de adhesión intercelular ICAM) en CMLV y células endoteliales a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. A finales de la etapa de la aterosclerosis, la Ang II también altera el equilibrio fibrinolítico mediante la producción de activador del plasminógeno-1 (PAI-1) por las células endoteliales (Modificado de Brasier, 2002).

#### 4.7.1.1.6.- El reclutamiento de células mononucleares

La Ang II influye en la expresión de moléculas proinflamatorias en la pared del vaso que influye en múltiples pasos para el reclutamiento de monocitos en el vaso dañado (**Figura 24**). En las células endoteliales, la Ang II regula positivamente la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), y la expresión de E-selectina a través de una vía dependiente de ROS.

En células de músculo liso vascular (CMLV), Ang II estimula la producción de VCAM-1, quimiocinas; proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), citocinas y la IL-6. La MCP-1 atrae específicamente monocitos y linfocitos T de memoria que expresan el receptor CCR2, son un tipo de células que están presentes en todas las etapas de la lesión aterosclerótica. Se cree MCP-1 tiene función de forma local en la pared del



vaso mediante el establecimiento de un gradiente químico para atraer monocitos adherentes y linfocitos T al sitio de la lesión. Finalmente, la IL-6 es una glicoproteína abundantemente secretada por monocitos activados y CMLV. Inicialmente descrito como un factor de crecimiento de células de plasma, hay IL-6 locales (paracrina) o con acciones de promoción de la proliferación de células de músculo liso que implica la producción local del factor de crecimiento transformante de plaquetas (PDGF). Además, como se discute a continuación, IL-6 produce efectos sistémicos ya que estimula la expresión de genes en órganos distantes (principalmente el hígado). La capacidad de la Ang II para inducir la expresión coordinada de las moléculas de adhesión y quimiocinas luego asegura el reclutamiento de leucocitos mononucleares en la pared del vaso. Los mecanismos por los que Ang II induce la expresión de genes inflamatorios se han investigado extensamente y se ha demostrado que la Ang II inducida por mecanismos de transducción de señales se superpone a las típicas de las citocinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ . Específicamente, la Ang II activa el potente factor de transcripción citoplásmica, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), una proteína que controla las redes de quimiocinas, el factor de crecimiento, modulación y control de la traducción y los genes celulares de supervivencia. El NF- $\kappa$ B es una familia de proteínas inducibles de unión al ADN que está regulado por el procesamiento de proteínas y por asociación con una familia de inhibidores citoplásmicos los I $\kappa$ Bs. Curiosamente, Ang II tiene acciones pleiotrópicas en múltiples puntos de la vía de activación de NF- $\kappa$ B en las CMLV. La Ang II no sólo induce la translocación de los secuestrados citoplásmicos del complejo NF- $\kappa$ B a través de la proteólisis específica de los inhibidores (I $\kappa$ Bs) sino que también induce el procesamiento de la forma de unión al ADN, NF- $\kappa$ B1, y la proteólisis del proto-oncogén c-Rel. Por otra parte, la activación de NF- $\kappa$ B parece estar bajo la señalización del NADH (P) oxidasa, ya que el tratamiento con antioxidantes interfiere con su activación por la Ang II. Relevantemente la vía de señalización del NF- $\kappa$ B para expresión moléculas inflamatorias se ha indicado por estudios independientes que muestran que la inhibición de la Ang II bloquea la activación del NF- $\kappa$ B inducible por la IL-6, VCAM-1, y expresión MCP-1. Un cuerpo de trabajo ha demostrado además que el NF- $\kappa$ B es inducible por los efectos de la oxidación de lípidos, macrófagos, y derivados de citocinas; interleucina 1-(IL-1), TNF- $\alpha$  y agentes infecciosos. Estas observaciones han conducido al modelo actual que demuestra que NF- $\kappa$ B desempeña un papel clave en la señalización de múltiples pasos





proaterogénicos, induciendo así la cascada inflamatoria de citocinas vasculares, induciendo reclutamiento celular y la mediación de la progresión aterosclerótica. Es importante destacar la relevancia de estos estudios *in vitro* de la activación de NF- $\kappa$ B en la aterosclerosis humana fue sugerido por la identificación de la activación del NF- $\kappa$ B en las CMLV, macrófagos y células endoteliales que residen en las placas ateroscleróticas humanas *in situ*. Debido a esta actividad central de coordinación en el respuesta inflamatoria, la inhibición del NF- $\kappa$ B en la pared del vaso es una diana terapéutica atractiva para la prevención de la inflamación y en última instancia la aterogénesis (Brasier, 2002).

#### **4.8.- Fármacos utilizados en el tratamiento del infarto agudo de miocardio.**

El tratamiento del ataque agudo consiste en la utilización de diferentes tipos de fármacos con diferentes finalidades. Fármacos utilizados para limitar la extensión del Infarto. Con esta finalidad se administran fármacos trombolíticos como la estreptoquinasa, uroquinasa y alteplasa. Estos fármacos disuelven los trombos a nivel coronario. La rápida administración de estos fármacos limita en gran manera la extensión del infarto y por tanto mejora la supervivencia del paciente. La adición de ácido acetilsalicílico mejora los beneficios producidos por estos fármacos. Los fármacos beta bloqueadores también se han utilizado con esta finalidad. Analgésicos opiodes: su finalidad es reducir el dolor y la actividad del sistema nervioso autónomo simpático. Tienen efectos vasodilatadores por lo que ayudan a disminuir la carga cardíaca. Diuréticos: se utilizan para tratar en algunos pacientes la insuficiencia cardíaca izquierda que se presenta como consecuencia del infarto. Antieméticos: los pacientes que padecen un infarto habitualmente tienen náuseas y vómitos que hay que tratar. También hay que tener en cuenta que la administración de opioides produce náuseas y vómitos. Antiarrítmicos: una de las complicaciones del infarto es la aparición de arritmias. Heparina: en los pacientes que padecen un infarto existe el riesgo de presentar una trombosis venosa profunda o una embolia pulmonar. Se suele administrar heparina de bajo peso molecular (Duran,2008).



#### **4.8.1.- Tratamiento en el post-infarto**

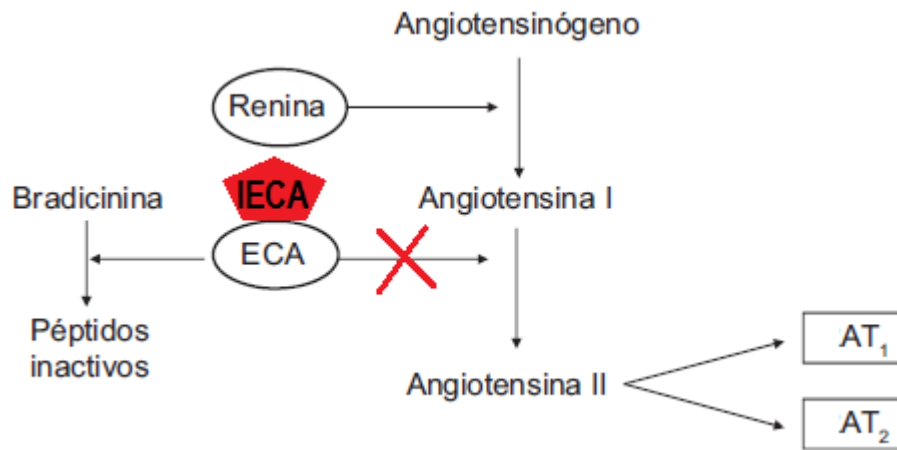
El paciente debe eliminar o reducir los factores de riesgo y realizar ejercicio físico. El tratamiento farmacológico va dirigido a tratar las posibles arritmias, insuficiencia cardíaca y realizar una prevención secundaria. La prevención secundaria se realiza administrando fármacos antiagregantes plaquetarios, betabloqueadores y/o iECA (Duran, 2008).

##### **4.8.1.1.- Captopril: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA)**

Los iECAS son uno de los grupos terapéuticos que mayor beneficio han demostrado en el tratamiento del paciente postinfarto del miocardio, al reducir la disfunción ventricular y la progresión hacia la insuficiencia cardíaca al evitar la remodelación patológica del ventrículo izquierdo. En pacientes con disfunción ventricular, los iECAS disminuyen la mortalidad y otros eventos adversos a mediano plazo entre 19 y 29%. Actualmente, su indicación es obligada en todo paciente con IAM y una fracción de expulsión menor del 40%. Un estudio EUROPA aún no publicado, demuestra el beneficio del uso de los iECAS en todos los pacientes postinfarto del miocardio independientemente del valor de su función ventricular residual. En resumen, los iECAS deben ser administrados a todo paciente postinfartado, a menos que exista contraindicación (hipotensión severa o sintomática, insuficiencia renal moderada e hipercalemia), todo paciente con IAM debe recibir un iECA en adición a un betabloqueador y aspirina. En los pacientes con intolerancia a los iECAS, los antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARA II) representan una alternativa muy interesante, la cual inicia su era de evaluación sistemática en estos pacientes (Alexanderson,2006).

##### **4.8.1.2.- Mecanismo de acción de los iECAs**

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) bloquean la conversión de la angiotensina I a angiotensina II, con lo que se inhibe así el sistema renina angiotensina- aldosterona (**Figura 25**).

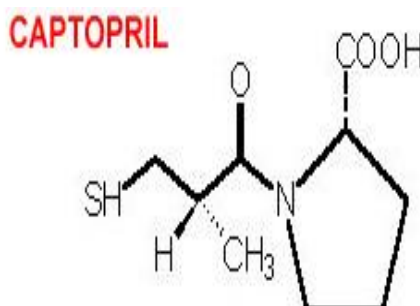


**Figura 25.-** Esquema clásico del sistema renina angiotensina ECA, y su inhibición mediante los iECA.

Los iECAs producen una disminución de la presión arterial mediante la reducción de las resistencias periféricas, con poca o nula modificación de la frecuencia cardíaca, el gasto cardíaco o el volumen sanguíneo; además, tampoco alteran los reflejos barorreceptores. Los iECA se han convertido en un elemento fundamental del tratamiento de los pacientes con IAM, puesto que previenen el remodelado ventricular izquierdo y sus complicaciones, incluidas la insuficiencia cardiaca congestiva y la muerte. Además, los iECA tienen un papel cada vez mayor en el tratamiento de los distintos síndromes coronarios, puesto que al parecer previenen la progresión de las lesiones vasculares. Contrariamente a lo que ocurre con la aspirina y los fármacos fibrinolíticos, no es fundamental iniciar la administración del fármaco en la fase-hiperaguda del SCA. La administración de iECA es beneficiosa en cualquier momento posterior a la aparición de un SCA pero el beneficio es menor si la terapia se retrasa días o semanas. Por tanto, un momento razonable para empezar la administración de estos fármacos es durante las primeras 6-12 horas, una vez que el paciente haya sido ya estabilizado en una unidad de cuidados coronarios. Los iECA deben administrarse por vía oral y nunca por vía intravenosa ya que por esta última vía pueden facilitar la hipotensión y resultar incluso perjudiciales. Los iECA previenen la progresión de la aterosclerosis y disminuyen la incidencia de infarto miocárdio. Estos fármacos tienen efectos antiproliferativos y antimigratorio sobre las células musculares lisas, los neutrófilos y las células mononucleares, favorecen la fibrinólisis endógena y mejoran la disfunción endotelial. Desde el punto de vista clínico, la reducción en la tasa de IAM se observó inicialmente con captopril en el estudio SAVE (Survival and Ventricular Enlargement). Recientemente en el estudio HOPE (Heart Outcomes Prevention



Evaluation) (Lleводot,2004). Los estudios clínicos han demostrado que Captopril administrado dentro de los primeros días o la siguiente semana posinfarto, a pacientes clínicamente estables, mejora el pronóstico de supervivencia y reduce subsecuentemente la morbilidad y mortalidad por insuficiencia cardíaca congestiva.

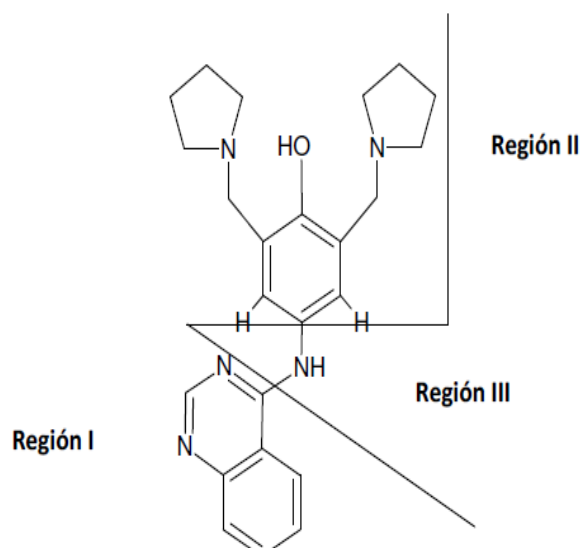


**Figura 26.** Estructura química del Captopril

#### 4.9.- Compuesto tiomorfolínico 4-*tert*-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol (LQM19)

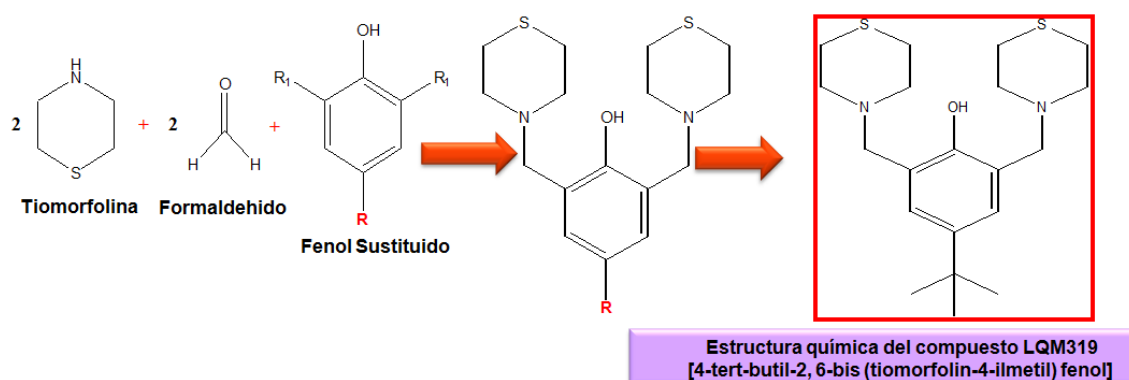
La historia de este compuesto nace con la investigación iniciada a finales del año 1970 por un grupo de investigadores de la República China, quienes al estar examinando las propiedades antimalarías de los derivados de la febrifugina, notaron que un compuesto en la prueba, Changrolina era un agente antiarrítmico efectivo, con estructura diferente a los agentes conocidos comúnmente a la fecha.

La molécula de Changrolina puede dividirse en tres regiones: 1) consiste en una molécula, de quinazolina que puede reemplazarse por una gran variedad de heterociclos sin perder la actividad antiarrítmica. En la región 2) el modelo de un 2,6 bis (1-metil-1-il-pirrolidin)fenol tetrasustituido presenta la mejor actividad y si esta región no está completa, la actividad es nula; La región 3) es un enlace entre la región 1 y 2 en el cual pueden incluirse diferentes grupos para tratar de aumentar la actividad y disminuir la toxicidad. Así se inició el estudio de la relación estructura química actividad biológica (SAR), la cual consistía en cambiar los sustituyentes de la región 2 y 3, encontrando que los anillos pirrolidínicos podían sustituirse por otros anillos heterocíclicos como la morfolina y la tiomorfolina (**Figura 27**).



**Figura 27.** Molécula de la Changrolina en tres regiones. 1) Molécula de quinazolina, 2) (2,6-bis (1-metil-1-il-pirrolidin) fenol; 3) el enlace entre la región 1 y 2.

Al no concluirse dicho proyecto en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se retomó la investigación sintetizando una serie de compuestos mediante un sistema asistido por computadora. Procediendo a la síntesis de compuestos análogos de la región (2) de la Changrolina mediante la reacción química entre un fenol sustituido (cabeza de serie, un formaldehído más una o dos moléculas de morfolina y/o tiomorfolina. Por medio de los mecanismos de reacción de Sustitución Electrófila Aromática (vía directa) o (vía de Mannich). Obteniendo así el compuesto LQM319 (Laboratorio de Química Medicinal) se sintetizó por medio de la reacción estequiométrica entre la morfolina, terbutilfeno y el formaldehído utilizando una lámpara IR como fuente de energía, obteniéndose como producto el 2,6-bis (tiomorfolinometil)-4-terbutilfenol (**Figura 28**) (Rocha,2008,Castillo, 2008,Mena 2010).



**Figura 28.** Síntesis y Estructura química del LQM319



Quién a su vez resultó ser el compuesto con mejor eficacia, disminuyendo la PAM (Presión Arterial Media), PAD (Presión Arterial Diastólica), PAS (Presión Arterial Sistólica), FC (Frecuencia Cardiaca); a dosis menores a 0.001 mg/Kg siendo aún más potente que los fármacos antihipertensivos comerciales Omapatrilat y Losartán.

**Tabla 4.** Porcentaje de eficacia de Fármacos comerciales vs compuestos sintetizados en FESC-1

Compuesto/Fármaco	% de Eficacia			
	PAM	PAD	PAS	FC
Captopril	100	100	100	46
LQM319	75.77	96.42	77.81	90.05
Omapatrilat	29.15	32.08	33.34	29.42
Losartán	13.57	45.64	25.28	27.23

Por ciento de eficacia de los compuestos tomando como referencia a un inhibidor de la ECA (Captopril) a dosis de 3.0 mg/Kg, PAM (Presión Arterial Media), PAD (Presión Arterial Diastólica), PAS (Presión Arterial Sistólica), FC (Frecuencia Cardiaca) (Rocha,2008)

En estudios recientes se ha determinado el efecto vasodilatador del compuesto tiomofolinico LQM319 en aorta de ratas hipertensas espontáneas (SHR), mediante las curvas concentración-respuesta de la Fenilefrina en presencia y ausencia de los compuesto, donde para ver si había disminución de la contracción vascular provocada por la Fenilefrina, se utilizó también las curvas concentración-% respuesta y las dobles recíprocas, con el fin de obtener el porcentaje de eficacia y las constantes de afinidad ( $K_D$ ) respectivamente, encontrando que en las aortas torácicas y aortas abdominales se presenta un efecto vasodilatador esto mediante las curvas concentración- respuesta y mediante las gráficas de doble recíprocas se demostró que el compuesto presenta un comportamiento de antagonista no competitivo al receptor adrenérgico  $\alpha_1$  debido a que no presentaba una variación significativa entre las  $K_D$ , también se demostró el porcentaje de respuesta máxima alcanzada (vasoconstricción) del compuesto LQM319 mediante curvas concentración-% respuesta en donde se obtiene un porcentaje de 102.8% y de 67.04 % de contracción respecto al 100% de respuesta provocada por la Fenilefrina en aorta torácica y aorta abdominal de rata SHR respectivamente (Mena,2010). En un estudio diferente se ha demostrado el efecto del compuesto sobre la contracción



de la aurícula derecha de ratas Wistar macho joven, en donde se obtuvieron resultados iguales a la anterior, observando que el LQM319 presenta una disminución de la respuesta contráctil de la Fenilefrina sobre la aurícula derecha y se comporta también como un antagonista no competitivo de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 (Castillo, 2008). Se ha realizado también un estudio genotóxico mediante la prueba de Micronúcleos del compuesto Tiomorfolínico LQM319 en ratones machos cepa CD1, para ver si el compuesto causaba daño al material genético y el grado de toxicidad del compuesto mediante la DL50 (**Tabla 5**), teniendo que la DL50 por el método de Lorke es de 471.1 mg/kg pero debido a que este método no es un procedimiento toxicológico más difundido y aceptado, se realizó la prueba de Probit como parámetro que respaldó el resultado. El estudio fue realizado recientemente por la Maestra en Ciencias Ma. Pilar Márquez quien obtuvo una DL50 de 327.7 mg/kg, por lo que el compuesto LQM319 se clasifica como una sustancia moderadamente tóxica. Tomando en referencia los índices de seguridad en los compuestos comerciales: Captopril y Losartán indican las siguientes DL50 de 1040 mg/kg y 1500 mg/kg respectivamente, por lo que resultó tener una toxicidad mayor que éstos, los cuales son ligeramente tóxicos. También se demostró que el LQM319 no es un agente clastógeno o anéugeno que puede causar un efecto genotóxico y se excluyó también que sea un agente citotóxico a las dosis utilizadas de 10 mg/kg a 60 mg/kg en comparación con el comportamiento que tuvieron los animales tratadas con la Ifosfamida a la misma dosis utilizada como control positivo causante de daño al material genético (Rocha, 2008). Estudios recientes muestran que en el efecto antihipertensivo del LQM319 participa Ang-(1-7) y que dicho efecto es semejante al obtenido por Captopril por lo que es posible que el mecanismo de éste compuesto sea a través de la inhibición de la ECA y en estudios realizados por el Dr. Ángeles y Col en el 2011 mostraron mediante estudios a nivel computacional que el compuesto LQM319 presenta una afinidad por la ECA muy parecida a la de Captopril siendo esta mayor que el Captopril. Por otro lado las Curvas Concentración-Respuesta tanto a Ang I como Ang II al mostrar efectos paralelos entre sí nos evidencia que el compuesto LQM319 se rige bajo el mismo mecanismo de acción del Captopril (Orozco, 2012).

**Tabla 5. Potencia de un tóxico en función de la DL50**

	DL 50 mg/kg
1.- Extremadamente tóxico	<1
2.- Altamente tóxico	1-50
3.- Moderadamente tóxico	50-500
4.- Ligeramente tóxico	500-5000
5.- Prácticamente inocuo	5000-15000

## 5.- JUSTIFICACIÓN

Debido al gran índice de mortalidad por enfermedades cardíacas tanto en nuestro país como a nivel mundial, en especial por causa del IAM, es de gran interés realizar estudios relacionados con este padecimiento y buscar nuevos fármacos que ayuden a reducir este índice o bien ayuden a regular el padecimiento, por ello en la FES-Cuautitlán-UNAM, se ha sintetizado un grupo de compuestos los cuales han mostrado efectos benéficos a nivel cardiovascular, dirigido por el Dr. Enrique Ángeles del laboratorio de Química Medicinal (LQM) y la Dra. Luisa Martínez del laboratorio de Farmacología del Miocardio quienes tienen como objetivo desarrollar compuestos que puedan salir al mercado a menor costo. Entre los compuestos que han mostrado mejores efectos hipotensor, antihipertensivo, antiarrítmico y cardioprotector en el infarto miocárdico está el tiomorfolínico [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319) en comparación con fármacos ya existentes en el mercado como Captopril, Omapatrilat y Losartán. Por esto es de suma importancia darle seguimiento a este compuesto y ver que otros efectos positivos pueda tener. En el caso de infarto miocárdico, sin duda será benéfico ya que este compuesto ha disminuido los diferentes tipos de arritmias post-infarto y el índice de mortalidad. Por lo que este compuesto pudiera llegar a servir como tratamiento en los diferentes padecimientos cardiovasculares. De hecho los avances de la medicina y la industria farmacéutica exigen realizar estudios para determinar Biomarcadores que puedan servir para el diagnóstico o indicar el efecto que está produciendo el fármaco sobre éste, con la finalidad de comprender mejor el papel que juegan los Biomarcadores en el IAM ya sea como cardioprotector o dañino. Por ello, es de interés el estudio al factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B ya que expresa alrededor de 200 genes que pueden ser pro-inflamatorios, anti-inflamatorios, anti-apoptóticos y pro-apoptóticos en el IAM.





## 6.- MÉTODOS:

Se trabajó con ratas Wistar machos procedentes del Bioterio de la FESC-1 de peso de entre 280-350 gramos de 10-13 semanas de edad y se formaron 4 grupos experimentales: 1) control sin infarto (n=10), 2) ratas con ligadura coronaria infartadas sin tratamiento (n=10), 3) infarto miocárdico + Captopril 1 mg/Kg/día/im (n=10) y 4) infarto miocárdico + LQM319 1 mg/Kg/día/im (n=10). A los grupos con tratamiento se les administro 30 min antes de la oclusión coronaria y 24h postoclusión.

### 6.1.- Inducción del infarto miocardio por oclusión de la arteria coronaria

La oclusión de arteria coronaria se realizó mediante una toracotomía entre el 4º y 5º espacio intercostal que permitió exteriorizar el corazón y localizar la arteria coronaria realizando una ligadura mediante el uso de una aguja atraumática e hilo seda 5/0. El corazón se regresó a la cavidad torácica y se cerró, por medio de una bombilla de hule se insuflan los pulmones y se restaura la presión negativa intratorácica y se permite recuperación del animal (Fishbein,1978).

### 6.2.- Extracción de tejido.

Después de las 48 horas de haber provocado el infarto se sacrificó a las ratas mediante dislocación, y se procedió a extraer el corazón el cual se colocó en solución salina fisiológica 0.9% fría (SSF 0.9%), después se realizó la disección del tejido separando las orejuelas, aurícula y ventrículo derecho de la aurícula y ventrículo izquierdo, ésta última es la zona de interés a la cual se le calculó el área de infarto y posteriormente se separó el área infartada del área no infartada, y se colocaron en tubos Eppendorf que contienen RNA later (solución de RNA de estabilización para tejidos, Sigma-Aldrich) y se almacenó a -70°C hasta su uso posterior para llevar a cabo las técnica de ELISA y RT-PCR.

### 6.3.- Cálculo del porcentaje del área de infarto

Los corazones extraídos, en especial el área de interés el ventrículo izquierdo (VI), se coloca en sobre un papel blanco se mide el área total y posteriormente se localiza el área infartada, se corta y se coloca sobre el mismo papel y se dibuja el contorno del tejido, se recorta el área del dibujo del tejido del papel y se procede a pesar el papel y para calcular finalmente el área de infarto de cada rata, mediante una regla de tres para obtener el porcentaje de área de infarto.

Área total (VI) -----100%

Área infartada (VI) -----x



#### **6.4.- Aislamiento de RNA (Método de Trizol)**

Se homogeneizó 100 mg de tejido (ventrículo izquierdo de corazón) con 1 mL de trizol y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente cada incubación y centrifugación se llevó a cabo a 4°C. Después de la disociación del complejo nucleoproteico se adicionó 200 µL de cloroformo, se incubó por 15 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos, posteriormente se tomó 500 µL de la fase acuosa y se le adicionó 500 µL de isopropanol (para precipitar el RNA), se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75% para lavar la pastilla de RNA, se centrifugó a 7,500 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Finalmente se resuspendió la pastilla de RNA en agua DEPC (0.1%). Posteriormente se llevo a cabo la cuantificación a 260/280 nm (UV). La relación  $A_{260/280 \text{ nm}}$  indica el grado de pureza, si la relación es menor de 1.8 indica contaminación con proteínas, también se determinó la concentración del RNA.

Para determinar la integridad del RNA se coloco en un gel de agarosa al 1%, 2 µg de RNA. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (UV). Se observó la presencia de RNA total: RNAr, RNAt y RNAm.

#### **6.5.- RT-PCR**

La RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas molde de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. La amplificación de DNA permite la multiplicación exponencial de unas pocas moléculas molde de DNA hasta  $10^6$  copias con una alta especificidad.

##### **6.5.1.- Retrotranscripción Inversa**

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes: 2 µl RNA (2 µg), 1 µL de oligo dt (0.5 µg/µl), 1 µL de 10 mM dNTP, 4 µl amortiguador (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 2 µL de 0.1 M DTT, 1 µL de superscript RT (enzima retrotranscriptasa), 9 µL dH<sub>2</sub>O se incubo a 42°C por 60 minutos, se inactivo a la enzima a 70° C por 15 minutos, e incubó 4° C por 15 minutos. El control negativo se realizo con los componentes de la mezcla antes indicados, excepto superscript RT y posteriormente se realizará la PCR.



### 6.5.2.- PCR

Los “primers” (cebadores) se diseñaron tomando en cuenta las siguientes características, son específicos de la secuencia blanco, el largo es de 19-25 nucleótidos, presentan del 45-60% en GC, se evitaron repeticiones mayores de tres bases, el extremo 3´ terminal es C ó T/CT para NF-κB/p65 y A ó A/AA para GAPDH, la temperatura de alineamiento es similar para el par de “primers”(cebadores), la secuencia de ambos “primers” (cebadores) no son complementarias por lo tanto no hibridan con ellos mismos o entre ellos.

Los “primers” (cebadores) específicos de la secuencia blanco son:

NF-κB/p65 (Ming, 2012)

Sentido: 5'-ATGGACGATCTGTTTCCC-3'

Antisentido: 5'-GTCTTAGTGGTATCTGTGCT-3'

Tamaño de 170 pb

GAPDH:

Sentido: 5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3'

Antisentido: 5'-GTAGCCATATTCATTGTCATA-3'

Tamaño de 516 pb.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, los componentes de la mezcla de reacción son los siguientes: 2.5 µl amortiguador (200 nM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 1 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de 10 mM dNTP, 1 µL primer sentido 10 µM, 1 µL primer antisentido 10 µM, 1 µL Taq DNApol (platinum Taq, 2-5 unidades/µl), 5 µL cDNA y 12.5 µL agua deionizada estéril.

La mezcla de reacción así como las muestras permanecieron en hielo hasta iniciar la reacción bajo las siguientes condiciones en el termociclador Perkin Elmer 2400: predesnaturalización (94°C por 2 minutos), 36 ciclos de: desnaturalización (94°C por 1 minuto), alineamiento (55° C por 1 minuto) y extensión (72° C por 1 minuto). Un ciclo de extensión final (72°C por 10 minutos).

Se mezcló 2.5 µl del producto de PCR con 5 µl de amortiguador de muestra [Glicerol 5% (v/v), Na<sub>2</sub>EDTA • 2H<sub>2</sub>O 10 mM, SDS 0.1% (w/v), azul de bromofenol 0.01% (w/v)] y se colocó en un gel de agarosa 2%, el cuál sé corrió a 75 volts por 45 minutos en presencia del amortiguador TAE. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador (UV).



## **6.6.- ELISA**

### **6.6.1.- Homogenado para estimar la síntesis de proteínas NF- $\kappa$ B**

Se pesó y cortó el tejido de VI de corazón en pedazos pequeños y se lavó con 5 mL de Solución amortiguadora de fosfatos más fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PBS-PMSF). Posteriormente para el homogenizado se adicionó amortiguador hipotónico suplementado con Ditioneitol (DTT 1M y solución detergente 1%) se incubó 30 min a 4°C y se centrifugó a 10000 rpm/10´/4°C. Se separó el sobrenadante el cual corresponde a la fracción citoplasmática y se almacenó a 4°C hasta su uso. La pastilla se resuspendió en solución amortiguadora de lisis nuclear e incubó durante 30 min a 4°C. Pasado el tiempo se centrifugó a 14000 rpm/10´/4°C, se transfirió el sobrenadante (Fracción Nuclear) a tubos de Eppendorf fríos y se almacenó a -70°C hasta su uso. Todo el procedimiento se realizó mediante el Kit, NF- $\kappa$ B/p65 ActivELISA (Catalog No. IMK-503 Versión 06 2008 IMGENEX Corporation).

### **6.6.2.- Determinación de proteínas citoplasmática y citosólica por el método de Bradford.**

Se homogeneizó 1g de VI de corazón con 5 mL de solución amortiguadora para muestra (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8). Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford, las muestras fueron leídas a 595 nm (espectrofotómetro Beckman DU\* 650).

### **6.6.3.- Determinación de NF- $\kappa$ B/p65 mediante el Kit ActivELISA**

Se adicionó 100  $\mu$ L de anticuerpo de captura a todos los pocillos y se incubó 24 h a 4°C. Posteriormente se lavó con 300  $\mu$ L de amortiguador de lavado y bloqueo con 200  $\mu$ L de buffer de bloqueo e incubó durante 1h a temperatura ambiente. Se preparó la curva estándar de proteína p65 usando las siguientes concentraciones (1000, 500, 250, 125, 52.5, 31.25, 15.6 y cero (blanco) ng/mL). Pasado el tiempo de incubación se removió el amortiguador de bloqueo y remplazo con 100  $\mu$ L de amortiguador de bloqueo nuevo en los pocillos B1 a H1 y B2 a H2. Posteriormente se adiciona 200  $\mu$ L de estándar recombinante de p65 a los pozos A1 y A2 y transfirió 100  $\mu$ L de los pozos A1 y A2 a B1 y B2 y así se continuó con la serie de diluciones hasta G1 y G2. Utilizando H1 y H2 como blanco. Se adicionó 100  $\mu$ L de muestra a los pocillos A3 a H11 e incubó 4 °C toda la noche. Se removió y lavó 4 veces con amortiguador de lavado los pozos de A3 a H11. Se agregó 100  $\mu$ L Anticuerpo de



detección y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se removió y lavó 4 veces con amortiguador de lavado. Se adicionó 100  $\mu$ L de Anticuerpo secundario conjugado con AKP (fosfatasa alcalina) a los pocillos A3 a H11 e incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se removió y lavó 5 veces los pozos con 300  $\mu$ L de amortiguador de lavado. Finalmente se adicionó 100  $\mu$ L de sustrato de  $\rho$ -nitrofenilfosfato ( $\rho$ NPP) a todos los pocillos e incubó durante 30 min a temperatura ambiente pasado este tiempo se lee a 405 nm. El procedimiento se realizó mediante el Kit, NF- $\kappa$ B/p65 ActivELISA (Catalog No. IMK-503 Versión 06 2008 IMGEX Corporation).

### **6.7.- Análisis estadístico**

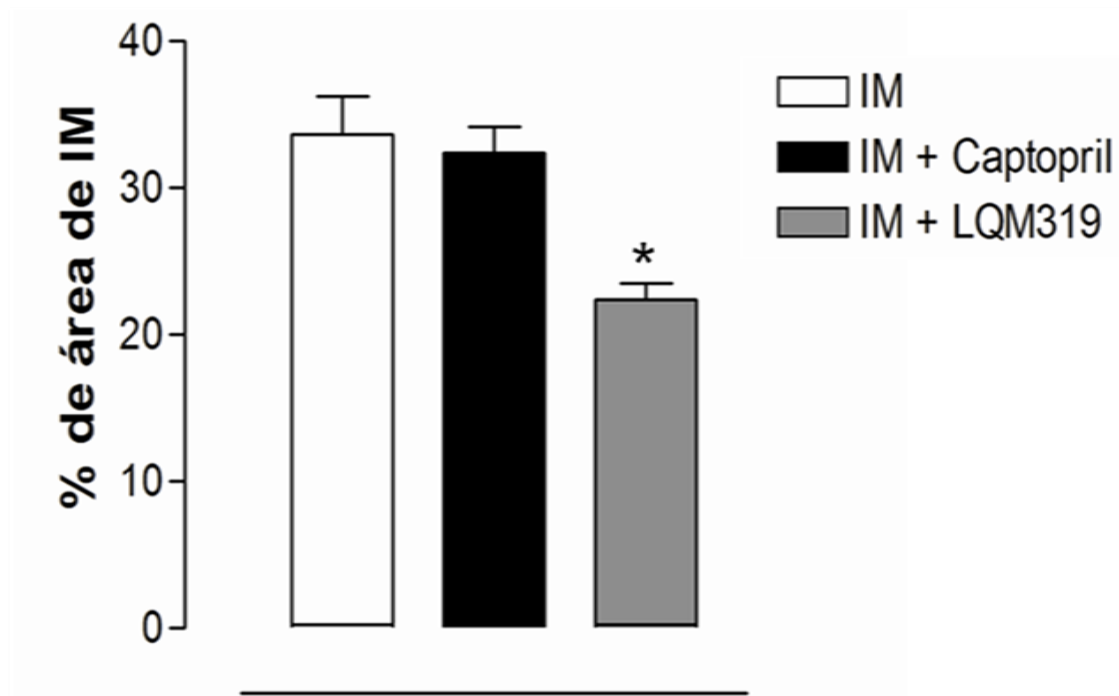
En donde se asumieron diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0.001$  mediante la prueba de Bonferroni y la prueba de ANOVA.

Los programas utilizados para la elaboración de las gráficas y la estadística fueron Excel 2007 y Graph Pad Prism 6.0.



## 7.- RESULTADOS

En el presente proyecto se formaron cuatro grupos de trabajo, un grupo control sin infarto, un grupo con infarto miocárdico (IM), un grupo con IM + Captopril y un grupo de IM + LQM319, se determinó el porcentaje de área de infarto en los tres últimos grupos después de 48 h de haber realizado la oclusión de la arteria coronaria, como se puede apreciar en la **Gráfica 1**, el único grupo que presenta disminución del porcentaje del área, es el grupo tratado con el compuesto LQM319, respecto a las de IM e IM + Captopril.

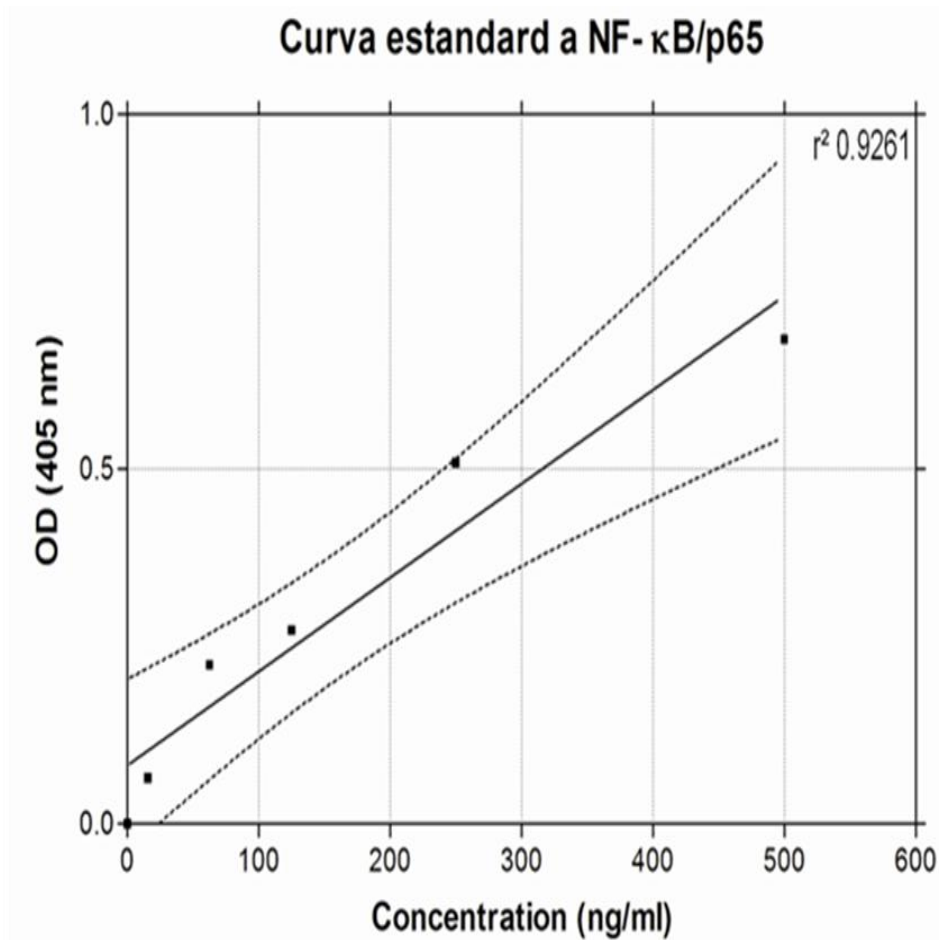


**Gráfica 1.-** Porcentaje de área de infarto de los grupos con Infarto Miocárdico (IM), IM + Captopril e IM + LQM319, después de las 48 h de oclusión de la arteria coronaria descendente \*  $P < 0.001$ , IM + LQM319 vs IM+ Captopril vs IM.



En los cuatro grupos experimentales se determinó la síntesis de la proteína p65 por la técnica de ELISA, en tres grupos experimentales, la proteína se determinó en dos áreas; 1) las que no presentaban infarto del ventrículo izquierdo (IV) y 2) las que presentaban infarto del VI. Además la proteína NF- $\kappa$ B/p65 se determinó en la fracción nuclear y la fracción citoplasmática de cada área como se observa en la **gráfica 3 y gráfica 4**.

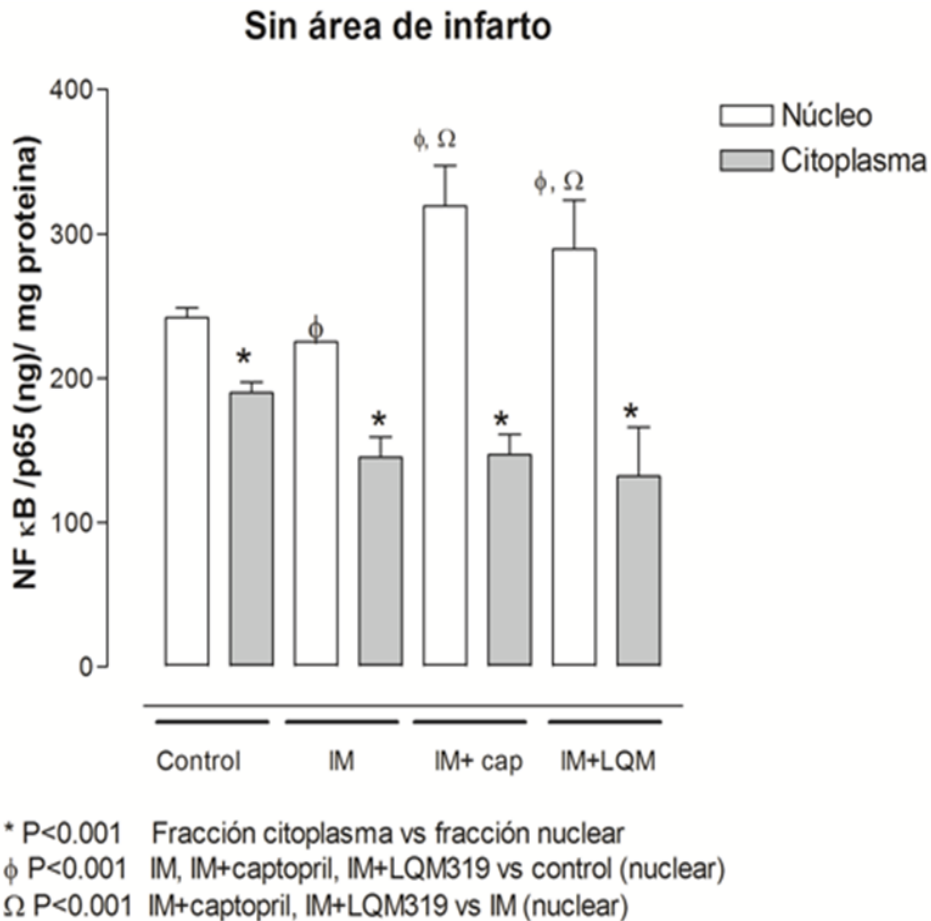
Primero se realizó una curva estándar del Factor NF- $\kappa$ B/p65, la cual se observa en la **Gráfica 2**, para interpolar la concentración de la proteína p65.



**Gráfica 2.-** Curva estándar del Factor NF- $\kappa$ B/p65, donde la lectura de las absorbancia se llevo a cabo a una  $\lambda=405\text{nm}$ , obteniendo una  $r^2=0.9261$ .



En la **gráfica 3** de las áreas sin infarto, sí hay diferencia significativa entre cada uno de los grupos a nivel nuclear pero no así a nivel citoplasmático y en la **gráfica 4** de las áreas con infarto, sí hay diferencia entre cada uno de los grupos a nivel nuclear así como también a nivel citoplasmático, en los tres grupos de trabajo, IM, IM + Captopril e IM + LQM319.

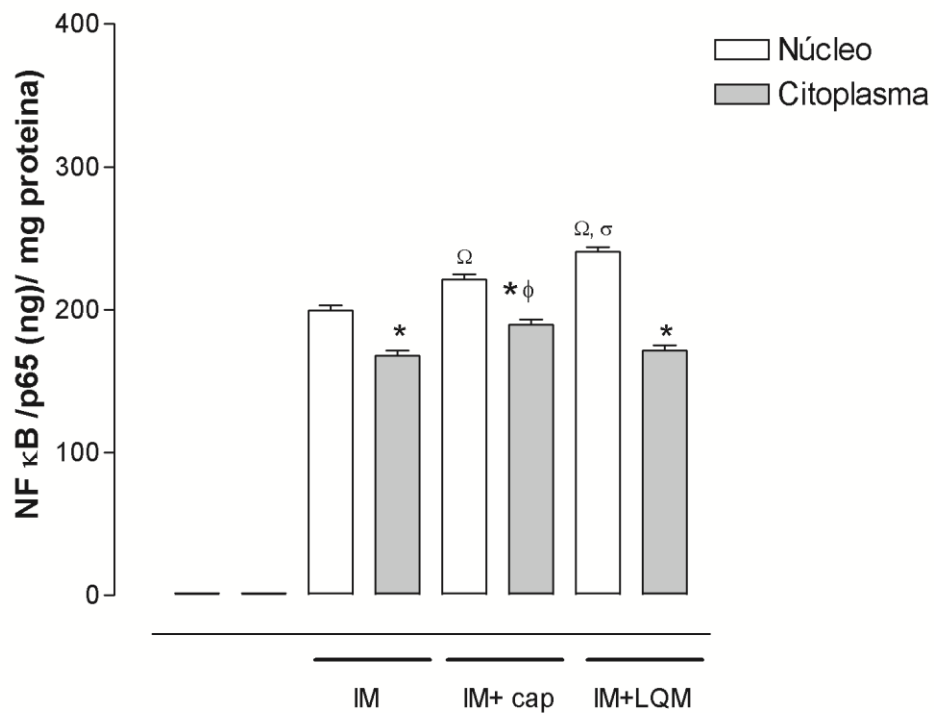


**Gráfica 3.** Concentración de p65 en las áreas sin infarto de cada uno de los grupos de trabajo a nivel nuclear y citoplasmático. En cada grupo se trabajó con una n=5.





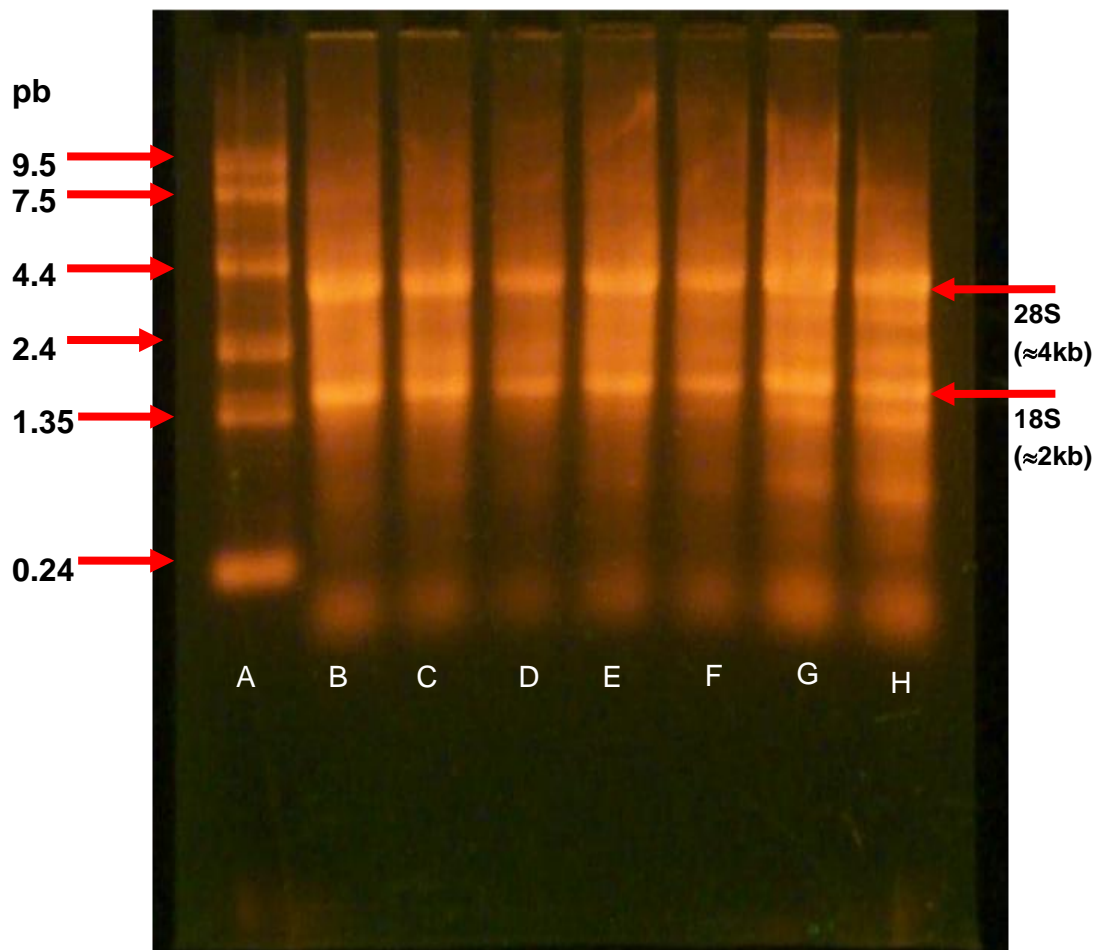
### Con área de infarto



- \* P<0.001 Fracción citoplasma vs fracción nuclear
- φ P<0.001 IM+captopril vs IM (Citoplasma)
- Ω P< 0.001 IM+captopril, IM + LQM319 vs IM (nuclear)
- σ P<0.001 IM+LQM319 vs IM + captopril (nuclear)

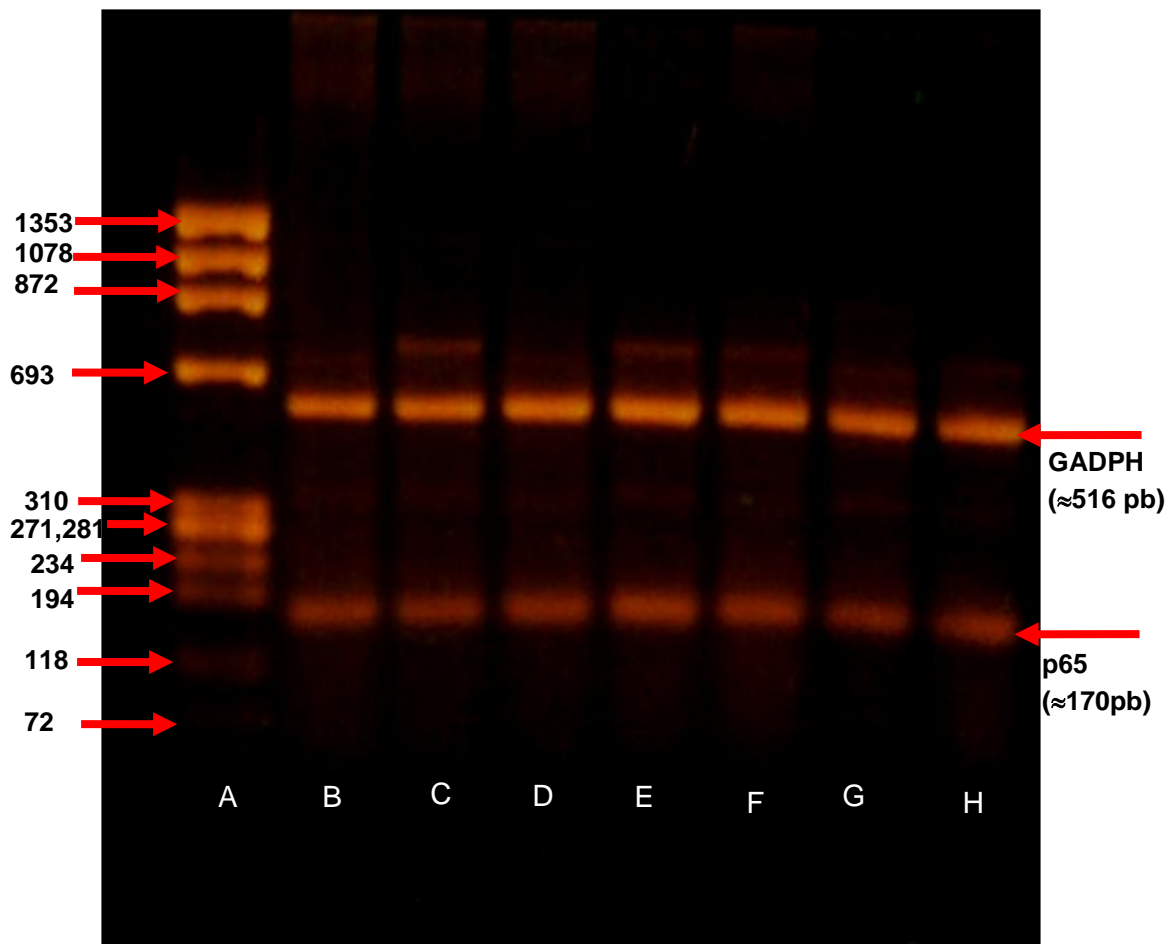
**Gráfica 4.** Concentración de proteínas en las áreas con infarto de cada uno de los grupos de trabajo a nivel nuclear y citoplasmático. Cada uno de los grupos con una n=5.

Para evaluar cambios a nivel de RNAm se determinó la expresión de NF-κB/p65 en el tejido de cada uno de los grupos (n=5), mediante la técnica de RT-PCR. Para poder llevar a cabo esta técnica primero se realizó la extracción de RNA, como se muestra en la **Figura 29** la integridad de cada unos de los RNA de los diferentes grupos de trabajo, en el gel se muestran los RNA de 28s (≈ 4 kb) y 18s (≈ 2 kb).

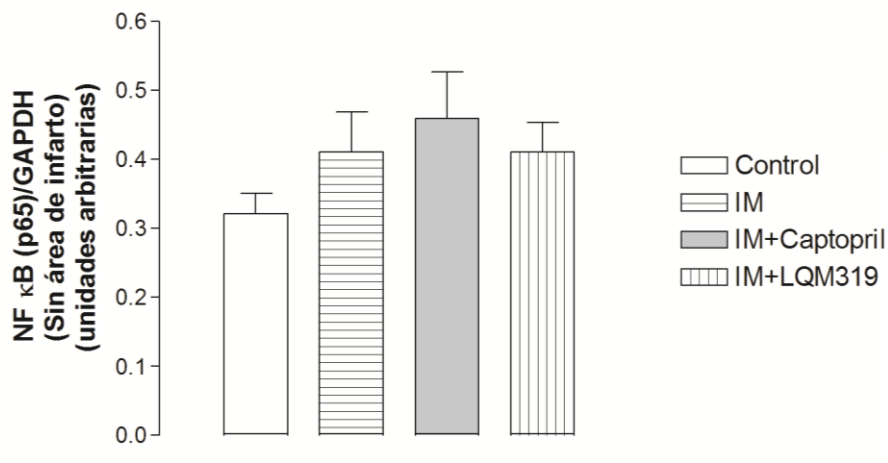
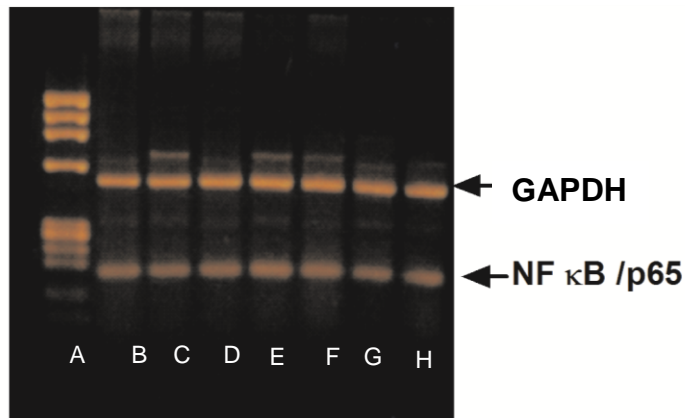


**Figura 29.** Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio que muestra a los RNA de cada grupo de trabajo, las áreas sin infarto y las áreas con infarto del ventrículo izquierdo. Se observan bandas de (28s  $\approx$  4 kb) y 18s ( $\approx$  2 kb). A) Marcador de peso molecular B) Control C) IM S/AI D) IM + Captopril S/AI E) IM + LQM319 F) IM C/AI G) IM + Captopril C/AI H) IM + LQM319 C/AI, **S/AI** (Sin área de infarto) **C/AI** (Con área de infarto)

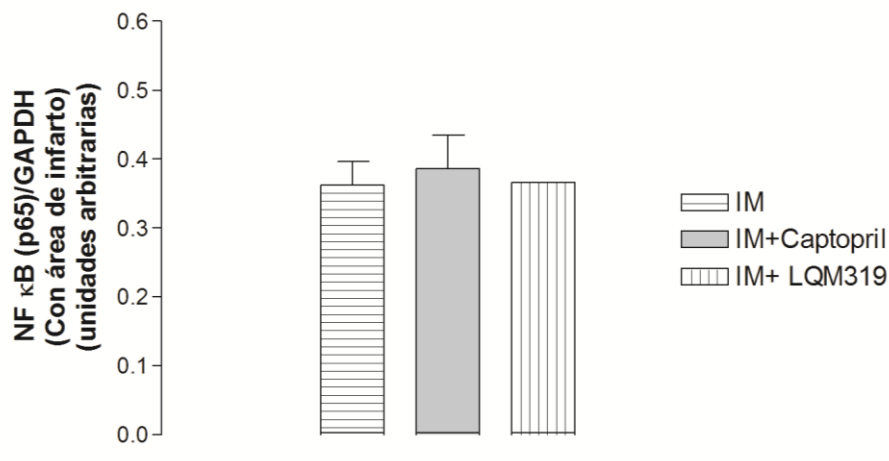
Una vez que se obtuvo los RNA íntegros se procedió a realizar la técnica de RT-PCR. En la **Figura 30** se muestra un gel de agarosa al 2% con cada muestra de ADN de cada uno de los grupos de trabajo, se utilizó el marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments de tamaño 40 $\mu$ g, adecuados para el dimensionamiento lineal del ADN que va 72-1353 pb. La determinación del peso de cada uno de nuestros ADN, como control positivo se utilizó al gen constitutivo de las células (GADPH) de 516 pb y nuestro gen de interés el NF-kB/p65 con peso de 170 pb. Mientras que en la **Gráfica 5a y 5b** se muestran las Densitometrías de cada uno los grupos de trabajo, en las dos diferentes áreas sin y con infarto miocárdico, respectivamente. En donde en ambos casos no hay diferencia significativa entre grupos  $P > 0.01$ .



**Figura 30.** Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio que muestra a los DNA de cada grupo de trabajo, con sus dos áreas del ventrículo izquierdo, las áreas sin infarto y las áreas con infarto. Se observan bandas  $\approx 516$  pb que corresponde al GADPH y  $\approx 170$  pb que corresponde a p65. A) Marcador de peso molecular B) Control C) IM S/AI D) IM + Captopril S/AI E) IM + LQM319 S/AI F) IM C/AI G) IM + Captopril C/AI H) IM + LQM319 C/AI, **S/AI** (Sin área de infarto) **C/AI** (Con área de infarto).



Gráfica 5a.



Gráfica 5b

**Gráfica 5a.** Densitometría del NF-κB(p65)/GAPDH en las áreas sin infarto de los diferentes grupos de trabajo (Control, IM, IM+ Captopril e IM + LQM319) no hay diferencia significativa entre cada grupo  $P > 0.001$ . **Gráfica 5b** Densitometría del NF-κB(p65)/GAPDH en las áreas con infarto de los diferentes grupos de trabajo ( IM, IM+ Captopril e IM + LQM319) no hay diferencia significativa entre cada grupo  $P > 0.001$ . Y en la parte superior se muestra la imagen de cada uno de los ADN de las muestras de trabajo. A) Marcador de peso molecular B) Control C) IM S/AI D) IM + Captopril S/AI E) IM + LQM319 F) IM C/AI G) IM + Captopril C/AI H) IM + LQM319 C/AI, **S/AI** (Sin área de infarto) **C/AI** (Con área de infarto). Cada grupo experimental con una  $n=5$ .



## 8.- DISCUSIÓN

Las enfermedades cardíacas son la primera causa de muerte a nivel mundial, donde prácticamente todas terminan con un infarto al miocardio. De muchas de ellas se conocen las causas pero se desconocen a profundidad cuáles pueden ser los mecanismos moleculares que las originan.

Sin embargo, es importante entender estos mecanismos, en particular los que dependen de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B que le permiten al cardiomiocito activar por medio de diferentes estímulos los programas genéticos que traen consigo una amplia gama de posibilidades de respuesta (Hernández, 2008).

Muchos años de estudios después de la primera descripción del factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B) por Sen y Baltimore, demuestran que el NF- $\kappa$ B se ha visto implicado en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos importantes, incluyendo el control de la apoptosis, las funciones inmunes, la hipertensión y el desarrollo embrionario.

En el corazón, un papel importante del NF- $\kappa$ B se ha demostrado, exclusivamente en experimentos de isquemia/reperfusión o en la fase temprana del infarto miocárdico (Frantz, 2003). Dado que, el NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que parece jugar un papel clave en patologías cardíacas, es importante mantenerlo inactivo o activo en el citoplasma con el uso de fármacos o por la transferencia de genes en las enfermedades donde se encuentra muy activo puesto que ha ayudado a impedir que éstas progresen. Sin embargo, este efecto es transitorio ya que en el momento que desaparece el mecanismo que mantiene inactivo al NF- $\kappa$ B, éste nuevamente se vuelve a activar (Hernández, 2008).

Dado que son múltiples las vías a través de las cuales el NF- $\kappa$ B puede actuar, es importante identificar a cada una de ellas de forma independiente con la finalidad de bloquear de manera selectiva el paso de la señal del estímulo que provoca una alteración cardíaca, donde la participación del NF- $\kappa$ B es activa. Por ejemplo, una posibilidad interesante consiste en conocer más a fondo los mecanismos de activación de NF- $\kappa$ B que regulan la expresión de proteínas anti-apoptóticas para desarrollar estrategias donde se puedan encender estas vías en los cardiomiocitos en camino de la apoptosis (Hernández, 2008).

Por lo tanto, el conocer el papel del factor NF- $\kappa$ B en los problemas cardiovasculares como el infarto agudo del miocárdio, es importante ya que al activarse y traslocarse



al núcleo tiene la posibilidad de expresar una gran variedad de genes en el infarto, tanto pro-inflamatorios como anti-apoptóticos, entre otros, dependiendo de los diferentes estímulos y vías de señalización por la que puede activarse, por lo cual se procedió a realizar este estudio para ver si el compuesto Tiomorfolínico 4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol (LQM319) presenta algún efecto sobre el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B/p65, ya que se conocen los efectos producidos por el compuesto en padecimientos cardiacos.

En este proyecto, se trabajó con 4 diferentes grupos experimentales; control, IM, IM + Captopril e IM + LQM319, donde se buscó el efecto que produce el compuesto LQM319 sobre la síntesis de proteínas y sobre la expresión génica de NF- $\kappa$ B/p65 en cada grupo. En los últimos tres grupos con oclusión de la arteria coronaria durante 48 h se trabajó con áreas sin infarto y con infarto del ventrículo izquierdo a estos últimos grupos se les realizó la medición del área de infarto como se muestra; en la **gráfica 1**, el único grupo que presenta disminución del área de infarto fue el que se trató con el compuesto LQM319 con respecto a los otros dos grupos. En el 2003, Frantz y colaboradores reportan que entre más grande es el área de infarto, menor es la activación o expresión del NF- $\kappa$ B/p65 y viceversa entre menor sea el área de infarto mayor es la activación o expresión del factor.

Para poder ver el efecto del LQM319 como tratamiento en el IAM se comparó con el Captopril, fármaco que pertenece a la familia de los iECA, los cuales se han convertido en un elemento fundamental del tratamiento de pacientes con IAM, puesto que previenen el remodelado ventricular izquierdo. Además, los iECA tienen un papel cada vez mayor en el tratamiento de los distintos síndromes coronarios, puesto que al parecer previenen la progresión de las lesiones vasculares. Los iECA previenen la progresión de la arterioesclerosis y disminuyen la incidencia de infarto al miocardio. Estos fármacos tienen efectos antiproliferativos y antimigratorios sobre las células musculares lisas, los neutrófilos y las células mononucleares, favorecen la fibrinólisis endógena y mejoran la disfunción endotelial.

Desde el punto de vista clínico, la reducción en la tasa de IAM se observó inicialmente con Captopril en el estudio SAVE (Survival and Ventricular Enlargement) y recientemente en el estudio de HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) (Llevadot, 2004). En comparación con estos estudios se puede apreciar finalmente que el compuesto LQM319 presenta mejor efecto en la disminución del área de infarto con respecto a Captopril, que fue el fármaco control.



Una vez obtenidos los tejidos de cada grupo experimental, en los grupos con IM y los de IM + tratamiento, se obtuvieron las áreas sin y con infarto para poder realizar la técnica de ELISA y de esta manera determinar la síntesis de la proteína de NF- $\kappa$ B/p65. Para esto, primero se realizó una curva estándar como se ve en la **gráfica 2** la cual nos ayuda a verificar la cantidad de síntesis de la proteína p65; en la técnica de ELISA se trabajó con fracciones citoplasmáticas y fracciones nucleares de cada una de las áreas, en la cual se observa la síntesis de la proteína en las dos fracciones y se puede apreciar en donde hay mayor o menor expresión de NF- $\kappa$ B/p65. Keith y col. en 2005 reportaron que el NF- $\kappa$ B puede regular la expresión de su propio gen p65 tras su unión en sitios promotores en el ADN ya sean activados o reprimidos después de I/R o que participan en los procesos fisiopatológicos relacionados con I/R y PC o protección cardiovascular.

En la **gráfica 3** de la técnica de ELISA de las áreas sin infarto miocárdico de los grupos de trabajo, se puede apreciar que no hay diferencia significativa entre las fracciones citoplasmáticas en la cantidad de síntesis de proteínas p65; mientras que sí se presenta diferencia entre la fracción citoplasmática con respecto a la fracción nuclear, así como entre los grupos con IM y los de IM con tratamientos con respecto al grupo control que no presenta infarto, también se observa una diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto al grupo con IM sin tratamiento estos dos últimos casos corresponden a la fracción nuclear, se aprecia que no hay diferencia significativa entre el grupo tratado con Captopril o el compuesto LQM319.

En la **gráfica 4**, de las regiones con áreas de infarto miocárdico, se puede observar que sí hay diferencia significativa entre las fracciones citoplasmáticas con respecto a las fracciones nucleares en cada grupo. En la síntesis de la proteína p65 también hay diferencia entre el grupo IM tratado con Captopril con respecto al IM en la fracción citoplasmática. En las fracciones nucleares se muestran diferencias significativas entre los grupos IM + Captopril, IM + LQM319 con respecto al grupo con IM, así como en los grupos de IM + LQM319 con respecto al grupo IM + Captopril. Se puede apreciar también entre la **gráfica 3 y gráfica 4** mayor cantidad de proteína p65 en las fracciones nucleares en las áreas sin infarto miocárdico con respecto a las áreas con infarto miocárdico, mientras que en la fracción citoplasmática en ambas regiones la cantidad de proteína p65 fue muy similar, pudiéndose apreciar un poco mayor en las áreas con infarto miocárdico.

En la **figura 29** se puede observar la integridad de cada uno de los RNAs de los diferentes grupos experimentales, al obtener RNAs integros se realizó la técnica de



RT-PCR; en la **figura 30** se aprecia el gel de agarosa al 2% con el ADN de cada uno de los grupos experimentales, así como de las dos diferentes áreas de trabajo, en donde se puede ver que sí hay cambio en la expresión del mRNA del GAPDH o del gen de interés p65, observando que los datos muestran que los niveles de mRNA de GAPDH un gen constitutivo de las células que es habitualmente utilizada como control, no se modificó significativamente al igual que en los niveles de expresión génica del NF- $\kappa$ B/p65 en los diferentes grupos así como en las áreas sin o con infarto; tampoco se muestran cambios entre los niveles de expresión del mRNA del GAPDH con respecto a los niveles de p65, esto se corrobora con la **gráfica 5a y 5b**, en donde se logra apreciar que finalmente no hay diferencia significativa en la expresión del mRNA del GAPDH y p65 entre cada uno de los grupos en las áreas sin infarto miocárdico así como en las áreas con infarto miocárdico, pudiéndose apreciar una mayor expresión de mRNA en las áreas sin infarto con respecto a las áreas con infarto y en ambos casos se puede observar que las ratas tratadas con Captopril presentan tendencia a tener una mayor expresión con respecto a los otros grupos, mientras que las tratadas con LQM319 no muestran ningún cambio con respecto a las de IM.

En cada grupo experimental, como se muestra en la **gráfica 3 y gráfica 4**, se presenta mayor cantidad de proteína p65 a nivel nuclear con respecto al citoplasmático; esto puede indicar que se está llevando a cabo la activación del NF- $\kappa$ B, ya que en el citoplasma se encuentra como complejo inactivo I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B (p50/p65) y mediante los estímulos producidos se podría estar llevando a cabo la fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$  mediante la acción del complejo IKK, lo que permite que el heterodímero p50-p65 se active y se transloque al núcleo, encontrándose así mayor cantidad en el núcleo con respecto al citoplasma. Frantz y col. en experimentos con corazones de rata y humanos con alteraciones del ventrículo izquierdo del miocardio que ha sufrido una remodelación por infarto, el NF- $\kappa$ B está activado. Estos hallazgos son importantes porque involucran rutas de activación del NF- $\kappa$ B *in vivo* durante los procesos de remodelación cardíaca. De igual manera, Misra y colaboradores demuestran que el NF- $\kappa$ B se encuentra activado en la I/R al igual que en el preconditionamiento isquémico (PC) y dependiendo del estímulo que reciba el corazón ya sea intenso o moderado, serán los tipos de genes que se expresen. En el primer caso consideran que son estímulos intensos por lo que se está provocando daño al miocardio mediante la expresión de genes pro-apoptóticos





(Fas, FasL, Bax) o pro-inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) y en el PC donde el estímulo es moderado el NF- $\kappa$ B funciona como cardioprotector donde expresa genes anti-apoptóticos (Bcl-XL, Bcl2, IAP1/2). Keith y colaboradores reportan otros genes de cardioprotección (A20, RelB, c-rel, JunB, NF- $\kappa$ B1/2), así como los genes relacionados con NF- $\kappa$ B como p65 y p50. En estos últimos casos se acercan a las condiciones con las que se está trabajando con cada uno de los grupos de trabajo por lo que se podría suponer que se están expresando genes de cardioprotección. En los grupos control y el grupo con IM, tanto las áreas sin infarto y con infarto (**gráfica 3 y gráfica 4**), a nivel citoplasmático y nuclear, se puede ver que hay presencia de cantidades de p65, por lo que se piensa entonces que la activación del NF- $\kappa$ B/p65 se podría estar llevando a cabo mediante el SRA, en especial por la Ang II mediante los receptores AT<sub>1</sub> o AT<sub>2</sub> como se puede ver en la **figura 31**. Ruiz en el 2000 y Gunter en el 2002 y col. indican que la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  se asocia con la activación del NF- $\kappa$ B y sugieren fuertemente que la Ang II induce la fosforilación y ubiquitinación de esta proteína inhibidora mediante la activación del complejo IKK. Estudios anteriores *in vivo* en ratas con infusión de Ang II, así como investigaciones en cultivo celular con VSMC utilizando antagonistas específicos, han proporcionado pruebas de que la Ang II activa al NF- $\kappa$ B a través de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Sin embargo, basándose solamente en los antagonistas del receptor puede ser problemático debido a que estos agentes no son totalmente específicos. Por tanto, se cree que el enfoque actual con la reconstitución selectiva de receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> proporciona evidencia convincente de que la Ang II en efecto puede activar el factor NF- $\kappa$ B/p65 a través de ambos tipos de receptores (Gunter, 2002). En otros estudios realizados por Ruiz-Ortega y col. en el 2000 se encontraron pruebas adicionales en las CMLV con deficiencia del receptor AT<sub>1</sub> obtenido de ratones en donde se observó que Ang II activa al NF- $\kappa$ B/p65 en las células que expresan uno sólo de los receptores AT<sub>2</sub>. Finalmente Gunter, Ruiz y colaboradores indican que los resultados muestran que en CMLV de rata en cultivo, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> mediado por Ang II inducen la activación de NF- $\kappa$ B/p65. Los dos receptores comparten algunas señales intracelulares en la Ang II/NF- $\kappa$ B, tales como producción de ROS y ceramida. Estos mecanismos de señalización son similares a los utilizados por las citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , proporcionando un punto de "conversación cruzada" entre Ang II activados por citocinas o por las vías de segundos mensajeros y apoyando la idea emergente de la Ang II como una citocina



verdadera. La Ang II media la transcripción de genes principalmente a través de  $AT_1$ , también la Ang II induce la sobreexpresión de genes relacionados, tales como el angiotensinógeno, quimiocinas (MCP-1), citocinas y moléculas de adhesión que participan en el desarrollo de la aterosclerosis.

En los grupos con IM + Captopril e IM + LQM319, **Gráfica 3 y Gráfica 4** se muestra la presencia de p65 a nivel nuclear y citoplasmático, en donde el Captopril y el compuesto LQM319 pueden estar actuando inhibiendo la ECA, lo que inactiva la conversión de Ang I a Ang II por lo que el mecanismo por el cual pudo activarse el NF- $\kappa$ B en los grupos control e IM es diferente en estos otros dos grupos, ya que al haber menor cantidad de Ang II la unión a sus receptores  $AT_1$  o  $AT_2$  y la activación del NF- $\kappa$ B/p65 es menor o nula. Sin embargo, los inhibidores de la ECA también previenen la descomposición de la bradicinina, entonces se propone que el compuesto LQM319 al igual que el Captopril inhiben a la ECA como se muestra en la **figura 31**, no permitiendo así la degradación de la Bradicinina, proteína conocida como activadora de NF- $\kappa$ B, al mantenerse la bradicinina en circulación se puede explicar el aumento de la activación de NF- $\kappa$ B por inhibición de la ECA, según lo reportado por Frantz y colaboradores. De igual manera Bing-Chang, 2004, Zhixing, 1996, Shimizu, 1998 y col. reportan que la Bradicinina actúa a través de su receptor B2 y de esta manera activa la vía Ras/RAF/ERK, que a su vez aumenta la actividad del complejo IKK $\alpha\beta$  que provoca la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  y de esta manera se lleva a cabo la activación de NF- $\kappa$ B/p65 que finalmente induce la expresión de genes, es posiblemente el efecto que estén llevando a cabo el compuesto LQM319 y el Captopril y de esta manera se esté activando el NF- $\kappa$ B. En la **figura 31** se pueden ver las posibles vías de activación de NF- $\kappa$ B/p65. Con estudio al igual que con lo reportado por Yoshiyama y col. en el 2001 se proporcionan pruebas de que NF- $\kappa$ B se encuentra activado en las regiones infartadas y no infartadas del ventrículo izquierdo después del infarto miocárdico. Cabe hacer mención que hay mayor cantidad de proteínas de NF- $\kappa$ B/p65 en las áreas sin infarto, esto nos lleva a sugerir que el Captopril y el compuesto LMQ319 pudieran estar funcionando como cardioprotectores principalmente en esta área, evitando que haya mayor aumento del área infartada; también se puede observar que el Captopril presenta mayor efecto en esta zona, pero en el área con infarto se muestra que el compuesto LQM319 pudiera estar presentando una mayor actividad cardioprotectora por haber mayor cantidad de proteínas p65 con respecto al Captopril, esto se correlaciona con



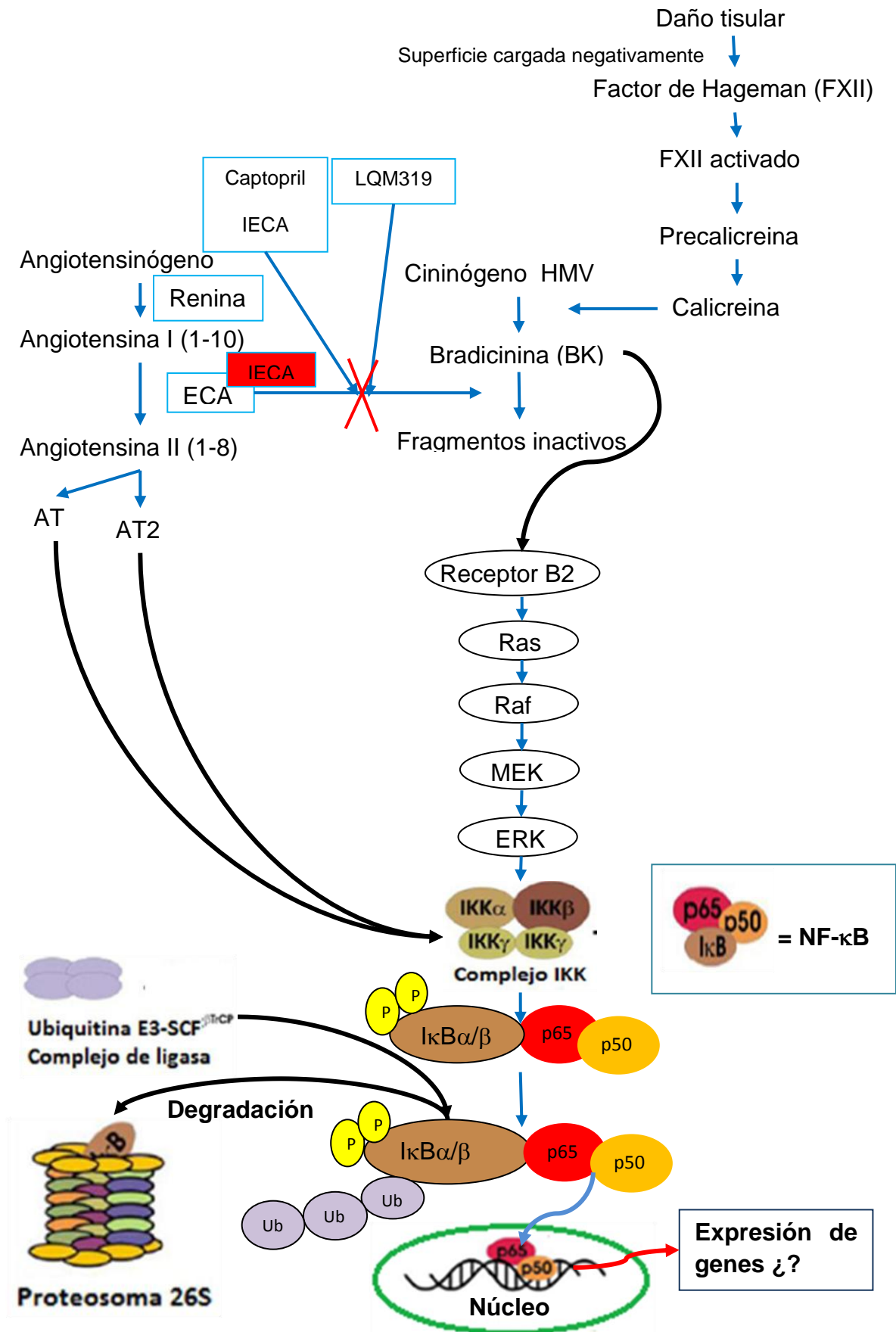
la **gráfica 1** en donde se muestra que el LQM319 tiene mayor disminución del área infartada. Una vez más, los efectos cardioprotectores de NF- $\kappa$ B pueden tener un gran impacto en el beneficio del tratamiento. Sin embargo, la inhibición de la ECA se asocia significativamente con el aumento de NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, utilizando el modelo de IM similar al de este proyecto, donde se usaron inhibidores de la ECA se apoya más la hipótesis de un papel protector del NF- $\kappa$ B/p65 (Frantz, 2003).

En la **figura 30** y la **gráfica 5a** y **gráfica 5b**, no se presentan diferencias en la expresión de mRNA de p65 entre los grupos, esto puede deberse a que el compuesto LQM319 y el Captopril no estén actuando a nivel transcripcional del mRNA, entonces no hay modificación en la cantidad de expresión del mRNA y estos se estén expresando de manera similar en cada grupo y zonas con o sin infarto, pero que el compuesto LQM319 al igual que el Captopril si estén actuando a nivel de la traducción del mRNA, por lo que sólo se muestran cambios en la cantidad de proteínas lo cual se aprecia en la **gráfica 3** y **gráfica 4**. Cabe hacer mención que nosotros solo estamos haciendo una cuantificación total de NF- $\kappa$ B/p65 y no se está verificando si las proteínas son activas o inactivas o bien, a qué nivel de la traducción estén actuando el compuesto LQM319 o el Captopril, para esto se podrían utilizar inhibidores o bien potencializadores del NF- $\kappa$ B conocidos a este nivel.

Finalmente es importante hacer mención de los mecanismos propuestos que pudieran estar llevando a cabo la activación del NF- $\kappa$ B/p65 en el IAM después de 48 h de oclusión en las ratas Wistar. En la **Figura 31**, se propone que el NF- $\kappa$ B/p65 se está activando por dos vías, la primera plantea que se encuentra involucrado el SRA, este sistema se inicia con la conversión del angiotensinógeno por la renina a angiotensina I (Ang 1-10) posteriormente éste se convierte a angiotensina II (Ang 1-8) por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), esta última tiene la capacidad de unirse a los receptores AT<sub>1</sub> o AT<sub>2</sub> en circunstancias diferentes, esa unión puede permitir llevar a cabo la activación del complejo IKK $\alpha/\beta$  lo que permite llevar a cabo la fosforilación y una posterior ubiquitinación del I $\kappa$ B $\alpha$  para que posteriormente sea degradado por el proteosoma y permita la activación de NF- $\kappa$ B/p65 la cual se transloca al núcleo y permita la expresión de genes ya sea de cardioprotección o de daño. En el segundo mecanismo propuesto se involucran dos vías, la primera en la que participan los tratamientos utilizados el compuesto, LQM319 y el Captopril; el compuesto LQM319 en estudios anteriores ha demostrado



que presenta efectos similares a los obtenidos por el Captopril un iECA, por lo que se sugiere que al ser administrados a nuestro modelo experimental ambos funcionan como un iECA, inhibiendo la actividad de la ECA la cual convierte la Ang I a Ang II y en condiciones normales también degrada a la Bradicinina en fragmentos inactivos; la Bradicinina es un potente activador de NF- $\kappa$ B, la ECA al estar inhibida por los tratamientos, no lleva a cabo la degradación de Bradicinina lo que permite su aumento en el tejido y circulación. Cabe mencionar que la Bradicinina para producirse inicia primero por un daño tisular en donde la superficie se carga negativamente y se inicia la activación del sistema de coagulación, primero con el Factor de Hageman (FXII,) una vez activado el Factor XII, este actúa sobre la Precalicroina proteína plasmática precursora de la Calicroina la cual es proteasa serina que libera cininas (Bradicinina BQ y calidina CD) actuando sobre los cininógenos de elevado peso molecular (HMV), al encontrarse un aumento de Bradicinina permite su unión a los receptores B2 esto permite, que se lleve a cabo la activación de la vía de señalización de las cinasas Ras/Raf/MEK/ERK lo que produce la activación del complejo IKK $\alpha/\beta$  la cual lleva a cabo la fosforilación y una posterior ubiquitinación del I $\kappa$ B $\alpha$  para ser degradada posteriormente por el proteosoma, lo que permite la activación del NF- $\kappa$ B la cual se transloca al núcleo y permite la expresión de genes de cardioprotección o daño de acuerdo al estímulo que reciba ya sea moderado o intenso, pero para ver qué tipo de genes se están expresando es necesario realizar técnicas moleculares, como la técnica de RT-PCR para poder identificar qué tipo de gen se está expresando en el IAM después de 48 h de oclusión en las ratas Wistar.



**Figura 31.** Esquema general hipotético de cómo el compuesto LQM319 y el Captopril podrían estar llevando a cabo la activación del NF-κB/p65. (Ruiz, 2000, Gunter, 2002, Bing-Chang, 2004, Zhixing, 1996, Shimizu, 1998).



## 9.- CONCLUSIONES

- 9.1** Se logró determinar el porcentaje de área de infarto de los diferentes grupos, obteniendo una mayor disminución del área en los animales tratados con el compuesto LQM319 con respecto al Captopril, sugiriendo así su efecto cardioprotector en el IAM después de 48 h de oclusión.
- 9.2** Se logró estimar la síntesis de la proteína NF- $\kappa$ B/p65 en los diferentes grupos de trabajo, logrando ver que el efecto del compuesto Tiomorfolínico LQM319 es mayor en las áreas con infarto miocárdico con respecto al Captopril, pudiendo brindar así un efecto cardioprotector en el IAM.
- 9.3** Se logró determinar la expresión del mRNA de NF- $\kappa$ B/p65, no encontrando diferencia entre los grupos experimentales y áreas de interés del ventrículo izquierdo en el IAM.
- 9.4** Con los resultados obtenidos, se plantearon dos mecanismos por los cuales se pudo llevar a cabo la activación del NF- $\kappa$ B/p65. El primero sugiere que NF- $\kappa$ B/p65 se está activando por la Ang II mediante su unión a los receptores AT<sub>1</sub> o AT<sub>2</sub>. El segundo mecanismo plantea que el compuesto LQM319 podría estar inhibiendo a la ECA y de esta manera no se esté degradando la Bradicinina permitiendo la activación de NF- $\kappa$ B/p65.
- 9.5** Con los resultados de ambas técnicas moleculares utilizadas, se sugiere que el compuesto LQM319 podría estar actuando solamente a nivel de la síntesis de proteínas (traducción) pero no así a nivel de la transcripción del mRNA.
- 9.6** Finalmente y de manera general con los resultados obtenidos se puede concluir que el NF- $\kappa$ B pudiera estar funcionando como un agente cardioprotector en la fase aguda del infarto miocárdico por el tratamiento con el compuesto tiomorfolínico [4-tert-butil-2,6-bis (tiomorfolin-4-ilmetil) fenol] (LQM319).



## 10.- PERSPECTIVAS

En los próximos años sin lugar a dudas, o bien la tarea más fuerte, será entender los procesos celulares de las interacciones que ocurren en una misma área cardíaca entre células del músculo liso, endoteliales, fibroblastos y cardiomiocitos, en donde la comunicación por señales paracrinas es fundamental. Quizá esto podría ayudarnos a entender por qué a veces el NF- $\kappa$ B activa genes anti-apoptóticos y pro-apoptóticos y en otras ocasiones promueve la expresión de genes pro-inflamatorios o anti-inflamatorios, o la correlación que existe entre la alta actividad del NF- $\kappa$ B y la arteriosclerosis y el progreso de la enfermedad.

En la actualidad es importante llevar a cabo más estudios relacionados con el NF- $\kappa$ B en el IAM, ya que las vías de señalizaciones o los estímulos involucrados en la activación del factor son abundantes, entonces se podrían llevar a cabo estudios con técnicas moleculares utilizadas ya en este proyecto o bien incluir otras técnicas que permitan ver qué tipo de genes se estén expresando, ya sean de daño al corazón pro-apoptóticos (Fas, FasL, Bax) o pro-inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ), o bien genes de protección, anti-apoptóticos (Bcl-XL, Bcl2, IAP1/2) u otros genes de cardioprotección (A20, RelB, c-rel, JunB, NF- $\kappa$ B1/2) y de esta manera enriquecer los resultados obtenidos en el presente proyecto y ayudar a demostrar si NF- $\kappa$ B está jugando el papel cardioprotector o no en el IAM después de 48 h de oclusión. Es importante realizar estudios en donde se permita la inhibición o bien se potencie (agonistas) la actividad de alguna de las moléculas involucradas en la vía de señalización propuesta en los mecanismos de activación de la **Figura 31** y esta manera se pueda ver a qué nivel está llevando a cabo su acción el compuesto LQM319. Además se confirmarían los mecanismos de activación propuestos. Se sugiere realizar la medición de la actividad de las proteínas NF- $\kappa$ B/p65 para ver si están activas o inactivas (presenten actividad o no) esto podría realizarse mediante la técnica de Western blot y así se apoyaría la hipótesis planteada. Cada uno de los estudios que puedan realizarse en un futuro ayudarían a entender la participación del NF- $\kappa$ B/p65 en el IAM después de 48 de oclusión y la acción que el compuesto LQM319 esté realizando a este nivel y en un futuro proponer si el compuesto LQM319 (de origen mexicano) pueda funcionar como fármaco en el tratamiento del IAM.



## 11.- REFERENCIAS

1. Aguilar Benavides Jorge, Rosario D. Garabito Lizeca (2008) "INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO" Rev Paceaña Med Fam, 5(8): 102-114.
2. Alexánderson Erick, Arias Alexandra (2006) Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST, Archivos de cardiología de México, Vol. 76 Supl. 3/Julio-Septiembre,S3, 12-120.
3. Bing-Chang Chen, Chung-Chi Yu, Hui-Chieh Lei (2004) Bradykinin B2 Receptor Mediates NF-kB Activation and Cyclooxygenase-2 Expression via the Ras/Raf-1/ERK Pathway in Human Airway Epithelial Cells, *J Immunol*; 173:5219-5228.
4. Castillo García Patricia Tamara (2008) "Determinación del Efecto de 6 compuestos morfolínicos (LQM-308,LQM-309, LQM-310, LQM-312, LQM-313 y LQM-314) y 6 compuestos tiomoforlínicos (LQM-318, LQM-319, LQM-320, LQM-321, LQM-324 y LQM-332) sobre la contracción de la aurícula derecha de rata Wistar Macho joven" Cuautitlán, Izcalli, Edo. De México.
5. Dalager-Pederson S, Pederson EM, Ringgaard S, Falk E (1999) Arteriopatía Coronaria: vulnerabilidad de la placa, rotura y trombosis. En: FUSTER V ed: La placa de ateroma vulnerable. Serie Monográfica de la American Heart Association. Barcelona, Medical Trends, SL.
6. David M. Rothwarf, Michael Karin (1999) "The NF-kB Activation Pathway: A Paradigm in Information Transfer from Membrane to Nucleus" *Sci. STKE* (5), re1. [DOI: 10.1126.
7. Duran Hortola Marius (2008) "Farmacología para fisioterapeutas" Médica Panamericana, Madrid, España, Pp. 107-108.
8. Fagan, Sunthareswaran (2004) "Lo esencial en Sistema Cardiovascular", 2ª edición, ELSEVIER, Madrid, España, Pp. 90.
9. Fishbein, M.C.mM.D., Macean, D.M.B. (1978). Experimental myocardial infarction in the rat. *Am. J. Pathology*: 90:1: 57-65.
10. Frantz Stefan, Daniela Fraccarollo, Helga Wagner, Thomas M. Behr (2003) Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure, *Cardiovascular Research* 57, 749–756.
11. Fuentes Arderiu, J.M. Queraltó Compañó (1998) "Bioquímica clínica y Patalogía molecular" 2ª edición, REVERTE, Barcelona, España, Pp827





12. Fyhrquist F. & O. Saijonmaa (2008) Renin-angiotensin system, *Journal of Internal Medicine*, 264; 224–236.
13. Gentzon Hall, Jeffery D. Hasday (2006) Terry B. Rogers Regulating the regulator: NF- $\kappa$ B signaling in heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41, 580–591.
14. Gunter Wolf, Ulrich Wenzel, Kevin D. Burns (2002) “Angiotensin II activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B through AT1 and AT2 receptors” *Kidney International*, Vol. 61, pp. 1986–1995.
15. Hernández Gutiérrez Salomón, Manuel Ramos Kuri, Emilio Rojas del Castillo (2008) Cardiac Role of the Transcription Factor NF- $\kappa$ B, *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 8, 153-160.
16. Kaski Juan C (2000) “Inflamación, infección y enfermedad coronaria: mitos y realidades. Conferencia Especial del XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cardiología” *Rev. Esp. Cardiol*, 53: 1311-1317.
17. Keith Jones, Maria Brown, Michael Wilhide, Suiwen (2005) He NF- $\kappa$ B in Cardiovascular Disease Diverse and Specific Effects of a “General” Transcription Factor? *Cardiovascular Toxicology*, 05 183–20.
18. Keith Jones, Maria Brown, Ren Xiaoping (2003) NF- $\kappa$ B as an Integrator of Diverse Signaling Pathways: The Heart of Myocardial Signaling? *Cardiovascular Toxicology*, 03 229-253.
19. Kim Van Der Heiden, Simon Cuhlmann, Le A. Luong, Mustafa Zakkar (2010) Role of nuclear factor  $\kappa$ B in cardiovascular health and disease, *Clinical Science*, 118, 593–605.
20. Kumar Vinay, K. Abbas Abul, C. Aster Jon (2007) “Basic Pathology” 9ª edición, ELSEVIER, Canadá, Pp.339.
21. L. Martín Jadraque, I. Coma Canella (1988) *Cardiopatía Isquémica: Angina de pecho, Infarto de miocardio*, 2ª edición, NORMA, Madrid, España, Pp. 163.
22. Latanich Christopher A., Luis H. Toledo-Pereyra (2009) Searching for NF- $\kappa$ B-Based Treatments of Ischemia Reperfusion Injury *Journal of Investigative Surgery*, 22, 301–315.
23. Libby P, Theroux P. (2005) Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*, 111: 3481-3488.
24. Llevadot González Joan (2004 ) “Síndrome Coronarios Agudos” ELSEVIER, Madrid, España, Pp. 241



25. López Farré Antonio y Carlos Macaya Miguel (2009) “Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos” Fundación BBVA, Madrid, España, Pp. 259-266.
26. M. Serrano, S. Morte, V. Álvarez, P. Zugarramurdi, M. Palacios (2001) El proceso inflamatorio de la enfermedad cardiovascular: nuevos Marcadores The inflammatory process of cardiovascular disease: new markers ANALES Sis San Navarra, Vol. 24, N° 3, septiembre-diciembre.
27. Mena García Yanerit, Sánchez, Dorantes Alejandra (2010) “Determinación del Efecto vasodilatador de los compuestos morfolínicos (LQM-301, LQM-302, LQM-304, LQM-308, LQM-309, LQM-310, LQM312, LQM 341 y LQM353) y tiomoforlínicos (LQM-319, LQM-322, LQM-324, LQM-328, LQM-337 y LQM-343) y piperidínicos (LQM345) en aorta de rata hipertensa espontánea” Tesis de Licenciatura FESC- UNAM, Cuautitlán, Izcalli, Edo. De México.
28. Méndez Sarmiento Claudia, H. C. Mila Carlos (2002) “Patología Humana Básica: aplicada a rehabilitación” Centro Universidad Del Rosario, Bogotá, Colombia, Pp132-132.
29. Ming-Xian Yan, Hong-Bo Ren, Yi Kou, Min Meng, Involvement of Nuclear (2012) Factor Kappa B in High-Fat Diet-Related Pancreatic Fibrosis in Rats, Gut and Liver, Vol. 6, No. 3, 381-387.
30. Misra A, Haudek SB, Knuefermann P, Vallejo JG, Chen ZJ, Michael LH, Sivasubramanian N, Olson EN, Entman ML, and Mann DL. Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation* 108: 3075–3078, 2003.
31. Morales Olivas F.J. y L. Estan Yago (2010) Conceptos nuevos sobre el sistema renina angiotensina Hipertens riesgo vasc, 27(5):211–217.
32. Orozco Cortés Nancy V. (2012) “Efecto del Compuesto LQM319 sobre la contracción muscular producida por angiotensina I y angiotensina II en presencia de angiotensina-(1-7) en aorta de rata hipertensa espontánea” Tesis de Maestría IPN-ESM-UNAM, Cuautitlán, Izcalli, Edo. De México.
33. P. Porela, H. Helenius, K. Pulkki and L.-M. Voipio-Pulkki (1999) Epidemiological classification of acute myocardial infarction: time for a change? *European Heart Journal*, 20, 1459–1464.
34. R. Brasier Allan (2006) The NF-κB Regulatory Network Cardiovascular Toxicology 06 111–130.



- 35.R. Brasier Allan, Adrian Recinos III and Mohsen S. Eledrisi (2002) Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;22:1257-1266.
- 36.Rocha Espino Yuriana (2008) "Estudio Genotóxico Mediante la Prueba de Micronúcleos del Compuesto Tiomofolínico LQM319" Tesis de Licenciatura FESC-1 UNAM.
- 37.Ruiz-Ortega M., O. Lorenzo, M. Rupérez, V. Esteban (2001) Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases: Expanding the Field, *Hypertension*, 38:1382-1387.
- 38.Ruiz-Ortega Marta, Oscar Lorenzo, Mónica Rupérez, Sven König (2000) "Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor  $\kappa$ B Through AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> in Vascular Smooth Muscle Cells *Circ Res*, 86:1266-1272.
- 39.Santeliz Contra Hermelando, Lorena Romano Estrada (2008) El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial *Rev Mex Cardiol*; 19 (1): 21-29.
- 40.Shimizu Naruhito, Minoru Yoshiyama, Takashi Omura (1998) Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats, *Cardiovascular Research* 38,116–124.
- 41.Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. American Heart Association. *Circulation*; 92: 1355- 1374.
42. T. Padró, C. Mendieta (2005) "Inflamación y arteriosclerosis" *Hipertensión*; 22(4):173-82.
- 43.Tucker Collins<sup>1</sup> and Myron I. Cybulsky (2001) NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?, *The Journal of Clinical Investigation*;107, 3.
- 44.Yoshiyama Minoru, Takashi Omura, Kazuhide Takeuchi, Shokei Kim (2001) Angiotensin Blockade Inhibits Increased JNKs, AP-1 and NF- $\kappa$ B DNA-binding Activities in Myocardial Infarcted Rats, *J Mol Cell Cardiol*, 33, 799–810.
- 45.Zhixing K. Pan, Bruce L. Zuraw, Chien-Cheng Lung Bradykinin Stimulates (1996) NF- $\kappa$ B Activation and Interleukin 1b Gene Expression in Cultured Human Fibroblasts, *J. Clin. Invest*, 98:2042–2049.