

Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Ingeniería en Biotecnología

Análisis del efecto del bórax sobre un modelo murino de hipertrofia cardiaca inducida durante la gestación

Tesis

Para obtener el título de:

Ingeniera en Biotecnología

Presenta:

Mayra Cruz Hernández

Director:

Dr. Adolfo López Torres

Co-director:

Dra. Alejandra Contreras Ramos

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2023.

Copia de Acta de Revisión de Tesis.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

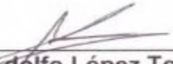
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 27 de enero de 2023 a las 17:00 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Análisis del efecto del bórax sobre un modelo murino de hipertrofia cardíaca inducida durante la gestación" presentado por la alumna **Mayra Cruz Hernández**, con número de matrícula 14090338, de la licenciatura en **Ingeniería en Biotecnología** aspirante al grado de **Licenciatura**.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 27 de enero de 2023.

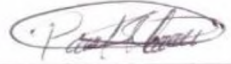
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Adolfo López Torres
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Clara Ortega Camarillo
Instituto Mexicano del Seguro Social
Revisor de Tesis


Dr. Edgar García López
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Enrique Villalobos Amador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Copia de Oficio de Autorización de Tesis.



UNIVERSIDAD DEL PAPAALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 22 de febrero de 2023
Oficio No. JCIB/003/02/2023

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Mayra Cruz Hernández** con título definitivo "**Análisis del efecto del bórax sobre un modelo murino de hipertrofia cardiaca inducida durante la gestación**" para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciada en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar García López (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Clara Ortega Camarillo (Vocal, Instituto Mexicano del Seguro Social)
Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Enrique Villalobos Amador (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú*



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

DEFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



VICE-RECTORIA
ACADEMICA

c.c.p. Dr. Adolfo López Torres. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Mayra Cruz Hernández, Pasante, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P.68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

Hoja de Originalidad.

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Agradecimientos.

Este proyecto fue financiado por fondos internos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo el número de proyecto HIM/2014/045 SSA 1131.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de los siguientes laboratorios:

Laboratorio de investigación en biología molecular en el Centro de Malformaciones del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), Ciudad de México.

La Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional SXXI, IMSS, Ciudad de México.

Y el Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca.

Agradezco a la Dra. Alejandra Contreras Ramos por ser mi guía en el proceso de realización de esta Tesis de Licenciatura.

Agradezco el conocimiento y la experiencia brindada por la Dra. Guadalupe Hernández y la Técnica Lucía Lima en la realización de los experimentos.

Agradezco a la Dra. Clara Ortega Camarillo por recibirme en su espacio de trabajo y por aportarme su valioso conocimiento.

Agradezco al Dr. Adolfo López Torres por las enseñanzas y todo el apoyo en la realización de este proyecto.

Agradezco a mi comité revisor por sus comentarios y sugerencias.

Agradezco al Bioterio del HIMFG por proporcionar a los roedores para la realización de este proyecto de investigación.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico con todo mi corazón a mi madre, Bertha Hernández Gómez, quién me ha enseñado a nunca dejar de persistir y que tarde o temprano se debe terminar lo empezado. Gracias por hacer este sueño posible y por enseñarme el camino hacia la superación.

A mi padre, gracias por hacerme ver la vida desde otra perspectiva, y que podemos cumplir nuestros objetivos sin importar la situación que se nos presente.

A mis hermanos, Moisés e Isaac, gracias por los consejos brindados y por permitirme aprender de la vida juntos.

A mis amigos quienes me han brindado su apoyo y me han compartido sus propias experiencias en sus proyectos, sé que todos podemos cumplir nuestras metas y deseos.

A Dianita, gracias por brindarme tu ayuda y conocimiento al empezar este proyecto.

Por su apoyo incondicional, es a ellos a quienes dedico esta tesis.

Índice

Índice de ilustraciones.....	VI
Índice de figuras.	VII
Índice de tablas.....	VIII
Abreviaturas.	IX
Resumen.....	XI
Abstract.	XII
1 Introducción.	1
2 Marco teórico.	2
2.1 Corazón.....	2
2.2 Enfermedades cardiovasculares.....	2
2.3 Hipertrofia.	3
2.4 Clasificación de la hipertrofia cardiaca.....	3
2.5 Mecanismos moleculares en la hipertrofia cardiaca patológica.....	4
2.6 Modelos animales de enfermedad cardiovascular.	6
2.7 Boro.	6
3 Justificación.	8
4 Hipótesis.	9
5 Objetivos.....	9
5.1 Objetivo general.	9
5.2 Objetivos específicos.	9
6 Diagrama experimental.....	10
7 Materiales y métodos.....	11
7.1 Material biológico.....	11
7.2 Análisis de funcionalidad cardiaca.	11
7.3 Estudio histopatológico de los corazones	12
7.3.1 Análisis morfométrico.	12
7.3.2 Análisis histológico.	12
7.4 Determinación de daño por estrés oxidativo en el ventrículo izquierdo.....	12
7.4.1 Cuantificación de malondialdehído.....	12
7.4.2 Cuantificación de glutatión.....	13
7.4.3 Análisis de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa.....	13

7.5	Expresión de genes de daño cardíaco, genes de respuesta temprana y tardía reguladores de hipertrofia cardíaca.	14
7.5.1	Extracción de ARN.	14
7.5.2	Síntesis de ADNc.	14
7.5.3	RT-qPCR en tiempo real.	14
8	Análisis de resultados.	16
9	Resultados.	17
9.1	Análisis de la cardiotoxicidad del bórax como suplemento durante la gestación.	17
9.1.1	Efecto de la suplementación del bórax durante la gestación sobre la funcionalidad ventricular izquierda.	17
9.1.2	Efecto de la suplementación del bórax durante la etapa fetal sobre la remodelación ventricular.	17
9.1.3	Efecto de la suplementación del bórax durante la etapa fetal sobre el daño celular en el tejido cardíaco.	20
9.1.4	Efecto de la suplementación del bórax sobre la expresión de genes de daño cardíaco	20
9.2	Efecto del bórax administrado a ratones hembras gestantes como tratamiento para mitigar el daño hipertrófico en las crías inducido por isoproterenol durante la gestación.	25
9.2.1	Efecto del bórax sobre la funcionalidad cardíaca.	25
9.2.2	Efecto del bórax sobre la remodelación ventricular.	25
9.2.3	Reorganización de las fibras y daño celular.	28
9.2.4	Efecto del bórax sobre los genes de respuesta temprana, tardía y genes de daño cardíaco reguladores de la hipertrofia cardíaca.	31
10	Discusión.	41
10.1	La suplementación del bórax y su efecto cardiotoxicó indirecto.	41
10.2	Participación del bórax en la mitigación de la respuesta hipertrófica.	42
11	Conclusiones.	45
12	Perspectivas.	46
13	Referencias bibliográficas.	47

Índice de ilustraciones.

Ilustración 1 Vías de señalización implicadas durante la hipertrofia cardiaca.	5
Ilustración 2 Metodología general para la etapa I.	10
Ilustración 3 Metodología para la etapa II.	10
Ilustración 4 Condiciones de amplificación para PCR en Tiempo Real.	15

Índice de figuras.

Figura 1 Electrocardiograma de ratones de 6 semanas de edad suplementados con bórax durante la gestación.	18
Figura 2 Análisis morfométrico de los corazones de ratón de 6 semanas de edad suplementados con bórax durante la etapa gestacional.	19
Figura 3 Histología cardiaca de ratones de 6 semanas suplementados con diferentes concentraciones de bórax durante la etapa fetal.	21
Figura 4 Expresión de marcadores de daño cardiaco en ratones de 6 semanas de edad que fueron suplementados con bórax durante la etapa fetal.	22
Figura 5 El tratamiento con bórax tiende a mejorar la funcionalidad cardiaca en ratones que recibieron el estímulo hipertrófico en la etapa embrionaria.....	26
Figura 6 El tratamiento con bórax durante la etapa fetal en ratones que recibieron el estímulo hipertrófico incrementa el tamaño del corazón.	27
Figura 7 El tratamiento a fetos de ratón con diferentes concentraciones de bórax tiende a mitigar el desarrollo de fibrosis intersticial ocasionado por el estímulo hipertrófico.	29
Figura 8 Parámetros de estrés oxidativo de individuos hipertróficos tratados con bórax durante la etapa fetal.....	30
Figura 9 Expresión de genes de respuesta temprana involucrados con el desarrollo de la hipertrofia cardiaca ventricular izquierda en ratones hipertróficos de 6 semanas de edad que fueron tratados con bórax durante la etapa fetal.....	32
Figura 10 Expresión de genes de respuesta tardía determinados en el corazón de ratones hipertróficos de 6 semanas de edad que fueron tratados con bórax durante la etapa fetal.....	33
Figura 11 Expresión de marcadores de daño cardiaco en ratones hipertróficos de 6 semanas de edad que fueron tratados con bórax durante la etapa fetal.....	34

Índice de tablas.

Tabla 1. Reactivos y volúmenes utilizados en las reacciones para la cuantificación de glutatión.....	13
Tabla 2. Reactivos y volúmenes utilizados para la determinación de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa.....	14
Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para PCR en tiempo real	15
Tabla 4. Asociación entre funcionalidad cardiaca con las variables estructurales para los grupos de ratones suplementados con bórax.....	23
Tabla 5. Correlación entre funcionalidad cardiaca y las variables estructurales con la expresión de marcadores de daño en las crías suplementadas con bórax durante la gestación.	24
Tabla 6. Determinación de la relación entre las variables en los ratones hipertróficos tratados con bórax en concentración de 6.4 mg/kg.	35
Tabla 7. Asociación entre las variables analizadas en los ratones hipertróficos tratados con bórax en concentración de 12 mg/kg.....	37
Tabla 8. Relación entre las variables analizadas en los ratones hipertróficos tratados con bórax en concentración de 100 mg/kg.....	39

Abreviaturas.

Abreviatura	Significado
AA	Acrilamida
Ang II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético auricular
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHT	Hidroxitolueno butilado
BNP	Péptido natriurético tipo B
BX	Bórax
Ca ²⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
CaN	Calcineurina
CAT	Catalasa
CTR	Grupo Control
DAG	Diacilglicerol
dpc	Días post-coito
ECG	Electrocardiograma
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ERO	Especies reactivas de Oxígeno
ET-1	Endotelina
FBR	Fibrinógeno
FC	Frecuencia cardiaca
GPCR	Receptores acoplados a la proteína G
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutation
HA	Hipertensión arterial
HC	Grupo hipertrófico
H-E	Hematoxilina y eosina
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda

IC	Insuficiencia cardiaca
IP3	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
ISO	Isoproterenol
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehído
Mg ²⁺	Magnesio
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONS3	Óxido nítrico sintasa desacoplado tipo 3
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PLC	Fosfolipasa C
PLVI	Pared libre del ventrículo izquierdo
RE	Retículo endoplásmico
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TC	Trasplante cardiaco
TIV	Tabique interventricular
VI	Ventrículo izquierdo

Resumen.

La HVI es una respuesta adaptativa a estímulos mecánicos, humorales y estrés oxidativo. Caracterizada por el engrosamiento de la PLVI, del TIV, con reducción o no de la LVI y aumento progresivo de fibrosis intersticial, con potencial riesgo de muerte súbita. Hasta el momento los tratamientos disponibles no revierten el daño celular, por lo que la mejor opción es el trasplante cardíaco. Se ha informado que los compuestos del boro como el ácido bórico y el BX reducen el estrés oxidativo del proceso patológico en modelos murinos, por lo que estos han despertado el interés en el campo biomédico. El objetivo de este estudio fue explorar si el BX, administrado por vía oral durante la gestación en concentraciones de 6.4, 12 y 100 mg/kg de peso corporal durante 5 días, mitiga la HVI inducida durante la etapa embrionaria mediante inyecciones intraperitoneales durante 7 días con ISO, en concentración de 50 ng/Kg de peso corporal. En la primera etapa se evaluó el efecto cardiotoxico de la suplementación del BX en ratones gestantes para visualizar el efecto sobre las crías sanas. Posteriormente, en la etapa II se evaluó la eficacia de Bx, administrado durante la gestación para mitigar la HVI de las crías. Los efectos de la administración del BX a nivel funcional del ventrículo izquierdo se evaluaron mediante ECG, remodelación del ventrículo izquierdo, área del espacio intersticial, cuantificación de MDA, GSH y actividad de GPx, expresión de ARNm de genes de daño cardíaco (ANP y BNP) y de respuesta temprana (c-jun, c-fos y c-myc) y tardía (Mef2c, GATA-4 y NFAT). Los resultados muestran que la suplementación con BX durante la gestación no altera la funcionalidad cardíaca, a pesar que las concentraciones 6.4 y 100 mg/kg inducen niveles altos de expresión de BNP y ANP que indican el daño cardíaco, pero solo la concentración de 6.4 mg/kg presenta remodelación del ventrículo izquierdo. Por lo que respecta a la administración de 12 mg/Kg de BX, esta incrementa el tamaño total del corazón, pero no induce fibrosis intersticial presentando niveles basales de los marcadores de daño cardíaco. En la etapa II, Cuando el BX se empleó como tratamiento para mitigar la HVI. Hallamos que las tres concentraciones administradas durante la gestación, reducen el estrés oxidativo como lo indica la reducción de MDA, el incremento de GSH y de GPx, pero no inhibe la remodelación, ni disminuye el daño celular. Además, se mantiene activa la vía de Calcineurina/NFAT que aumenta la expresión de ARNm de ANP y BNP característicos del daño cardíaco. Estos resultados contribuyen a la comprensión del mecanismo de acción del BX en el corazón. Dada la complejidad del mecanismo de acción que se activan en la HVI. consideramos necesario desarrollar más estudios donde se evalúen otros compuestos de boratos entre ellos los fructoboratos.

Palabras clave: Hipertrofia cardíaca, bórax, estrés oxidativo, biomarcadores hipertróficos.

Abstract.

LVH is an adaptive response to mechanical and humoral stimuli and oxidative stress. Characterized by thickening of the LVLP, of the IVT, with or without reduction of the left ventricular lumen and progressive increase in interstitial fibrosis, with potential risk of sudden death. Until now, the available treatments do not reverse cell damage, so the best option is heart transplantation. Boron compounds such as boric acid and BX have been reported to reduce the oxidative stress of pathological process in murine models, which is why they have aroused interest in the biomedical field. The aim of this study was to explore whether BX, administered orally during pregnancy at concentrations of 6.4, 12, and 100 mg/kg of body weight for 5 days, mitigates LVH induced during the embryonic stage by intraperitoneal injections for 7 days with ISO, at a concentration of 50 ng/Kg of body weight. In the first stage, cardiotoxic effect of BX supplementation in pregnant mice was evaluated to visualize the effect on healthy offspring. Subsequently, in the second stage, the efficacy of BX, administered during gestation to mitigate the LVH of the offspring, was evaluated. The effects of BX administration at the functional level of the left ventricle were evaluated by ECG, left ventricular remodeling, interstitial space area, quantification of MDA, GSH and GPx activity, mRNA expression of cardiac damage genes (ANP and BNP), early response (c-jun, c-fos and c-myc) and late (Mef2c, GATA-4 and NFAT) response. The results show that BX supplementation during pregnancy does not alter cardiac functionality, even though concentrations of 6.4 and 100 mg/kg induce high levels of BNP and ANP expression that indicate cardiac damage, but only the concentration of 6.4 mg /kg shows left ventricular remodeling. Regarding the administration of 12 mg/Kg of BX, this increases the total size of the heart, but does not induce interstitial fibrosis, presenting basal levels of cardiac damage markers. In the second stage, when BX was used as a treatment to mitigate LVH, we found that the three concentrations administered during pregnancy reduce oxidative stress as indicated by the reduction of MDA, the increase in GSH and GPx, but does not show remodeling, nor decreases cell damage. In addition, the Calcineurin/NFAT pathway remains active, which increases the expression of ANP and BNP mRNA characteristic of cardiac damage. These results contribute to the understanding of the mechanism of action of BX in the heart. Given the complexity of the action mechanisms that are activated in LVH, we consider it necessary to develop more studies where other borate compounds are evaluated, including fructoborates.

Key Words: Cardiac hypertrophy, borax, oxidative stress, hypertrophic biomarkers.

1 Introducción.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, siendo la principal causa de muerte en todo el mundo, se calcula que en 2015 murieron por esta causa 17,7 millones de personas, lo que representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (OMS, 2017). La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) se considera una enfermedad cardiovascular grave que conlleva a insuficiencia cardíaca (IC), y se caracteriza por el engrosamiento de la pared libre del ventrículo izquierdo (PLVI) y del tabique interventricular (TIV) debido a la ganancia de citoplasma por la acumulación de sarcomeros que favorece el aumento del tamaño celular (Carreño et al., 2006; Hernández et al., 2017). El presente trabajo, está centrado en la HVI adquirida, como respuesta secundaria adaptativa ante la estimulación β -adrenérgica con isoproterenol (ISO).

La HVI cumple un rol de compensación cardíaca en la preservación de la función contráctil, sin embargo, es un factor de riesgo de morbimortalidad, debido a que su diagnóstico se da en etapas tardías. Hasta el momento los tratamientos disponibles no revierten el daño celular, por lo que la mejor opción es el trasplante cardíaco (TC). En la búsqueda de mecanismos que reduzcan el daño, destaca el uso de boratos.

Los compuestos de boro juegan un papel central en la respuesta antiinflamatoria (Scorei et al., 2007; Scorei et al., 2010; Scorei & Rotaru, 2011) de la osteoartritis (Reyes-Izquierdo et al., 2012; Scorei et al., 2011) y en combinación con resveratrol tiene efectos beneficiosos en sujetos con angina de pecho al ser adicionado en la dieta (Militaru et al., 2013). El efecto del bórax (BX) se evaluó en cultivo primario de cardiomiocitos sometidos a un estímulo hipertrófico con ISO, en donde se demostró que BX tiene un papel cardioprotector al inhibir la apoptosis, incrementar la actividad mitótica y evitar el crecimiento acelerado (Hernández-Gutiérrez et al., 2020). Además, el BX también minimiza el daño al reducir los mecanismos de señalización ligado a la HVI por efecto competitivo. Estos hechos nos permiten suponer que el BX podría ejercer un efecto reparador sobre el daño inducido por la HVI. Por tal motivo, en este trabajo de investigación se evaluará el efecto del BX en el corazón de ratones con HVI inducida durante la gestación.

2 Marco teórico.

2.1 Corazón.

El corazón es un órgano muscular de contracción involuntaria; compuesto por cuatro cámaras. Las cámaras superiores se denominan aurícula izquierda y aurícula derecha, las cámaras inferiores se denominan ventrículo izquierdo (VI) y ventrículo derecho (VD). Una pared muscular, denominada tabique, separa las aurículas izquierda y derecha y a los ventrículos izquierdo y derecho. La función del corazón es bombear el componente sanguíneo hacia todo el organismo a través de lo que se conoce como ciclo cardiaco, conformado por dos procesos simultáneos denominados sístole y diástole. La sangre es transportada desde el corazón al resto del cuerpo por medio de una red compleja de arterias, arteriolas y capilares; regresando al corazón por las vénulas y venas (Tortora & Derrickson, 2006).

2.2 Enfermedades cardiovasculares.

Las ECV ocasionaron cerca de 18 millones de defunciones a nivel mundial en 2015, representando el principal problema de salud pública a nivel mundial (Cervantes, 2019). El desarrollo de las ECV se acompaña de factores de riesgo cardiovascular como la diabetes, hipertensión, dislipidemia, obesidad o sobrepeso, las cuales han incrementado en México (Londoño Agudelo, 2017), con una prevalencia de más del 60% en la población adulta, que junto al proceso de envejecimiento aumentan la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Sánchez et al., 2014). Cabe destacar que no solo los adultos mayores presentan ECV, ya que se ha observado un aumento consistente en la incidencia de factores de riesgo cardiovascular en la población joven. Sumando que existe una asociación de aspectos individuales y socioculturales como la exposición al humo de tabaco, presentes desde la infancia (Almazán-Ávila, 2020). Por lo que desde etapas muy tempranas inicia la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. Destacando el desarrollo de HVI en niños de entre 3 y 12 años, con el único antecedente de obesidad; es decir, no fue necesario que llegaran a ser adultos y presentaran hipertensión arterial para desarrollar complicaciones cardiovasculares (Cinvestav, 2021). La HVI puede desarrollarse en la etapa fetal por la exposición que presenta la madre durante la gestación a fármacos, agentes físicos, edad materna avanzada o diabetes (Carlos, 2010), lo que genera un efecto adverso en el medio ambiente intrauterino que altera el desarrollo embrio/fetal (Tejada López et al., 2018). Es sabido que al año nacen aproximadamente 150,000 hijos de madres que cursaron con diabetes y/o presentaron

obesidad durante la gestación (Hernández-del Rio et al., 2013), lo que implica la exposición a factores de riesgo cardiovascular desde la etapa fetal.

2.3 Hipertrofia.

La hipertrofia se define como el agrandamiento o crecimiento excesivo de un órgano o tejido debido a un aumento en el tamaño celular de sus células constitutivas (Dorn et al., 2003). Por lo que la hipertrofia cardiaca es el aumento del tamaño de los cardiomiocitos (Samak et al., 2016) como respuesta adaptativa a estímulos mecánico, estímulos neurohumorales y estrés oxidativo.

2.4 Clasificación de la hipertrofia cardiaca.

Existen diferentes métodos para la detección de la HVI como el electrocardiograma (ECG), ecocardiograma, y resonancia magnética, así como marcadores moleculares que indican, de acuerdo a los niveles encontrados de BNP y ANP, la gravedad de la insuficiencia cardiaca presente en el individuo (Alejandro Salomone, 2002). Dependiendo del estímulo la hipertrofia se clasifica en hipertrofia cardiaca fisiológica adaptativa e hipertrofia patológica no adaptativa (Carreño et al., 2006; Tham et al., 2015; Zhao et al., 2017). Tanto la hipertrofia cardíaca fisiológica como la patológica son causadas por estímulos mecánicos y moleculares, y están asociadas con dos fenotipos estructurales, la remodelación excéntrica y la remodelación concéntrica (You et al., 2018).

Por un lado, la hipertrofia fisiológica a nivel anatómico está caracterizada por el alargamiento de la PLVI en respuesta a la sobrecarga de volumen. A nivel histológico este proceso se encuentra distinguido por el aumento del tamaño de los cardiomiocitos (células alargadas) debido a la acumulación de sarcómeros en serie (uno detrás del otro), acompañado de un crecimiento intersticial concordante, sin formación de fibrosis cardiaca ni apoptosis. Este tipo de hipertrofia determina el crecimiento del corazón durante el desarrollo del ser humano, se presenta durante el embarazo y en atletas (Morales et al., 1999). Destacando que los estímulos patológicos que provocan la sobrecarga de volumen son la insuficiencia aórtica y la insuficiencia mitral (You et al., 2018).

Por otra parte, la hipertrofia patológica secundaria a sobrecarga de presión se encuentra caracterizada por el incremento en el grosor de la PLVI y TIV, acompañado o no, de la reducción en la luz del ventrículo izquierdo (LVI). En donde el cardiomiocito es agrandado por la acumulación

de los nuevos sarcómeros en paralelo (uno a la par del otro). Sin embargo, el crecimiento excesivo de los cardiomiocitos conduce a apoptosis, esto genera excesivos acúmulos de colágena tipo I y III, llamado fibrosis cardiaca (Tham et al., 2015). Este proceso no es reversible por lo que progresa a IC y presenta un potencial riesgo de muerte súbita (Guadalajara Boo, 2007). Esta patología es secundaria principalmente a hipertensión arterial (HA) o estenosis aórtica, Diabetes tipo 2, diabetes gestacional y a cardiopatías congénitas (Carreño et al., 2006; Escudero et al., 2010).

2.5 Mecanismos moleculares en la hipertrofia cardiaca patológica.

Durante el desarrollo a la HVI se activan diferentes vías de señalización que promueven la remodelación y en última instancia la IC (Ilustración 1). Las moléculas que se unen a los receptores acoplados a la proteína G (*por sus siglas en inglés* GPCR), como las catecolaminas, la angiotensina II (Ang II) y la endotelina 1 (ET-1) activan la subunidad Gq unido a membrana y a la fosfolipasa C (*por sus siglas en inglés* PLC) lo que resulta en la hidrólisis de fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (*por sus siglas en inglés* PIP2). Los productos de esta reacción son inositol 1, 4, 5-trifosfato (*por sus siglas en inglés* IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 moviliza calcio (Ca^{2+}) de depósitos de orgánulos intracelulares, aumentando así el nivel intracelular de Ca^{2+} (Ruiz-Hurtado et al., 2013). El incremento de Ca^{2+} intracelular, debido a la activación de la vía GPCR-PLC-IP3, estimula la calmodulina (CaM) mediante su unión con Ca^{2+} , posteriormente CaM activa a calcineurina (CaN) y este desfosforila al factor de transcripción citoplasmático Factor nuclear de células T activadas (*por sus siglas en inglés* NFAT), lo que facilita su translocación al núcleo. Este factor de transcripción necesita la colaboración de otros factores provenientes de la vía de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (*por sus siglas en inglés* MAPK), que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la HVI (Zhang et al., 2020). En esta vía el estímulo, que puede ser el factor de crecimiento epidérmico (*por sus siglas en inglés* EGF) se une a su receptor y desencadena una serie de fosforilaciones que activan factores de transcripción como el factor potenciador de miocitos-2 (*por sus siglas en inglés* Mef2c) y la proteína de unión a GATA-4 (GATA-4) que en conjunto con NFAT posibilitan la transcripción de genes hipertróficos como el péptido natriurético auricular (*por sus siglas en inglés* ANP), el péptido natriurético tipo B (*por sus siglas en inglés* BNP) y la cadena pesada de β -miosina (*por sus siglas en inglés* β -MHC) (Melaku & Desalegn, 2019), lo que resulta en la acumulación de sarcómeros por el incremento de la síntesis

de proteínas contráctiles (actina y miosina), que conducen al crecimiento en tamaño de los miocitos cardiacos.

Además de las vías de señalización antes mencionadas, el desarrollo de la HVI, también implica otro proceso crítico, el estrés oxidativo (Dong et al., 2018). El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas antioxidantes intrínsecos del corazón por ejemplo, superóxido dismutasa (*por sus siglas en inglés* SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) (Tham et al., 2015). La producción regulada de ERO está involucrada en la fosforilación oxidativa y en la modulación de las vías de señalización, "señalización redox", con el potencial de inducir una regulación altamente específica en el fenotipo celular. Sin embargo, la generación excesiva de ERO desencadena disfunción celular, peroxidación de lípidos y puede conducir a daño celular irreversible o muerte (Takimoto & Kass, 2007; Tsutsui et al., 2011). Las fuentes de ERO identificadas en el corazón incluyen la cadena respiratoria mitocondrial, el complejo enzimático unido a la membrana nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidasa (*por sus siglas en inglés* NADPH) y óxido nítrico sintasa desacoplado tipo 3 (*por sus siglas en inglés* ONS3) (Giraldo, 2010). Las ERO estimulan el crecimiento del miocardio, la remodelación de la matriz y la disfunción celular mediante su interacción con diferentes moléculas de las vías de señalización características de la HVI como la proteína de unión a GTP Ras, PKC, JNK, p38 y PI3K (Sabri et al., 2003; Tsutsui et al., 2011).

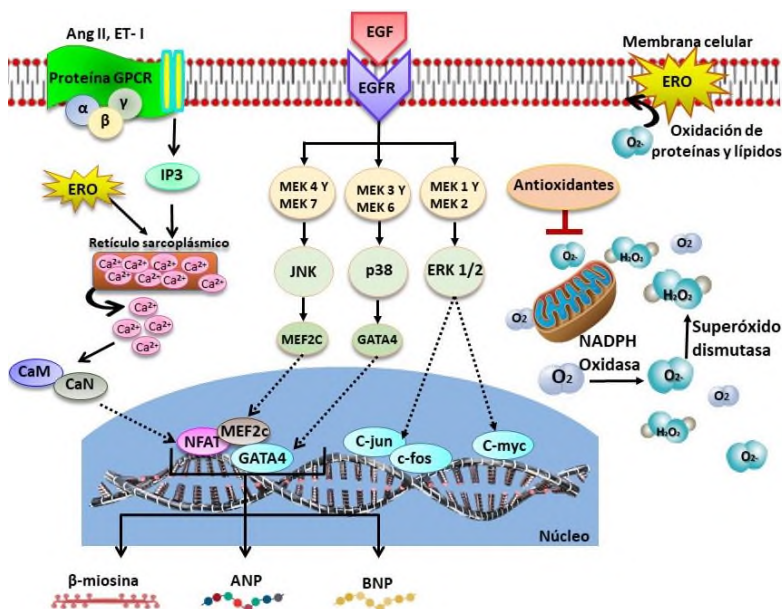


Ilustración 1 Vías de señalización implicadas durante la hipertrofia cardiaca.

Imagen elaborada a partir de las referencias Melaku & Desalegn (2019), Nakamura & Sadoshima (2018) y Yan *et al* (2019). Abreviaturas: Ang II: angiotensina II, ET-I: endotelina I, Proteína GPCR: receptor acoplado a proteína G, IP3: inositol 1, 4, 5-trifosfato, Ca²⁺: calcio, CaM: calmodulina, CaN: calcineurina, NFAT: factor nuclear de células T activadas, GATA-4: proteína de unión a GATA-4, MEF2c: factor potenciador 2C específico de miocitos, ANP: péptido natriuretico auricular, BNP: péptido natriuretico tipo B, EGF: factor de crecimiento epidérmico, EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, c-jun, c-fos, c-myc: Factos de transcripción de respuesta temprana, ERO: especies reactivas de oxígeno.

2.6 Modelos animales de enfermedad cardiovascular.

Teniendo en cuenta que la HVI constituye un problema de salud a nivel mundial, la selección de nuevos blancos para la prevención es la principal tarea de varias investigaciones. La utilización de modelos animales para el estudio de enfermedades cardiovasculares ha contribuido al progreso en el conocimiento del desarrollo de la patología y ha permitido comprobar la eficacia de diferentes enfoques preventivos y terapéuticos tanto farmacológicos como intervencionistas. En mamíferos pequeños existen varios tipos de modelos de alteraciones cardiovasculares que ocurren espontáneamente o son inducidos experimentalmente (Chorro et al., 2009). El modelo animal desarrollado por el grupo de trabajo mediante inyecciones intraperitoneal de ISO es el que usamos para este proyecto de investigación (Del Olmo-Turrubiarte et al., 2015).

2.7 Boro.

El boro es el primer elemento del grupo 3A de la tabla periódica que muestra propiedades metálicas y no metálicas, se considera un oligoelemento biológico que se encuentra en forma de boratos en el agua y el suelo. El boro pasa a las plantas y los animales y, por tanto, a los seres humanos a través de su nutrición (Aydin et al., 2018). Las principales fuentes dietéticas de boro son los frutos secos, frutas frescas, verduras de hoja verde, hongos y legumbres. El boro puede estar involucrado en el metabolismo y la utilización de elementos como el Ca^{2+} y el magnesio (Mg^{2+}), reduciendo su tasa de excreción y aumentando los niveles séricos (EFSA, 2006; Vitamins & Minerals, 2003), también en el metabolismo de vitamina D, hormonas esteroideas y lípidos plasmáticos (Koc et al., 2015).

Algunos compuestos del boro como el fructoborato de calcio, tiene acciones benéficas sobre la inflamación sistémica, se sabe que disminuyen los biomarcadores de inflamación, velocidad de sedimentación globular (VSG), fibrinógeno (FBR) y proteína C reactiva (Scorei et al., 2011). Además, mejora los índices de dolor (Reyes-Izquierdo et al., 2012) y los malestares de rodilla (Pietrzkowski et al., 2018). Por otra parte, se ha informado que el BX reduce el estrés oxidativo al apoyar positivamente el sistema antioxidante en diferentes modelos de enfermedad y toxicidad, como en el modelo de insuficiencia hepática fulminante en ratas Wistar (Pawa & Ali, 2006), Ince et al. (2010) demostraron que la suplementación de la dieta de ratas Sprague Dawley con BX, disminuye la concentración de malondialdehído (MDA) e incrementa el nivel de glutatión (GSH)

en sangre, por lo que sugieren que el BX mejora el mecanismo de defensa antioxidante. En el modelo de isquemia/reperfusión de médula espinal en ratas Sprague-Dawley, el tratamiento con BX previno la disminución de la capacidad antioxidante total (Koc et al., 2015). En la intoxicación por cisplatino en ratas Wistar el tratamiento con BX disminuye el daño renal (Hazman et al., 2018). En el modelo de toxicidad por cobre en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la administración de BX, favoreció el sistema de enzimas antioxidantes y disminuyó la apoptosis y el estrés oxidativo (Alak, Parlak, et al., 2019). En el estudio realizado por Hernández-Gutiérrez et al. (2020), se demostró que el pretratamiento con BX por 24h disminuye el crecimiento acelerado, favorece la actividad mitótica y reduce la apoptosis de cardiomiocitos. Por lo que el BX también ejerció un papel benéfico, al reducir el efecto hipertrófico en el cardiomiocito.

La amplia gama de respuestas probablemente sea secundaria a la influencia del boro en un sistema de señalización celular involucrada en muchos procesos bioquímicos (Nielsen, 2014). Sin embargo, no se ha confirmado una ruta bioquímica específica para los compuestos del boro (Mogoşanu et al., 2016). Dado que se sugiere la participación del estrés oxidativo en patologías cardíacas (D’Oria et al., 2020) y aunque el BX no se considera un antioxidante, los estudios realizados indican que los compuestos del boro, especialmente el BX, reduce el estrés oxidativo al apoyar positivamente el sistema antioxidante en diferentes modelos de enfermedades y, por lo tanto, pueden contribuir al tratamiento de la HVI.

3 Justificación.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan el principal problema de salud pública a nivel mundial (Cervantes, 2019). Una de las enfermedades con mayor incidencia es la HVI la cual se acompaña de factores de riesgo cardiovascular como diabetes, hipertensión, dislipidemia, obesidad o sobrepeso. La HVI puede desarrollarse durante la etapa fetal a causa de diferentes exposiciones o enfermedades presentes en la madre durante la gestación, como la exposición a fármacos, agentes físicos, edad materna avanzada o diabetes. Actualmente no existe tratamiento que prevenga o cure la HVI y los medicamentos o tratamientos aplicados van enfocados a controlar los factores de riesgo cardiovascular. Debido a las altas comorbilidades que existe en las mujeres gestantes se busca disminuir la incidencia de la HVI en los neonatos, mediante el desarrollo de nuevas alternativas como la terapia celular y el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos que contribuyan en la prevención y homeostasis cardiaca. Por lo tanto, en este estudio analizamos el efecto del BX como tratamiento oral sobre la HVI inducida por ISO.

4 Hipótesis.

La administración de bórax durante la etapa fetal mitigará el efecto hipertrófico inducido con isoproterenol en los ratones durante la gestación.

5 Objetivos.

5.1 Objetivo general.

Evaluar si la administración de bórax durante la gestación mitiga en el corazón los efectos hipertróficos del isoproterenol.

5.2 Objetivos específicos.

- Evaluar el daño cardiotoxico de la suplementación del bórax administrado durante la gestación en crías de ratones.
- Analizar los cambios fisiológicos y anatómicos en corazones hipertróficos tratados con bórax durante la gestación
- Evaluar el daño celular mediante los cambios histopatológicos y el nivel de estrés oxidativo de corazones hipertróficos tratados con bórax.
- Medir los cambios de expresión de los genes de daño cardiaco, y de respuesta temprana y tardía implicados en la señalización de la hipertrofia.

6 Diagrama experimental.

La metodología se llevó a cabo en dos etapas. En la etapa I se analizó en el corazón de las crías el efecto indirecto de BX, mediante la suplementación oral a 6.4, 12 y 100 mg/kg a ratones hembras a los 14 días post-coito (dpc) (Ilustración 2).

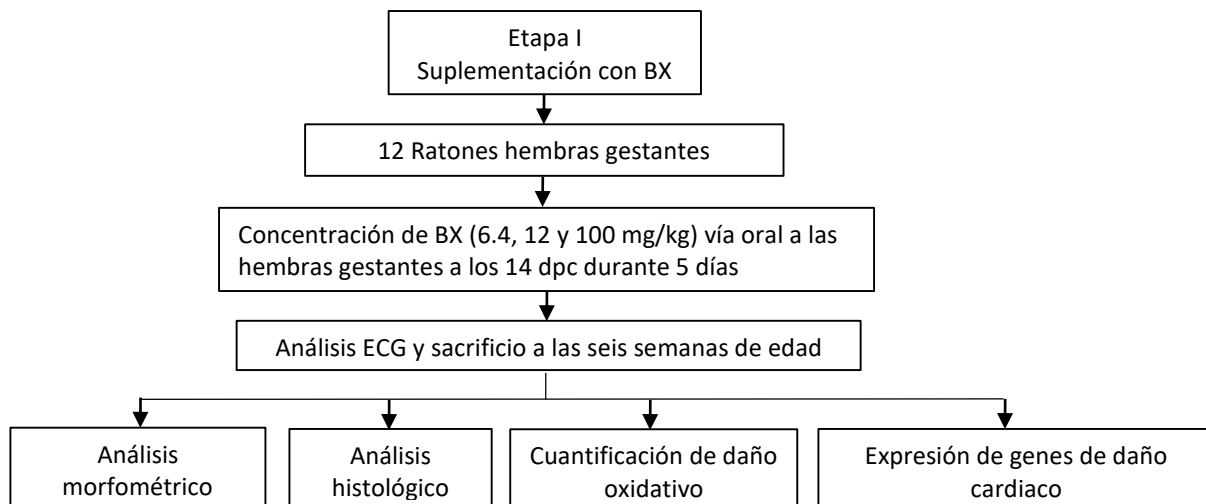


Ilustración 2 Metodología general para la etapa I.

En la etapa II se analizó el efecto del BX como tratamiento para la HVI inducida durante el periodo fetal (Ilustración 3).

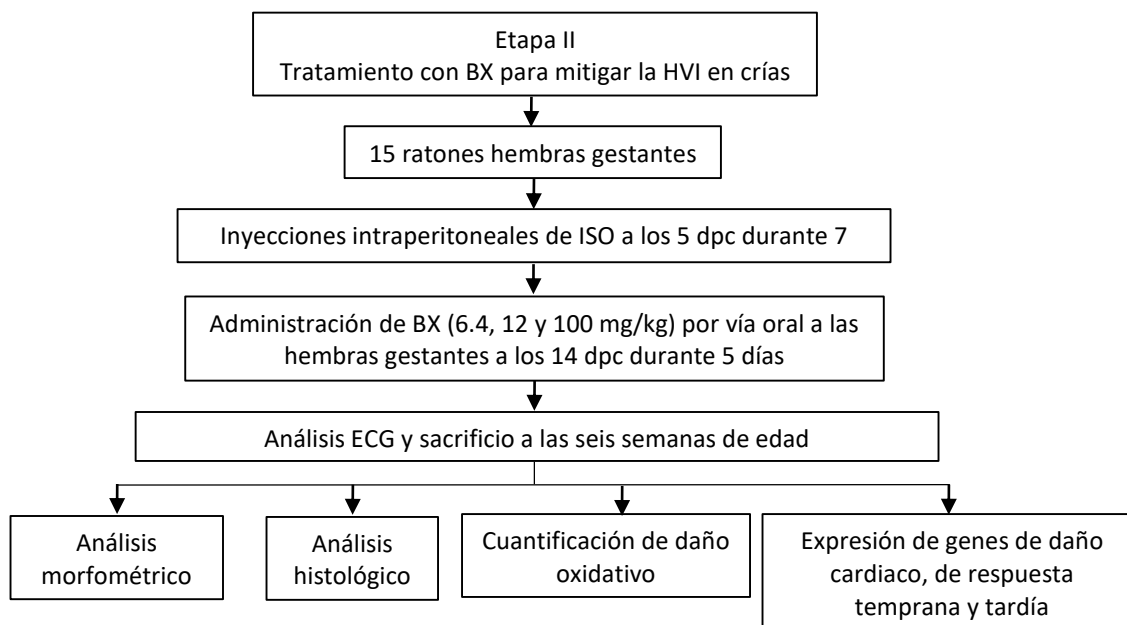


Ilustración 3 Metodología para la etapa II.

7 Materiales y métodos.

7.1 Material biológico.

Se utilizaron ratones hembra *Mus musculus* de la cepa Balb/c de siete semanas de edad proporcionadas por el bioterio del Hospital Infantil de México Federico Gómez de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El apareamiento fue monitoreado por la presencia del tapón vaginal (día cero).

Etapa I. cuatro grupos conformados por tres ratones cada uno, recibieron a los 14 días de gestación por vía oral durante 5 días una solución de BX a concentraciones de 6.4 (grupo BX 6.4), 12 (grupo BX12), 100 mg/kg de BX (grupo BX100) (Ince et al., 2010) y solución salina de fosfatos (grupo CTR). La gestación fue llevada a término y las crías de cada grupo fueron analizadas a las seis semanas de edad.

En la etapa II. Cinco grupos compuestos por tres ratones cada uno, fueron inyectados al quinto día de gestación durante 7 días vía intraperitoneal con ISO (50 ng/kg/día) para inducir HVI en las crías (Del Olmo-Turrubiarte et al., 2015). Posteriormente, a los 14 dpc las hembras gestantes recibieron vía oral durante 5 días concentraciones de BX a 6.4 (grupo BX6.4), 12 (grupo BX12), 100 mg/kg (grupo BX100) y solución salina de fosfatos (grupo HC) (Ince et al., 2010). Un grupo de hembras gestantes fueron administradas con solución salina de fosfatos en lugar de ISO y BX (grupo CTR).

Las crías de cada grupo fueron analizadas a las seis semanas de edad.

7.2 Análisis de funcionalidad cardiaca.

La funcionalidad cardiaca fue evaluada en las crías de 6 semanas. Los ratones se anestesiaron con 0.5 unidades de pentobarbital sódico (Pisa, México). Se empleó un ECG (AD Instruments, EE.UU), los electrodos se insertaron subcutáneamente en las extremidades periféricas de la axila derecha (negativo), ingle derecha (positivo) e ingle izquierda (tierra). Las señales se registraron a una tasa de muestreo de 8000 Hz, con intervalo de tiempo de 60s, utilizando una estación PowerLab (AD Instruments, EE.UU). Los datos se procesaron con el programa LabChart7 (AD Instruments, EE.UU.).

7.3 Estudio histopatológico de los corazones

7.3.1 Análisis morfométrico.

Posterior a los análisis funcionales, los ratones de cada grupo fueron sacrificados mediante dislocación cervical. El corazón fue perfundido con PBS y fijado con formalina neutra al 3.5%, se realizó disección transversal, retirando los atrios, tractos de entrada y salida ventricular. La región media y apical se fotografiaron empleando un microscopio estereoscópico (ZEISS West Alemania) acoplado a una cámara. En las micrografías se analizó el grosor de la PLVI, LVI y circunferencia empleando el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>)

7.3.2 Análisis histológico.

La región ventricular fue deshidratada empleando series graduales de etanol hasta absoluto. Se utilizó xilol como medio de aclaramiento del tejido y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes transversales de 8 μm de espesor empleando un micrótopo (GMI Certified, USA). Los cortes histológicos fueron desparafinados en un horno a 75 °C (ARSA, México) e hidratados. La tinción se realizó con hematoxilina y eosina (H-E). Se tomaron micrografías de las secciones de la PLVI utilizando un microscopio binocular acoplado a una cámara (CETI, EE.UU). Empleando el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), en las micrografías se analizó la integridad de las fibras cardiacas (índice de espacio intersticial) (Schneider et al., 2012)

7.4 Determinación de daño por estrés oxidativo en el ventrículo izquierdo.

7.4.1 Cuantificación de malondialdehído.

El MDA se evaluó empleando el kit de peroxidación lipídica (Bio Vision, EE.UU). La región ventricular de cada grupo fue homogeneizada en hielo con 300 μL de tampón de lisis MDA y 3 μL de hidroxitolueno butilado (BHT) 100X. La mezcla fue centrifugada durante 10 min a 13,000 g . Se recuperaron 200 μL del sobrenadante.

Se preparó 10 μL de MDA en 407 μL de H₂O_d estéril (MDA a 0.1 M), que posteriormente se diluyeron 20 μL de la solución MDA 0.1 M con 980 μL de H₂O_d (MDA a 2 mM). A partir de esta solución se diseñó la curva estándar con 0, 1, 2, 3, 4 y 5 nmol MDA en un volumen final 200 μL .

La curva estándar y las muestras de cada grupo se incubaron con 600 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 95°C durante 60 min. La reacción se mantuvo en hielo durante 10 min. Transcurrido el tiempo se realizó una centrifugación durante 10 min a 10,000 g . 200 μL del sobrenadante de

cada estándar y muestras fueron depositados en una microplaca de 96 pocillos. La absorbancia se midió a 532 nm empleando un fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) (Ohkawa et al., 1979).

7.4.2 Cuantificación de glutatión.

La PLVI de cada grupo fue triturada en PBS (relación 1:10). Se tomaron 50 µL del lisado celular y se mezcló con 50 µL de ácido metafosfórico (AMF) 10% (relación 1:1). La centrifugación se realizó a 24,000 *xg* por 20 min. 10 µL del sobrenadante de cada muestra se depositaron en placas de 96 pozos. La curva estándar se preparó a partir de 1 mg de GSH en 1.6 ml de AMF 10% como se indica en la tabla 2. El tampón Tris-Base se empleó a 0.4 M, pH a 8.9. 1 mg de 5,5'-Dithiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB) en 250 µL de metanol se preparó al momento de su uso. Se leyó la absorbancia a 412 nm en un fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

Tabla 1. Reactivos y volúmenes utilizados en las reacciones para la cuantificación de glutatión.

Pozo	GSH (µL)	AMF 10% (µL)	TRIS 0.4M (µL)	DTNB (µL)
1-Blanco	0	100	200	5
2-Curva estándar	2	98	200	5
3-Curva estándar	4	96	200	5
4-Curva estándar	6	94	200	5
5-Curva estándar	8	92	200	5
6-Curva estándar	10	90	200	5
7-Muestra	10	90	200	5

7.4.3 Análisis de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa.

La actividad enzimática se determinó con el kit de actividad celular de glutatión peroxidasa (Sigma-Aldrich, EE.UU). La lectura se realizó cada minuto durante 6 minutos, a una absorbancia de 340 nm, empleando un espectrofotómetro (Perkin Elmer, EE.UU). Los reactivos empleados se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Reactivos y volúmenes utilizados para la determinación de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa.

	Buffer GPx (μL)	NADPH (μL)	Muestra (μL)	t-Bu-OOH 30 Mm (μL)
Blanco	940	50	0	10
Muestra	910	50	30	10

7.5 Expresión de genes de daño cardíaco, genes de respuesta temprana y tardía reguladores de hipertrofia cardíaca.

7.5.1 Extracción de ARN.

A partir de 50-100 mg de PLVI de cada grupo se obtuvo el ARN empleando la técnica de Trizol Reagent™ (Invitrogen Life, EE.UU). Las muestras fueron maceradas con 1 mL de Trizol. Posteriormente se adicionó 200 μL de cloroformo, seguido de una mezcla suave por 10 s. La centrifugación se realizó a 12,000 *xg* durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en un tubo limpio libre de ADNsa y ARNsa. Se adicionó 500 μL de isopropanol y se incubó toda la noche a -20°C. Posteriormente el ARN fue recuperado mediante centrifugación a 12,000 *xg* durante 15 min a 4 °C. El botón recuperado fue lavado con etanol al 75% y se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. La hidratación se realizó con 50 μL de agua libre de ADNsa y ARNsa. El ARN fue cuantificado por espectrofotometría a 260/280 nm empleando un NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y la integridad fue evaluada en geles de agarosa 1%.

7.5.2 Síntesis de ADNc.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se empleó 1 μg de ARN total en un volumen final de 20 μL. La mezcla de reacción contiene dNTPs (Promega), hexámeros (Bio Basic INC, EE.UU), inhibidor de ARNsas (Invitrogen Life, EE.UU), tampón de transcripción reversa 1X, y transcriptasa reversa MuLV (BioLabs, New England). La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 20 min a 65°C, 60 min a 42°C y 10 min a 90°C.

7.5.3 RT-qPCR en tiempo real.

Los niveles de expresión relativa del ARNm de *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *Mef2c*, *GATA-4*, *NFAT*, *ANP* y *BNP*, se evaluaron por RT-qPCR, utilizando el método delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Como gen constitutivo se empleó el ARN ribosomal 18S (Tabla 4). La detección se realizó empleando

SYBR®Green (Applied Biosystems, EE.UU). Las condiciones de amplificación se muestran en la ilustración 4.

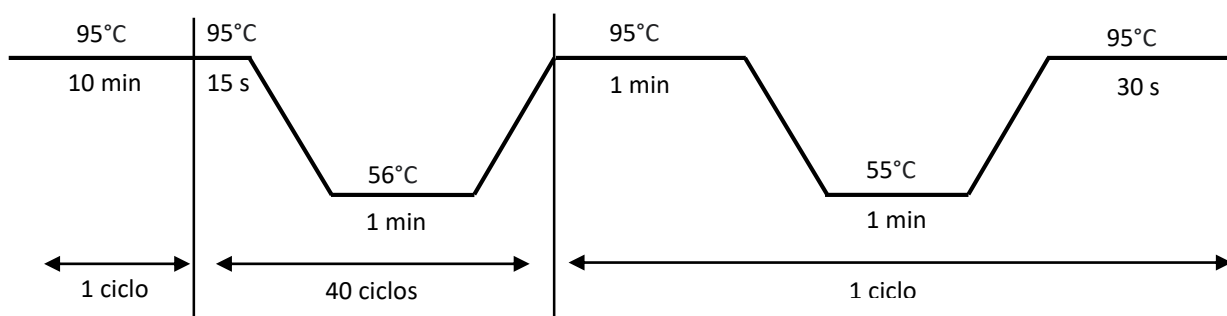


Ilustración 4 Condiciones de amplificación para PCR en Tiempo Real.

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para PCR en tiempo real

Nombre del primer	Secuencia	Etapa I	Etapa II
18S	5'-TAG GGA GAG CGG CTT TTA CA -3' 5'-GAC TCA TTC ATT CCC CGA GA -3'	X	X
c-jun	5'-AAA ACC TTG AAA GCG CAA AA-3' 5'-CGC AAC CAG TCA AGT TCT CA-3'		X
c-fos	5'-CTC CCG TGG TCA CCT GTA CT-3' 5'-TTG CCT TCT CTG ACT GCT CA-3'		X
c-myc	5'-GCC CAG TGA GGA TAT CTG GA-3' 5'-ATC GCA GAT GAA GCT CTG GT-3'		X
GATA-4	5'-GCA GCA GCA GTG AAG AGA TG-3' 5'-GCG ATG TCT GAG TGA CAG GA-3'		X
Mef2c	5'-CGG TGT CGT CAG TTG TAT GG-3' 5'-TGC AGT AGA TAT GCG GCT TG-3'		X
NFAT	5'-TCA TCC TGT CCA ACA CCA AA-3' 5'-TCA CCC TGG TGT TCT TCC TC-3'		X
ANP	5'- GAC GGG CTG AGG TTG TTT TA-3' 5'-ACT GTG GCA AGT TTG TGC TG -3'	X	X
BNP	5'- GAC GGG CTG AGG TTG TTT TA-3' 5'-ACT GTG GCA AGT TTG TGC TG -3'	X	X

8 Análisis de resultados.

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS 28.0.1 (IBM, EE.UU). Los resultados se mostraron como media (\bar{x}) \pm desviación estándar (SD). Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes con la finalidad de conocer la distribución de los grupos. Se empleó la prueba de correlación de Spearman para conocer la asociación entre las variables de un mismo grupo. Los valores de $p < 0.05$, < 0.01 o < 0.001 se consideraron significativos y se indicaron con las letras a, b y c respectivamente en cada figura. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

9 Resultados.

9.1 Análisis de la cardiotoxicidad del bórax como suplemento durante la gestación.

9.1.1 Efecto de la suplementación del bórax durante la gestación sobre la funcionalidad ventricular izquierda.

Los análisis del ECG realizados en el grupo BX6.4 revelaron que la administración de BX no afecta la frecuencia cardiaca (FC: \bar{x} =355.45, SD=43.06), ni el movimiento de los impulsos eléctricos a través de las cavidades inferiores del corazón (intervalo QRS: \bar{x} =0.0099, SD=0.0007) presentando valores similares al grupo CTR. Por lo que respecta al grupo BX12, la media de la FC (\bar{x} =337.92 lpm, SD=43.069) disminuyó; mientras que la media del intervalo QRS (\bar{x} =0.0099, SD=0.00071) incrementó en comparación con el grupo CTR (FC: \bar{x} =354.66 lpm, SD=41.44; QRS: \bar{x} =0.0094, SD=0.0007). A pesar de los cambios observados no se establecieron diferencias significativas. En lo que respecta al grupo BX100, la FC (\bar{x} =345.64 lpm, SD=54.889) y el intervalo QRS (\bar{x} =0.0105, SD=0.0014) no presentaron cambios significativos con respecto al grupo CTR (Figura 1).

9.1.2 Efecto de la suplementación del bórax durante la etapa fetal sobre la remodelación ventricular.

Para determinar los cambios anatómicos analizamos el grosor de la PLVI (Figura 2B), la luz ventricular izquierda (LVI, Figura 2C) y la circunferencia total del corazón (Figura 2D). Notablemente en el grupo BX6.4 tanto la PLVI (\bar{x} =3.099 μ m, SD=0.6508, p =0.000) como LVI (\bar{x} =1359.297 μ m, SD= 246.1785, p =0.001) fue significativamente mayor en comparación con el grupo CTR. Mientras que en los grupos BX12 a pesar de observar un incremento del grosor de la PLVI (\bar{x} =1.386 μ m, SD=0.4785) no fue significativo con respecto al grupo CTR, en cambio la LVI presentó incremento significativo (\bar{x} =333.593 μ m, SD=383.6214, p =0.009). En cuanto al grupo BX100 la PLVI se encontró incrementada significativamente (\bar{x} =1.501 μ m, SD=0.1826, p =0.025). Sin embargo, la LVI (\bar{x} =1.501 μ m, SD=0.182) no fue significativamente mayor en comparación con el grupo CTR. Cabe destacar que la circunferencia del corazón se incrementó en los grupos BX6.4 y BX12, aunque solo fue significativo para BX6.4 (p = 0.002). Mientras que el grupo BX100 permaneció sin cambios en relación al CTR.

Los análisis de correlación de Spearman sugieren una fuerte asociación positiva entre la amplitud QRS con la circunferencia ($\rho=0.905$, $p=0.035$) y una asociación negativa con la LVI ($\rho=-0.884$, $p=0.047$) en el grupo BX12.

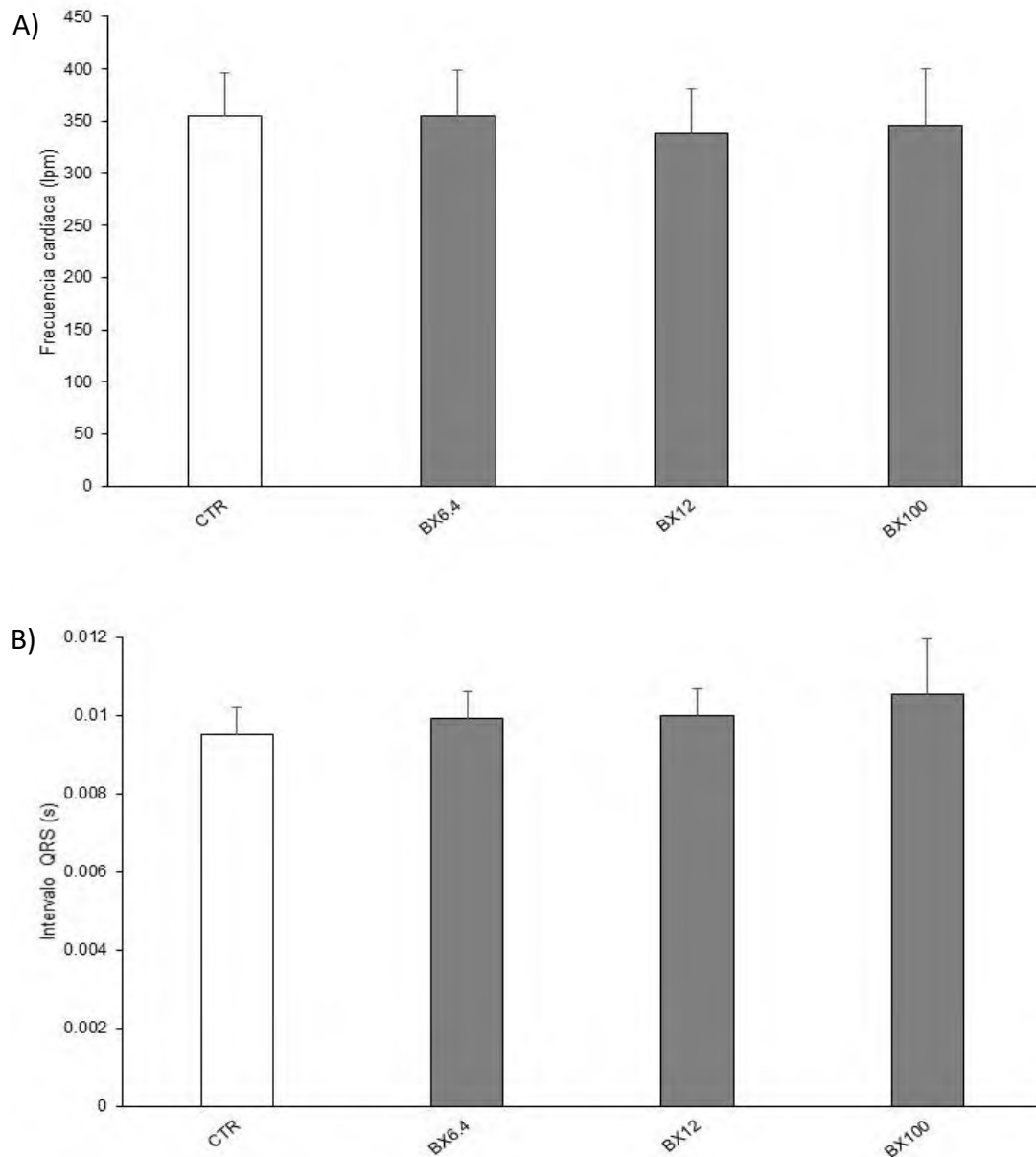


Figura 1 Electrocardiograma de ratones de 6 semanas de edad suplementados con bórax durante la gestación. A) Frecuencia cardíaca. B) Análisis del intervalo QRS. Todos los parámetros fueron tomados en un intervalo de un minuto. Para cada grupo se obtuvo un promedio de 5 ratones. Abreviaturas: CTR= control, BX6.4= bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= bórax en concentración de 12 mg/kg y BX100= bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes, dicho análisis no mostró diferencias significativas.

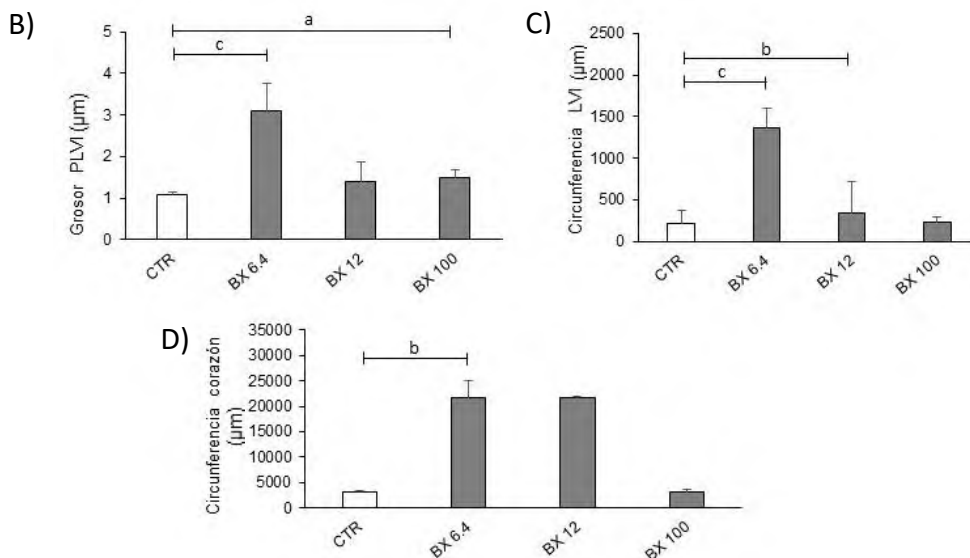
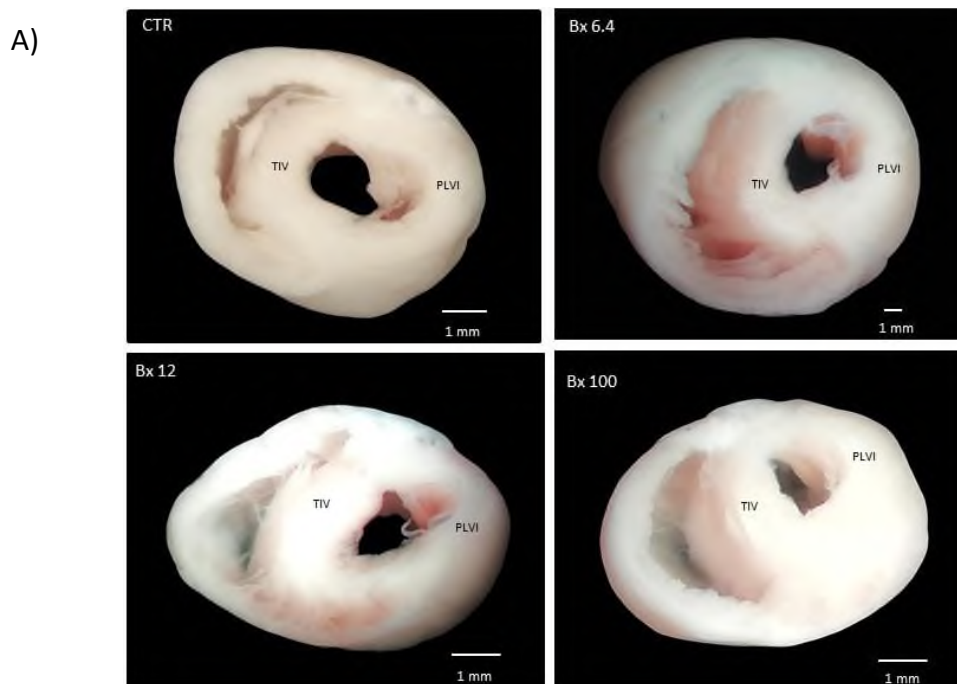


Figura 2 Análisis morfométrico de los corazones de ratón de 6 semanas de edad suplementados con bórax durante la etapa gestacional. A) Micrografía en corte transversal del corazón, barra de escala: 1 mm. B) Representación gráfica del grosor promedio de la PLVI. C) Representación gráfica de la circunferencia promedio de la LVI. D) Representación gráfica de la circunferencia del corazón. Abreviaturas: PLVI: pared libre del ventrículo izquierdo, LVI: Luz ventricular izquierda, CTR= control, BX6.4= bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= bórax en concentración de 12 mg/kg y BX100= bórax en concentración de 100 kg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, o, $p \leq 0.001$ respectivamente.

9.1.3 Efecto de la suplementación del bórax durante la etapa fetal sobre el daño celular en el tejido cardíaco.

Con la finalidad de establecer si la suplementación de BX induce daño estructural en el tejido cardíaco, se evaluó el área intersticial de la PLVI. De esta manera, se demostró que en el grupo BX6.4 hay pérdida significativa de la continuidad de las fibras cardiacas ($\bar{x}=42.205\%$, $SD=0.726$; $p=0.05$) en comparación con el grupo CTR ($\bar{x}=34.781\%$, $SD=2.516$). Interesantemente, no se encontraron cambios significativos en el índice de espacio intersticial determinado en el grupo BX12 ($\bar{x}=34.075\%$, $SD=0.070$) y BX100 ($\bar{x}=32.305\%$, $SD=0.368$) en relación al grupo CTR (Figura 3).

9.1.4 Efecto de la suplementación del bórax sobre la expresión de genes de daño cardíaco.

Al analizar la expresión relativa de los genes asociados al daño cardíaco, fue notable un incremento significativo en el ARNm de BNP y ANP en el grupo BX6.4 ($p=0.017$) y BX100 ($p=0.031$). En contraste, en el grupo BX12 los niveles de expresión de BNP y ANP permanecieron basales (Figura 4).

Interesantemente los análisis de Spearman establecieron en el grupo BX100 una fuerte correlación positiva entre los niveles de expresión de ANP con la FC ($\rho=0.998$, $p=0.037$), y una asociación negativa con la LVI ($\rho=-0.999$, $p=0.034$). También se presentó una correlación alta negativa entre los niveles de expresión del ARNm de BNP con el grosor de la PLVI ($\rho=-0.999$, $p=0.030$) y con el EI ($\rho=-0.999$, $p=0.027$) (Tabla 8).

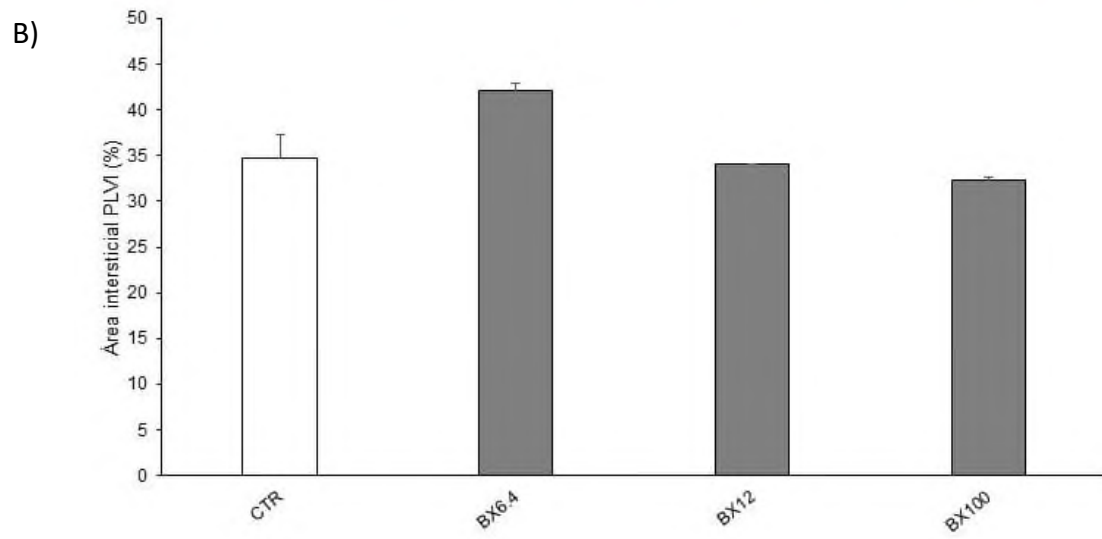
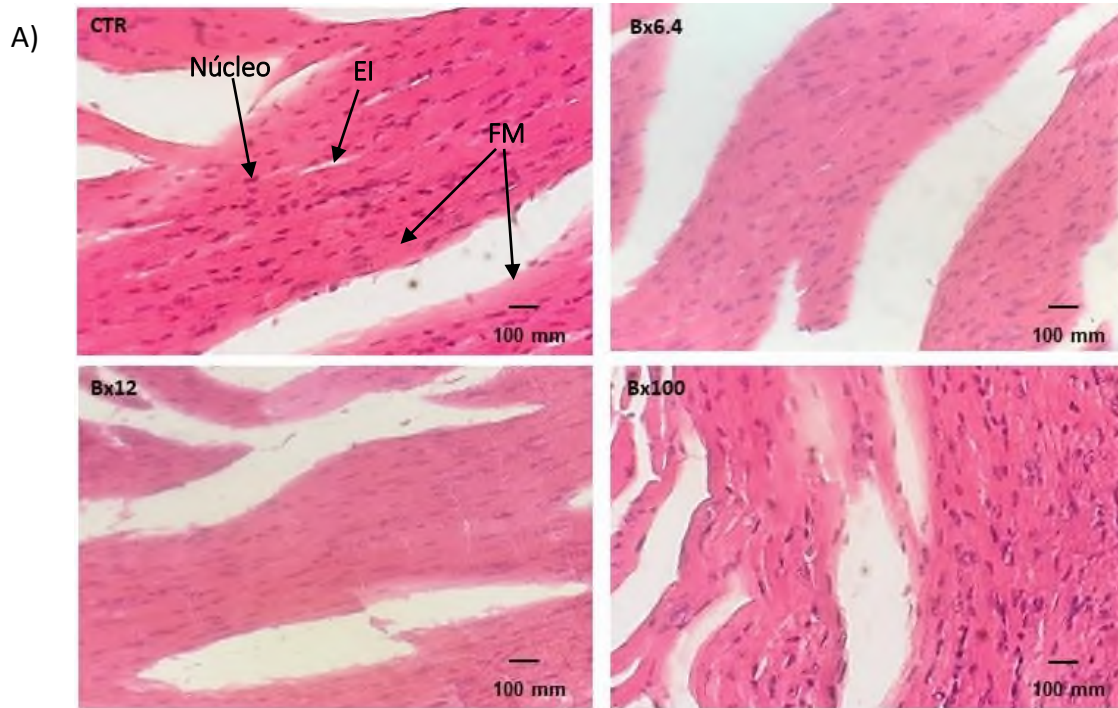


Figura 3 Histología cardiaca de ratones de 6 semanas suplementados con diferentes concentraciones de bórax durante la etapa fetal. A) Micrografías representativas de corte transversal del ventrículo izquierdo teñido con hematoxilina-eosina, 40x, las barras corresponden a 100 μ m. B) Cuantificación porcentual del área intersticial de la sección transversal del ventrículo izquierdo. Abreviaturas: PLVI: pared libre del ventrículo izquierdo, EI: espacio intersticial, FM: fibra muscular, CTR= control, BX6.4= bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= bórax en concentración de 12 mg/kg y BX100= bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes dicho análisis no mostró diferencias significativas.

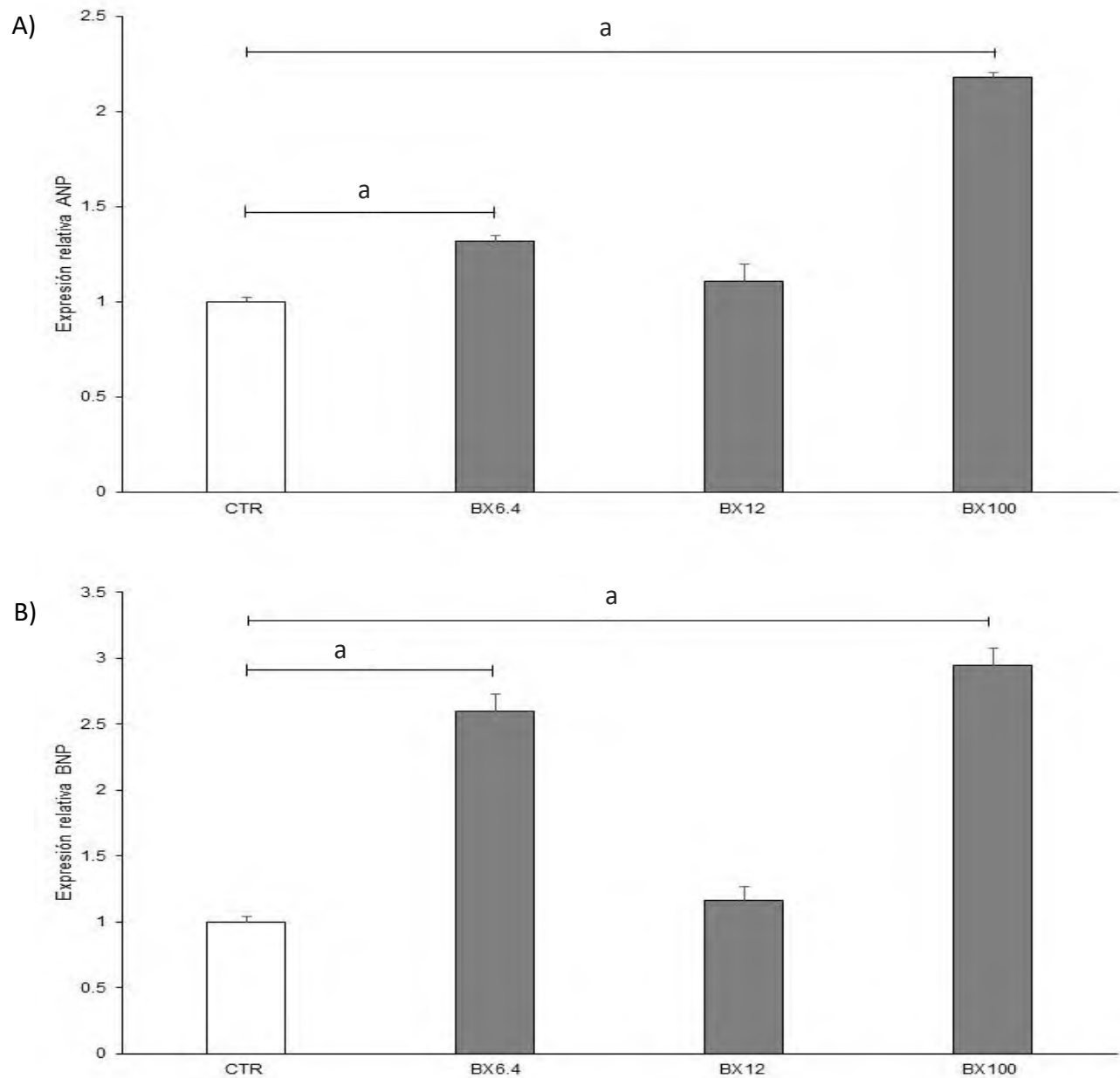


Figura 4 Expresión de marcadores de daño cardíaco en ratones de 6 semanas de edad que fueron suplementados con bórax durante la etapa fetal. A) Expresión relativa del ARNm del gen ANP. B) Expresión relativa del ARNm del gen BNP. Los valores del grupo CTR se establecen con un valor de 1. Abreviaturas: ANP= péptido natriurético auricular, BNP= péptido natriurético tipo B, CTR= control, BX6.4= bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= bórax en concentración de 12 mg/kg y BX100= bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente.

Tabla 4. Asociación entre funcionalidad cardiaca con las variables estructurales para los grupos de ratones suplementados con bórax.

Spearman * $p \leq 0.05$	BX6.4				BX12				BX100			
	ANATOMÍA				ANATOMÍA				ANATOMÍA			
	PLVI	LVI	Circunferencia	EI	PLVI	LVI	Circunferencia	EI	PLVI	LVI	Circunferencia	EI
FC	-0.037	-0.070	-0.481	-0.525	-0.218	-0.184	0.777	0.285	-0.093	-0.198	0.075	-0.627
	0.953	0.911	0.412	0.364	0.725	0.767	0.122	0.642	0.882	0.750	0.905	0.257
QRS	-0.397	-0.098	0.100	0.126	-0.676	-.884^a	.905^a	-0.619	-0.709	0.375	-0.227	-0.022
	0.508	0.876	0.873	0.841	0.210	0.047	0.035	0.266	0.180	0.534	0.713	0.972

Abreviaturas: FC= Frecuencia cardiaca, QRS= Intervalo QRS, PLVI= Pared libre del ventrículo izquierdo, LVI= Luz ventricular izquierda, EI= Espacio Intersticial. Se empleó la prueba de correlación de Spearman. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, o, $p \leq 0.001$ respectivamente.

Tabla 5. Correlación entre funcionalidad cardiaca y las variables estructurales con la expresión de marcadores de daño en las crías suplementadas con bórax durante la gestación.

Spearman	BX6.4		BX12		BX100	
	DAÑO CARDIACO		DAÑO CARDIACO		DAÑO CARDIACO	
	ANP	BNP	ANP	BNP	ANP	BNP
FC	-0.859	-0.347	0.337	-0.593	.998^a	0.725
	0.342	0.774	0.781	0.596	0.037	0.483
QRS	0.560	0.713	-0.992	-0.659	0.981	0.875
	0.622	0.495	0.081	0.542	0.125	0.322
PLVI	-0.112	-0.957	0.879	0.095	-0.732	-.999^a
	0.929	0.188	0.316	0.939	0.477	0.030
LVI	0.727	-0.808	0.992	0.660	-.999^a	-0.798
	0.482	0.401	0.082	0.542	0.034	0.412
CIRCUNFERENCIA	-0.924	-0.207	-0.983	-0.701	0.984	0.867
	0.249	0.867	0.118	0.506	0.115	0.332
EI	0.403	-0.973	0.962	0.310	-0.736	-.999^a
	0.736	0.148	0.176	0.799	0.474	0.027

Abreviaturas: FC= Frecuencia cardiaca, QRS= Intervalo QRS, PLVI= Pared libre del ventrículo izquierdo, LVI= Luz ventricular izquierda, EI= Espacio Intersticial, ANP= Péptido natriurético auricular, BNP= péptido natriurético cerebral. Se empleó la prueba de correlación de Spearman. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, o, $p \leq 0.001$ respectivamente

9.2 Efecto del bórax administrado a ratones hembras gestantes como tratamiento para mitigar el daño hipertrófico en las crías inducido por isoproterenol durante la gestación.

9.2.1 Efecto del bórax sobre la funcionalidad cardíaca.

La evaluación electrocardiográfica reveló que no hay cambios significativos en la FC e intervalo QRS en los diferentes grupos hipertróficos tratados con BX en comparación con el grupo CTR ni con el grupo HC (Figura 5).

9.2.2 Efecto del bórax sobre la remodelación ventricular.

El estudio morfométrico reveló que la PLVI del grupo HC+BX6.4 (\bar{x} =3.034 μ m, SD=0.636) incrementó significativamente en comparación con el grupo CTR (PLVI: \bar{x} =1.087 μ m, SD=0.071; p =0.006), pero no se encontraron diferencias en relación al grupo HC (PLVI: \bar{x} =1.452 μ m, SD=0.1231). Por lo que respecta al grupo HC+BX12 el grosor de la PLVI (\bar{x} =3.260 μ m, SD=0.794) también incrementó significativamente en comparación al grupo CTR (p =0.003), pero sin cambios significativos con el grupo HC. Mientras que en el grupo HC+BX100 la PLVI (\bar{x} =4.079 μ m, SD=0.5921) aumentó significativamente en comparación con el grupo CTR (p =0.000) y con el grupo HC (p =0.003) (Figura 6B).

Respecto al área de LVI, los resultados revelaron un incremento significativo en los tres grupos (HC+BX6.4: \bar{x} = 1318.785 μ m, SD= 320.5504, p =0.05; HC+BX12: \bar{x} = 1654.794 μ m, SD= 785.5201, p =0.02 y HC+BX100: \bar{x} = 1640.561 μ m, SD=535.7217, p =0.01) en relación al grupo CTR y con el grupo HC (HC+BX6.4: p =0.005, HC+BX12 p =0.002 y HC+BX100, p =0.001) (Figura 6C).

Al analizar la circunferencia del corazón, determinamos un incremento significativo en los tres grupos hipertróficos tratados con BX (HC+BX6.4: \bar{x} =22460.293 μ m, SD= 2896.1162, p =0.039, HC+BX12: \bar{x} =25281.431 μ m, SD= 6675.9166, p =0.023 y HC+BX100: \bar{x} = 23223.056 μ m, SD= 4217.8813, p =0.035) en comparación al grupo CTR y grupo HC (HC+BX6.4 p =0.002, HC+BX12: p =0.001 y HC+BX100: p =0.001) (Figura 6D).

Por tanto, sugerimos que la administración de BX no mitiga la remodelación ventricular, incluso favorece el crecimiento total del corazón.

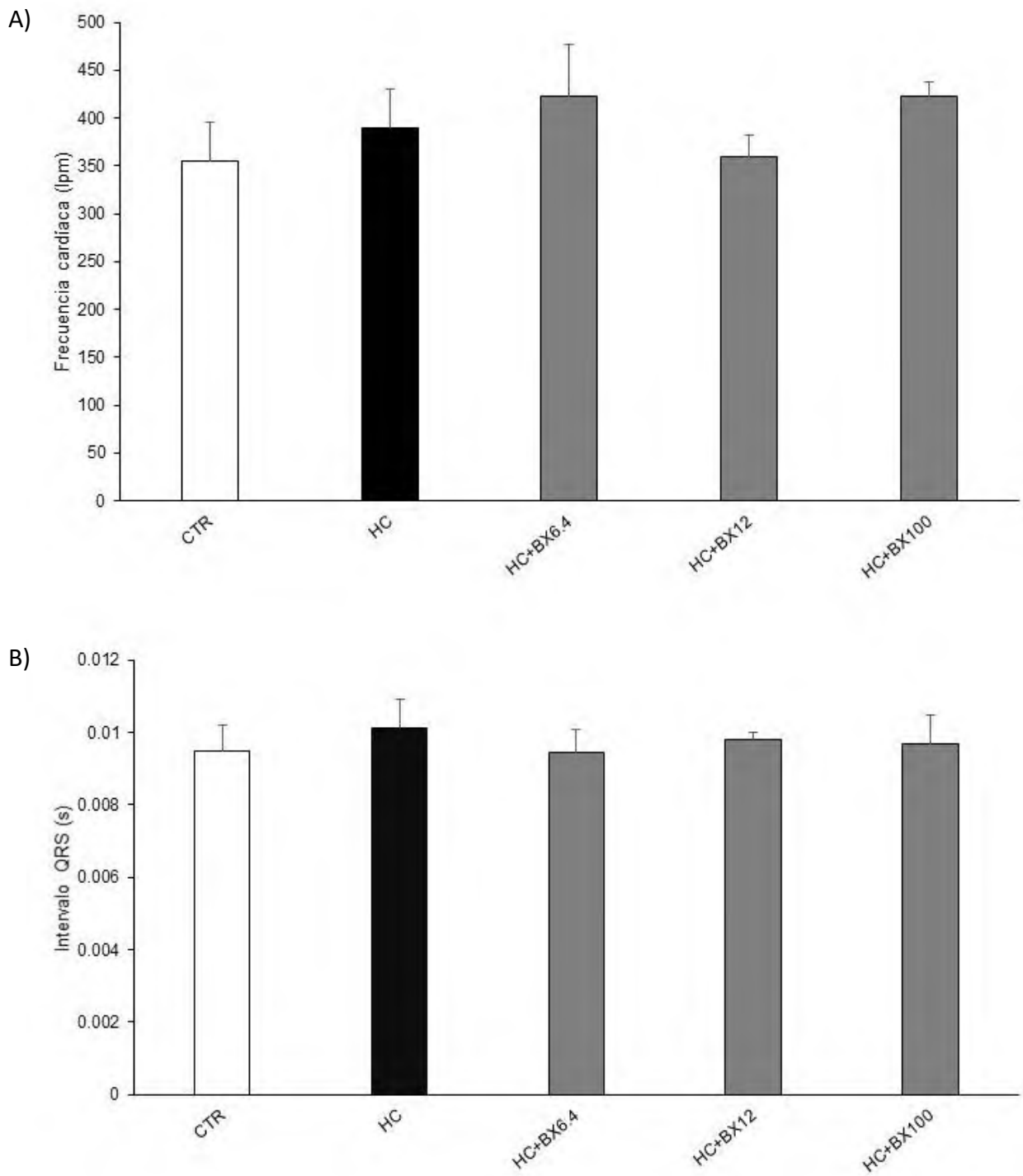


Figura 5 El tratamiento con bórax tiende a mejorar la funcionalidad cardíaca en ratones que recibieron el estímulo hipertrófico en la etapa embrionaria. Posterior al nacimiento de cada unidad experimental se realizó un estudio de ECG a las 6 semanas de edad. A) frecuencia cardíaca, B) Análisis del intervalo QRS. Abreviaturas: CTR= grupo control, HC= grupo hipertrófico, HC+BX6.4= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y BX= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes dicho análisis no mostró diferencias significativas.

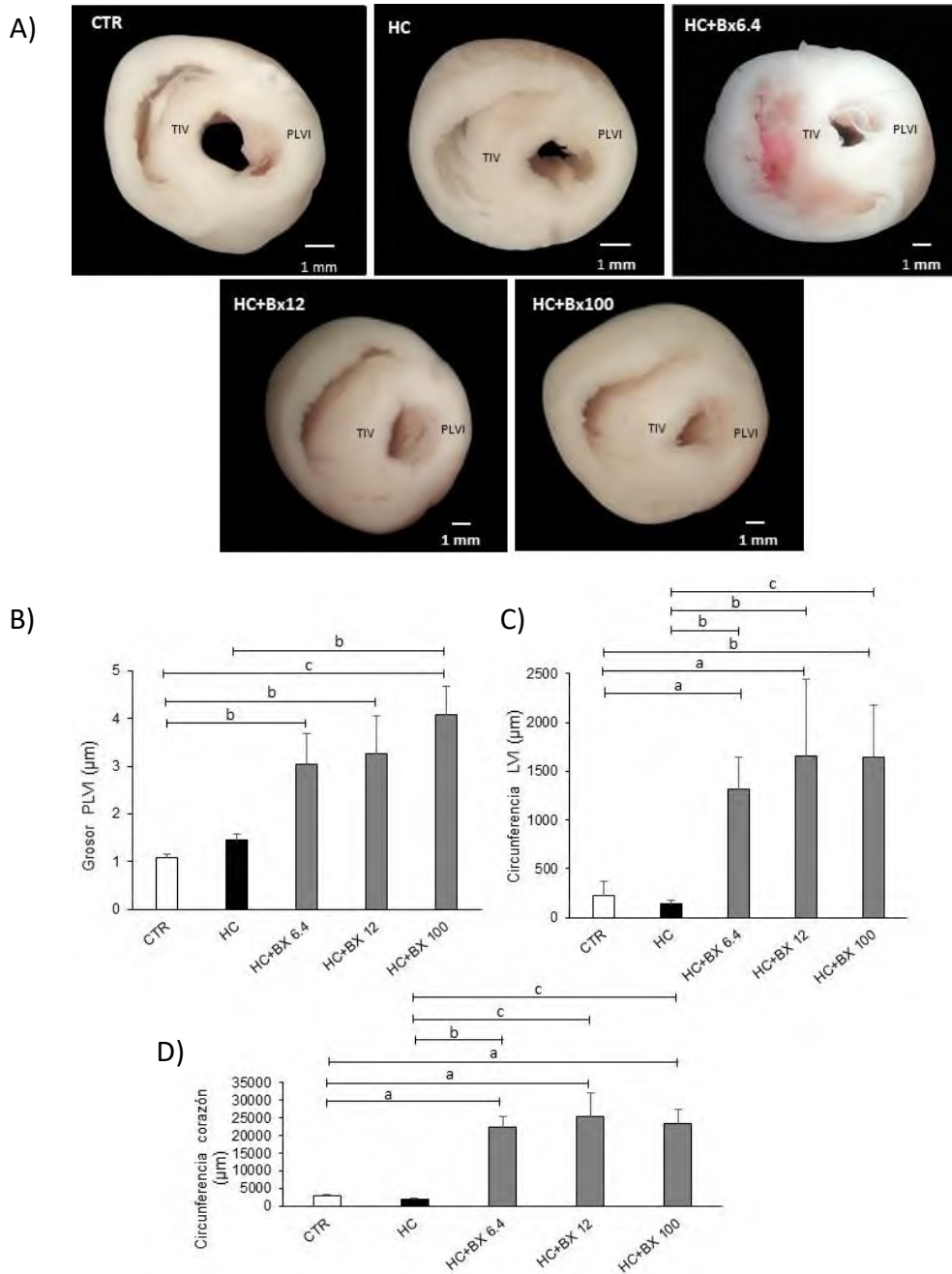


Figura 6 El tratamiento con bórax durante la etapa fetal en ratones que recibieron el estímulo hipertrófico incrementa el tamaño del corazón. A) Micrografía de corazón de ratón de 6 semanas de edad con corte transversal, barra de escala: 1000 μm. B) Representación gráfica del grosor promedio de la pared libre del ventrículo izquierdo. C) Representación gráfica de la circunferencia promedio de la luz del ventrículo izquierdo. D) Representación gráfica de la circunferencia del corazón. Abreviaturas: PLVI= pared libre del ventrículo izquierdo, VI= ventrículo izquierdo, CTR= grupo control, HC= grupo hipertrófico, HC+Bx6.4= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y BX= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, o, $p \leq 0.001$ respectivamente.

9.2.3 Reorganización de las fibras y daño celular.

Para determinar la integridad de las fibras cardíacas en los corazones hipertróficos tratados con BX, se determinó si el tratamiento lograba la recuperación en la organización miofibrilar, reflejado en el índice de espacio intersticial de la PLVI (HC+BX6.4: \bar{x} =39.695%, SD=0.526; HC+BX12: \bar{x} =37.676% SD=0.237, HC+BX100 \bar{x} =41.077%, SD=0.697). Sin embargo, la prueba de ANOVA demostró que no hay cambios en la distribución de las medias entre los grupos de estudio con los controles (\bar{x} =34.781%, SD=2.516) y HC (\bar{x} =40.776%, SD=6.197) (Figura 7B), pero podemos destacar que la concentración de 12 mg/kg de bórax tiende a disminuir la fibrosis intersticial que se ve reflejado con la disminución de la media en comparación con el grupo HC.

Para analizar el daño ocasionado en el tejido cardiaco, se evaluó la actividad de la enzima GPx. Determinamos que se presentó incremento significativo de la actividad enzimática entre el grupo HC+BX100 (\bar{x} =1.665 u/mg, SD=0.151, p =0.008) con el grupo HC (\bar{x} =0.519 u/mg, SD=0.150) (Figura 8A).

En el caso del GSH, se encontraron aumentos significativos entre los grupos HC+BX6.4 (\bar{x} =2.879 nmol, SD=0.012, p =0.033) y HC+BX12 (\bar{x} =2.851 nmol, SD=0.003, p =0.030) en contraste con el grupo HC (\bar{x} =1.484 nmol, SD=0.021) (Figura 8B).

Finalmente, la determinación de MDA en los grupos hipertróficos tratados con BX (HC+BX6.4: \bar{x} =0.093 nmol/mg, SD=0.022; HC+BX12: (\bar{x} =0.098 nmol/mg, SD=0.020; HC+BX100: \bar{x} =0.096 nmol/mg, SD=0.025) no presentaron cambios significativos en relación a los grupos CTR (\bar{x} =0.086 nmol/mg, SD=0-016) y HC (\bar{x} =0.111 nmol/mg, SD=0.012) (Figura 8C).

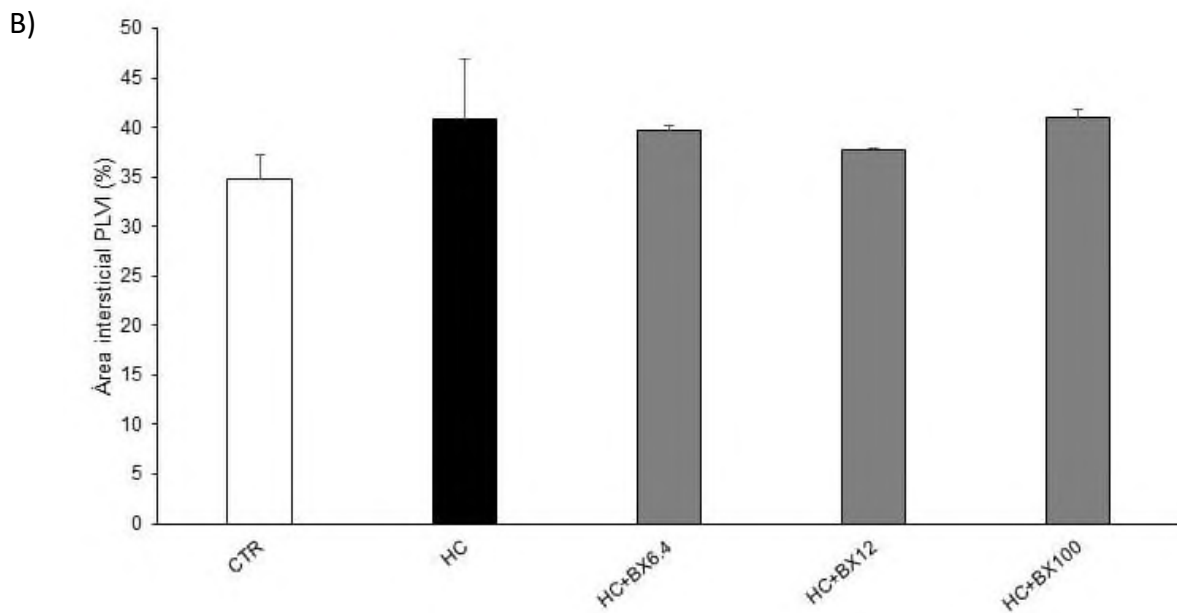
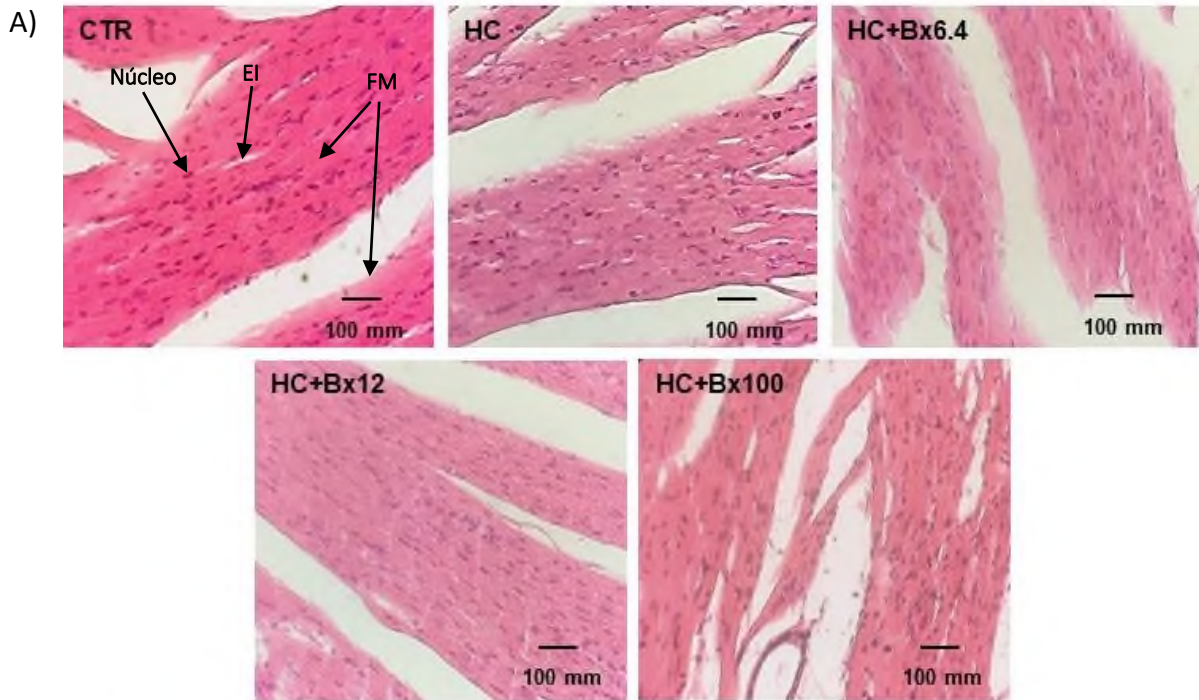


Figura 7 El tratamiento a fetos de ratón con diferentes concentraciones de bórax tiende a mitigar el desarrollo de fibrosis intersticial ocasionado por el estímulo hipertrófico. A) Micrografías representativas de corte transversal del ventrículo izquierdo de los preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, 40x, las barras corresponden a 1 μ m. B) Cuantificación porcentual del área intersticial. Abreviaturas: PLVI: pared libre del ventrículo izquierdo, EI: espacio intersticial, FM: fibra muscular, CTR= grupo control, HC= grupo hipertrófico, HC+Bx6.4= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, Bx12= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y Bx= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes dicho análisis no mostró diferencias significativas.

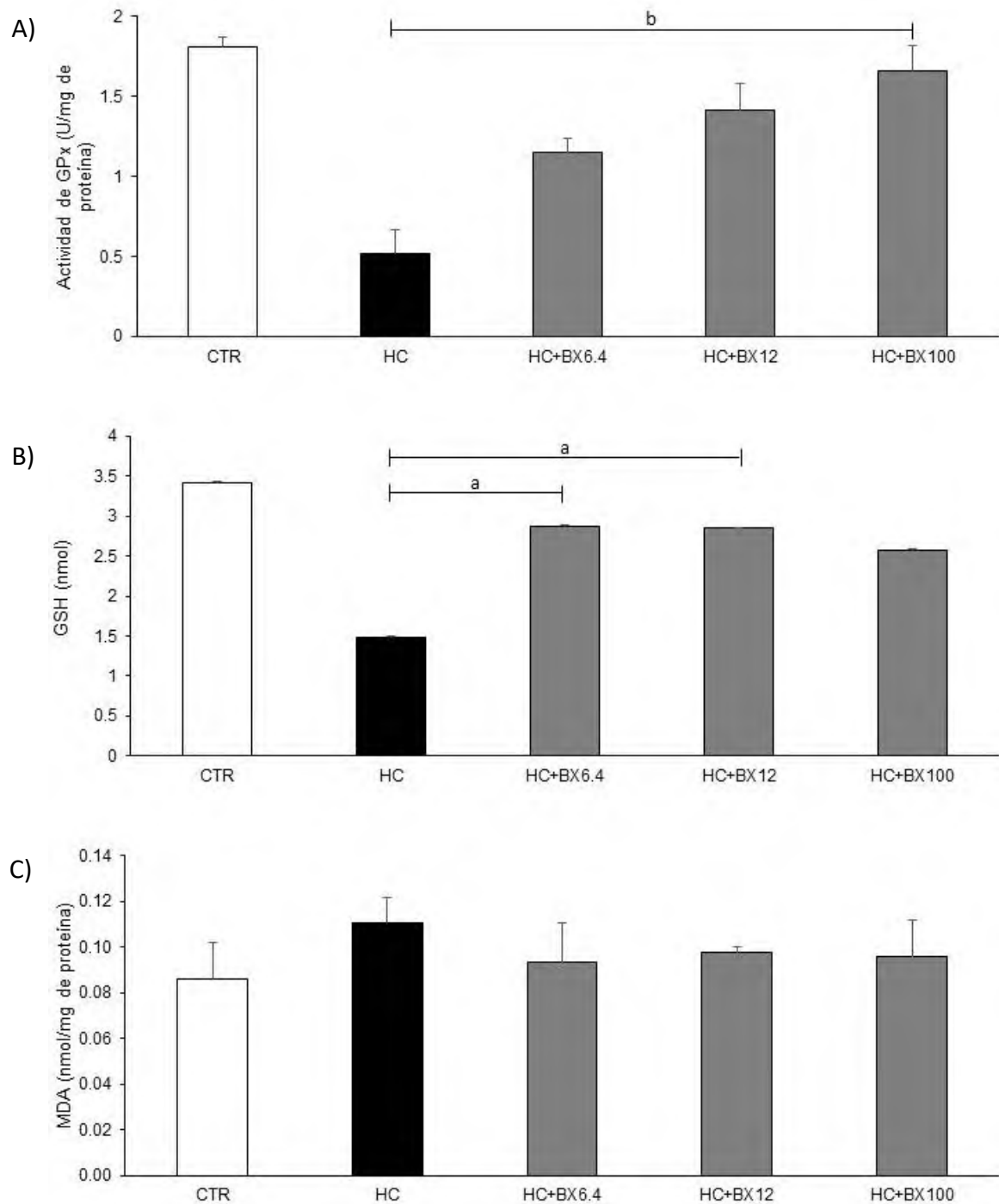


Figura 8 Parámetros de estrés oxidativo de individuos hipertróficos tratados con bórax durante la etapa fetal. A) Actividad de la enzima GPx, B) concentración de GSH, C) concentración de MDA. Abreviaturas: GPx= enzima glutatión peroxidasa, GSH= glutatión reducido, MDA= malondialdehído, CTR= grupo control, HC= grupo hipertrófico, HC+BX6.4= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, BX12= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y BX100= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente.

9.2.4 Efecto del bórax sobre los genes de respuesta temprana, tardía y genes de daño cardiaco reguladores de la hipertrofia cardiaca.

Interesantemente en las crías con corazón hipertrófico tratados con 6.4 y 100 mg/kg de BX la expresión de los ARNm *c-jun* y *c-myc* decayeron significativamente respecto al grupo HC. Mientras que incrementaron los niveles de expresión del mensajero de *c-fos* en los grupos que recibieron 6.4 y 12 mg/kg de BX sin ser significativos.

Por lo que respecta a los genes de respuesta tardía, los niveles de expresión de los mensajeros GATA-4 y Mef2c decayeron significativamente en los tres grupos hipertróficos tratados con BX. En contraste, los niveles de expresión de NFAT incrementaron significativamente en los tres grupos de estudio en relación al CTR e inclusive se observaron valores superiores a los determinados en el grupo HC.

Finalmente, la expresión del mensajero de ANP decayó en los grupos hipertróficos tratados con 6.4 y 100 mg/kg de BX, pero su expresión nunca alcanzó los niveles basales. En cambio, la expresión del BNP incrementó significativamente en los grupos hipertróficos tratados con 6.4 y 12 mg/kg de BX en relación a los niveles basales del grupo CTR e inclusive superando los niveles de expresión del grupo HC.

Los análisis de correlación de Spearman sugieren que la expresión del mensajero de *c-fos* está relacionado negativamente con la circunferencia del corazón ($\rho=-1.000$, $p=0.020$), mientras que la expresión del ARNm de Mef2c regula negativamente la amplitud QRS ($\rho=-1.000$, $p=0.017$), pero los niveles de expresión de NFAT se correlacionaron directamente con la amplitud QRS ($\rho=1$, $p=0.004$) y la LVI ($\rho=0.999$, $p=0.032$) en el grupo HC+BX6.4.

Por otro lado, la expresión del mensajero de BNP está fuertemente asociada con la LVI ($\rho=0.998$, $p=0.044$), mientras que la expresión de MDA y GPx se correlacionaron directamente con los mensajeros de GATA-4 ($\rho=-0.998$, $p=0.040$) y Mef2c ($\rho=1.000$, $p=0.000$) respectivamente, en el grupo HC+BX12.

Por último, la función cardiaca regula negativamente la PLVI ($\rho=-0.920$, $p=0.027$); mientras que la PLVI correlaciona directamente con la circunferencia cardiaca ($\rho=0.891$, $p=0.043$), además, la expresión de *c-jun* tiene una relación negativa con la LVI ($\rho=-0.998$, $p=0.036$) y la expresión de GATA-4 se asocia de forma negativa con *c-myc* ($\rho=-0.997$, $p=0.046$) en el grupo HC+BX100.

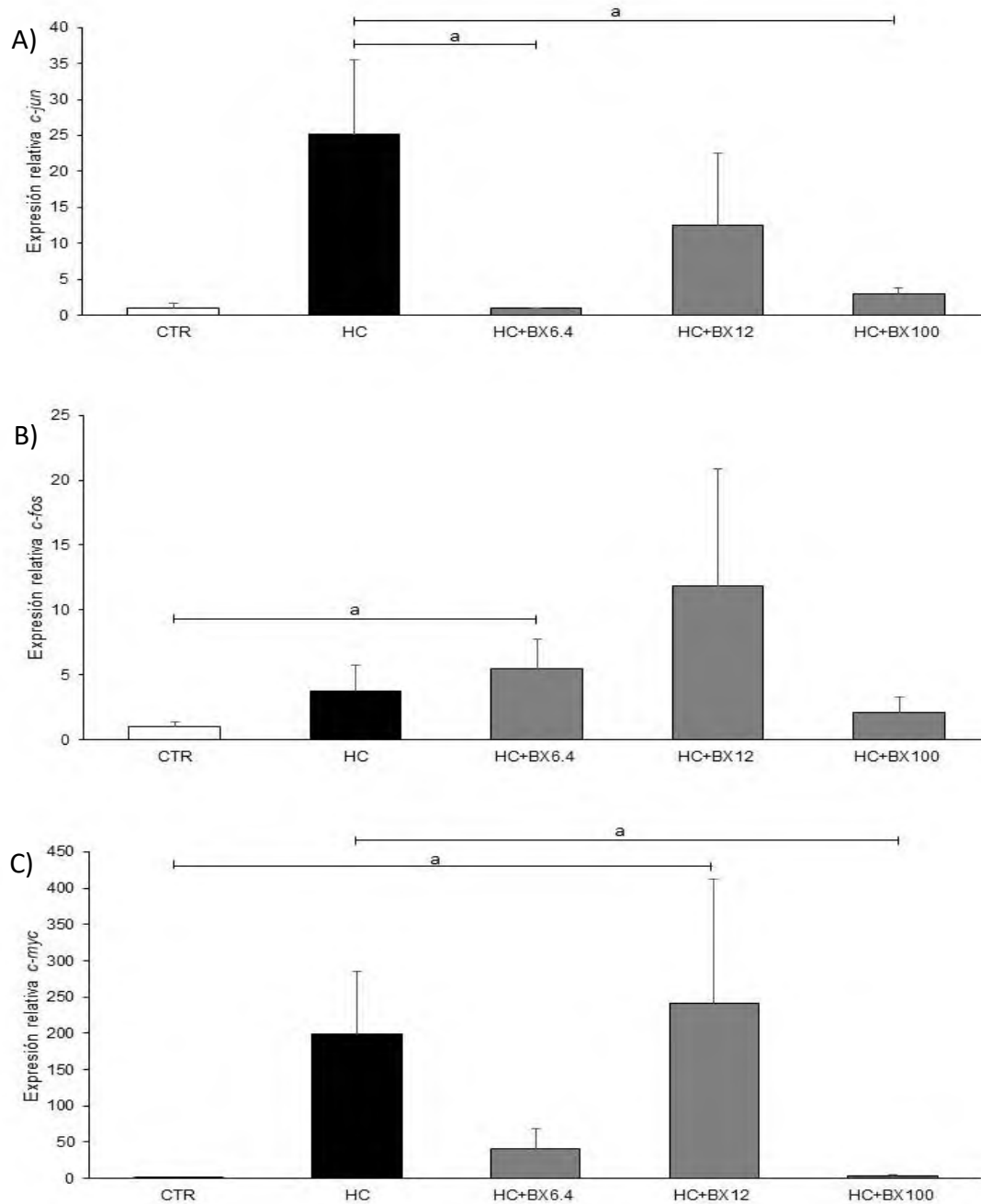


Figura 9 Expresión de genes de respuesta temprana involucrados con el desarrollo de la hipertrofia cardiaca ventricular izquierda en ratones hipertróficos de 6 semanas de edad que fueron tratados con bórax durante la etapa fetal. A) Expresión relativa del ARNm del gen c-jun. B) Expresión relativa del ARNm del gen c-fos. C) Expresión relativa del ARNm del gen c-myc. Abreviatura: CTR= grupo control, HC: grupo hipertrófico, HC+BX6.4: grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, HC+BX12= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y HC+BX100= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Los valores del grupo CTR se establecen con un valor de 1. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente.

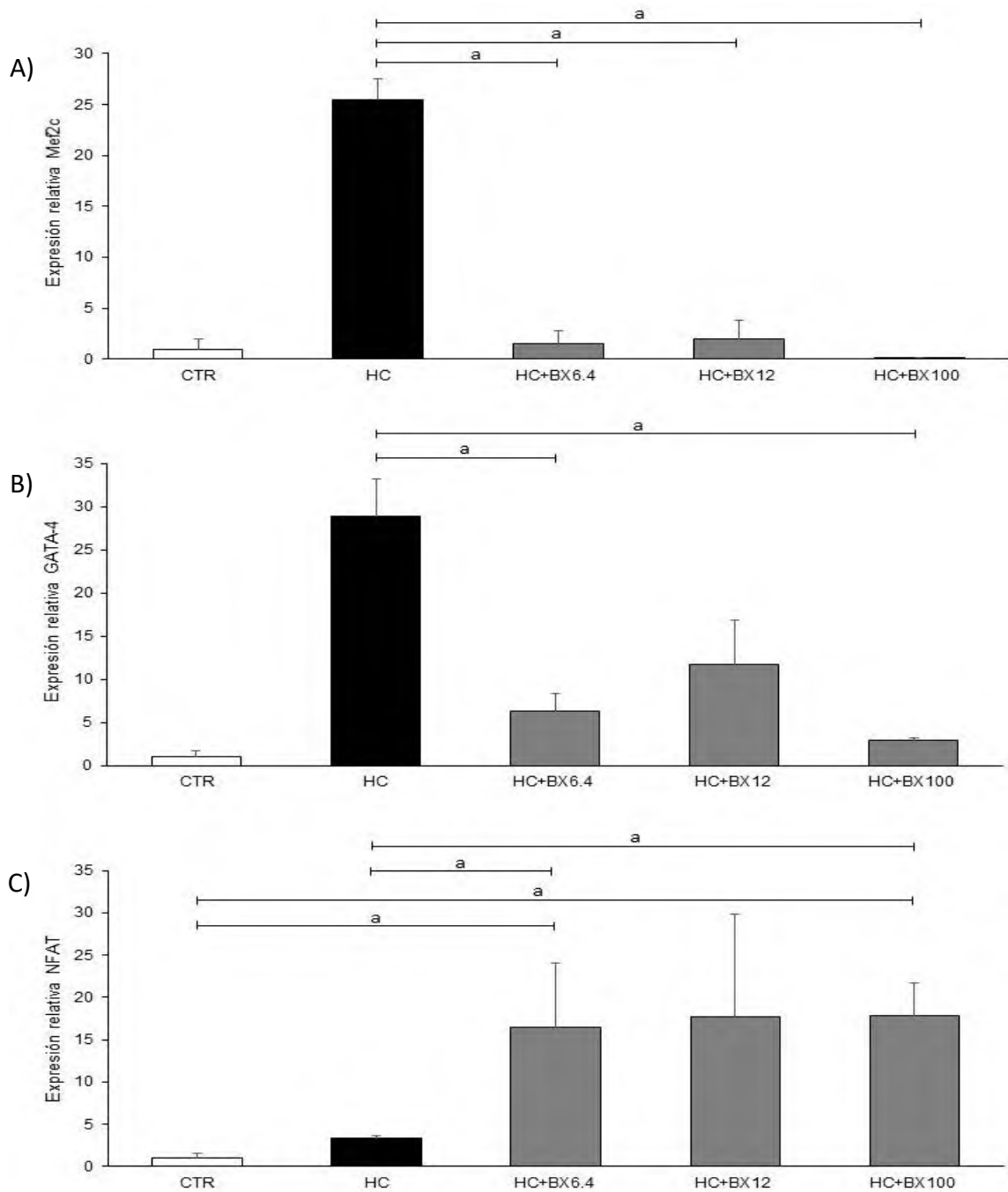


Figura 10 Expresión de genes de respuesta tardía determinados en el corazón de ratones hipertroficados de 6 semanas de edad que fueron tratados con bórax durante la etapa fetal. A) Expresión relativa del ARNm del gen Mef2c, B) Expresión relativa del ARNm del gen GATA-4, C) Expresión relativa del ARNm del gen NFAT. Abreviaturas: Mef2c= Factor potenciador de miocitos 2c, GATA-4= Proteína 4 de unión a GATA, NFAT= Factor nuclear de células T activadas, CTR= grupo control, HC= grupo hipertrofico, HC+BX6.4= grupo hipertrofico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, HC+BX12= grupo hipertrofico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y HC+BX100= grupo hipertrofico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Los valores del grupo CTR se establecen con un valor de 1. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, respectivamente.

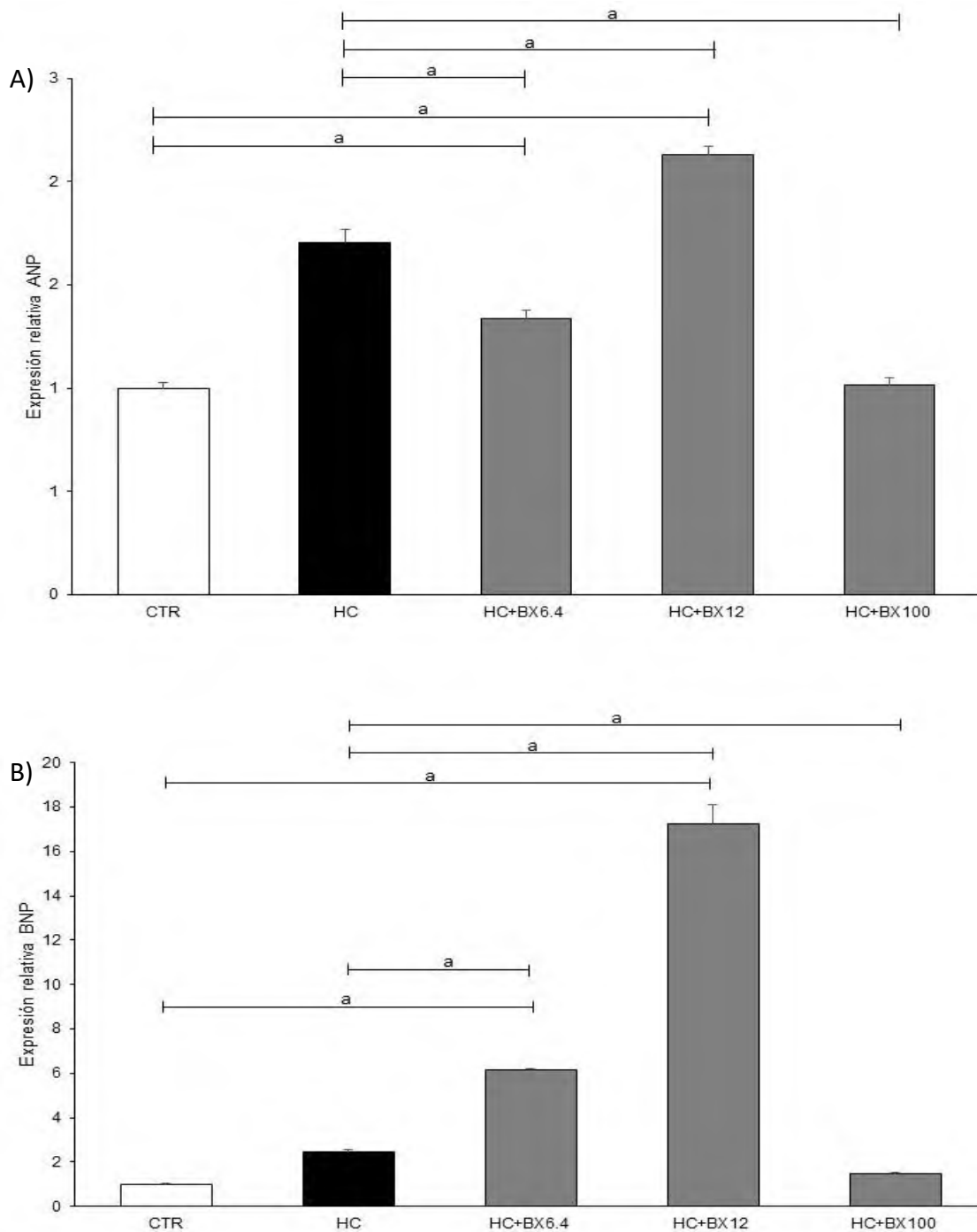


Figura 11 Expresión de marcadores de daño cardíaco en ratones hipertróficos de 6 semanas de edad que fueron tratados con bórax durante la etapa fetal. A) Expresión relativa de ANP, B) Expresión relativa de BNP. Abreviatura: ANP= péptido natriurético auricular, BNP= péptido natriurético tipo B. CTR= grupo control, HC: grupo hipertrófico, HC+BX6.4: grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 6.4 mg/kg, HC+BX12= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 12 mg/kg y HC+BX100= grupo hipertrófico que recibió el tratamiento con bórax en concentración de 100 mg/kg. Los valores del grupo CTR se establecen con un valor de 1. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente.

Tabla 6. Determinación de la relación entre las variables en los ratones hipertróficos tratados con bórax en concentración de 6.4 mg/kg.

Spearman *p≤0.05		GRUPO HC + BX6.4															
	FUNCIONALIDAD CARDIACA		ANATOMÍA			DAÑO CELULAR	GENES DE RESPUESTA TEMPRANA			GENES DE RESPUESTA TARDÍA			GENES DE DAÑO CARDIACO		ESTRÉS OXIDATIVO		
	FC	QRS	PLVI	LVI	CIR	EI	c-jun	c-fos	c-myc	MEF2C	GATA-4	NFAT	ANP	BNP	MDA	GSH	ACT. GPx
FC	1	-0.019	0.080	0.039	-0.281	-0.094	-0.533	-0.820	0.076	0.225	-0.648	-0.256	-0.794	-0.358	0.034	-0.875	-0.542
		0.976	0.898	0.950	0.646	0.881	0.642	0.388	0.952	0.856	0.551	0.835	0.416	0.767	0.956	0.052	0.635
QRS		1	0.757	-0.529	-0.003	-0.667	-0.685	0.760	-0.984	-1.000^a	0.899	1.000^b	0.787	0.994	-0.212	-0.188	0.949
			0.139	0.359	0.997	0.219	0.519	0.451	0.113	0.017	0.288	0.004	0.423	0.072	0.732	0.762	0.204
PLVI			1	-0.388	-0.411	-0.056	0.246	0.957	-0.380	-0.515	0.852	0.543	0.943	0.629	0.365	-0.016	0.775
				0.519	0.492	0.929	0.842	0.188	0.752	0.656	0.351	0.635	0.215	0.567	0.546	0.980	0.435
LVI				1	-0.657	0.192	-0.643	0.795	-0.973	-0.997	0.923	.999^a	0.820	.998^a	0.591	0.331	0.965
					0.228	0.756	0.555	0.414	0.149	0.053	0.252	0.032	0.387	0.036	0.294	0.586	0.168
CIRC					1	-0.238	0.016	-1.000^a	0.609	0.721	-0.959	-0.743	-.997^a	-0.810	-.900^a	-0.169	-0.914
						0.700	0.990	0.020	0.583	0.487	0.182	0.466	0.047	0.398	0.037	0.786	0.267
EI						1	0.994	0.062	0.733	0.622	-0.191	-0.596	0.020	-0.507	0.603	0.389	-0.319
							0.070	0.960	0.476	0.572	0.877	0.593	0.987	0.661	0.282	0.517	0.793
c-jun							1	-0.048	0.803	0.704	-0.298	-0.681	-0.090	-0.599	0.412	0.441	-0.421
								0.970	0.406	0.503	0.807	0.523	0.943	0.591	0.730	0.710	0.723
c-fos								1	-0.633	-0.743	0.968	0.764	.999^a	0.828	0.890	0.876	0.926
									0.563	0.467	0.162	0.447	0.027	0.378	0.301	0.321	0.247
c-myc									1	0.989	-0.808	-0.983	-0.666	-0.958	-0.212	-0.181	-0.879
										0.096	0.401	0.117	0.536	0.185	0.864	0.884	0.317

Continuación de la tabla 6.

Spearman *p≤0.05																	
GRUPO HC + BX6.4																	
	FUNCIONALIDAD CARDIACA		ANATOMÍA			DAÑO CELULAR	GENES DE RESPUESTA TEMPRANA			GENES DE RESPUESTA TARDÍA			GENES DE DAÑO CARDIACO		ESTRÉS OXIDATIVO		
	FC	QRS	PLVI	LVI	CIR	EI	c-jun	c-fos	c-myc	MEF2C	GATA-4	NFAT	ANP	BNP	MDA	GSH	ACT. GPx
MEF2C										1	-0.888	-.999^a	-0.770	-0.990	-0.357	-0.327	-0.941
											0.305	0.021	0.440	0.089	0.768	0.788	0.221
GATA-4											1	0.902	0.978	0.943	0.747	0.726	0.991
												0.284	0.135	0.216	0.463	0.483	0.084
NFAT												1	0.791	0.994	0.387	0.357	0.951
													0.419	0.068	0.747	0.767	0.200
ANP													1	0.851	0.870	0.854	0.941
														0.351	0.328	0.348	0.220
BNP														1	0.483	0.455	0.979
															0.679	0.699	0.132
MDA															1	0.438	0.653
																0.461	0.547
GSH																1	0.628
																	0.567
ACT.GPx																	1

Abreviaturas: FC= Frecuencia cardiaca, QRS= Intervalo QRS, PLVI= Pared libre del ventrículo izquierdo, LVI= Luz ventricular izquierda, CIRC= Circunferencia, EI= Espacio Intersticial, Genes de respuesta temprana= *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, Genes de respuesta tardía, ANP= Péptido natriurético auricular, BNP= péptido natriurético cerebral, MDA= Malondialdehído, GSH= Glutación, ACT. GPx= Actividad de la enzima glutación peroxidasa. Se empleó la prueba de correlación de Spearman. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente.

Tabla 7. Asociación entre las variables analizadas en los ratones hipertróficos tratados con bórax en concentración de 12 mg/kg.

Spearman *p≤0.05																	
GRUPO HC + BX12																	
	FUNCIONALIDAD CARDIACA		ANATOMÍA			DAÑO CELULAR	GENES DE RESPUESTA TEMPRANA			GENES DE RESPUESTA TARDÍA			GENES DE DAÑO CARDIACO		ESTRÉS OXIDATIVO		
	FC	QRS	PLVI	LVI	CIRC	EI	<i>c-jun</i>	<i>c-fos</i>	<i>c-myc</i>	MEF2C	GATA-4	NFAT	ANP	BNP	MDA	GSH	ACT. GPx
FC	1	-0.821	-0.595	-0.244	0.248	0.388	0.800	-0.975	-0.938	-0.991	0.206	-0.168	0.465	-0.850	-0.023	0.430	-0.991
		0.088	0.290	0.692	0.687	0.519	0.410	0.141	0.226	0.088	0.868	0.893	0.692	0.353	0.971	0.470	0.087
QRS		1	0.674	-0.305	-0.432	-0.166	0.277	-0.646	-0.958	-0.708	-0.426	-0.728	-0.162	-0.996	0.054	-0.537	-0.708
			0.213	0.618	0.468	0.789	0.821	0.553	0.185	0.499	0.720	0.481	0.896	0.059	0.931	0.351	0.499
PLVI			1	-0.433	-0.497	-0.787	-0.805	0.492	-0.063	0.417	-0.996	-0.895	-0.982	-0.259	-0.013	0.038	0.417
				0.466	0.395	0.114	0.404	0.673	0.960	0.726	0.054	0.294	0.122	0.833	0.983	0.952	0.726
LVI				1	0.414	0.017	-0.300	0.664	0.964	0.724	0.404	0.712	0.139	.998 ^a	-0.022	-0.034	0.725
					0.489	0.979	0.806	0.538	0.170	0.484	0.735	0.496	0.911	0.044	0.972	0.957	0.484
CIRC					1	0.351	-0.977	0.804	0.349	0.751	-0.875	-0.636	-0.974	0.157	0.815	0.611	0.751
						0.563	0.137	0.405	0.773	0.459	0.321	0.561	0.145	0.900	0.093	0.274	0.459
EI						1	0.953	-0.994	-0.771	-0.981	0.516	0.165	0.730	-0.630	0.183	-0.314	-0.981
							0.197	0.072	0.439	0.125	0.655	0.895	0.479	0.566	0.768	0.607	0.126
<i>c-jun</i>							1	-0.912	-0.541	-0.875	0.752	0.457	0.903	-0.364	-0.709	-0.954	-0.875
								0.268	0.636	0.322	0.459	0.698	0.283	0.763	0.498	0.194	0.322
<i>c-fos</i>								1	0.838	0.996	-0.416	-0.053	-0.648	0.714	0.358	0.748	0.996
									0.367	0.054	0.727	0.966	0.551	0.494	0.767	0.462	0.054
<i>c-myc</i>									1	0.881	0.148	0.501	-0.128	0.980	-0.209	0.264	0.881
										0.314	0.906	0.666	0.918	0.127	0.866	0.830	0.314

Continuación de la tabla 7.

Spearman *p≤0.05																	
GRUPO HC + BX12																	
	FUNCIONALIDAD CARDIACA		ANATOMÍA			DAÑO CELULAR	GENES DE RESPUESTA TEMPRANA			GENES DE RESPUESTA TARDÍA			GENES DE DAÑO CARDIACO		ESTRÉS OXIDATIVO		
	FC	QRS	PLVI	LVI	CIRC	EI	<i>c-jun</i>	<i>c-fos</i>	<i>c-myc</i>	MEF2C	GATA-4	NFAT	ANP	BNP	MDA	GSH	ACT. GPx
MEF2C										1	-0.338	0.031	-0.582	0.770	0.279	0.689	1.000 ^c
											0.781	0.980	0.604	0.441	0.820	0.516	0.000
GATA-4											1	0.930	0.962	0.340	-0.998 ^a	-0.915	-0.338
												0.239	0.176	0.779	0.040	0.265	0.781
NFAT												1	0.795	0.662	-0.951	-0.703	0.032
													0.415	0.540	0.200	0.504	0.980
ANP													1	0.071	-0.943	-0.990	-0.582
														0.955	0.216	0.089	0.605
BNP														1	-0.398	0.069	0.770
															0.739	0.956	0.440
MDA															1	0.580	0.278
																0.305	0.821
GSH																1	0.689
																	0.516
ACT.GPx																	1

Abreviaturas: FC= Frecuencia cardiaca, QRS= Intervalo QRS, PLVI= Pared libre del ventrículo izquierdo, LVI= Luz ventricular izquierda, CIRC= Circunferencia, EI= Espacio Intersticial, Genes de respuesta temprana= *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, Genes de respuesta tardía, ANP= Péptido natriurético auricular, BNP= péptido natriurético cerebral, MDA= Malondialdehído, GSH= Glutatión, ACT. GPx= Actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Se empleó la prueba de correlación de Spearman. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ respectivamente.

Tabla 8. Relación entre las variables analizadas en los ratones hipertróficos tratados con bórax en concentración de 100 mg/kg.

Spearman *p≤0.05		Grupo HC+BX100															
	FUNCIONALIDAD CARDIACA		ANATOMÍA			DAÑO CELULAR	GENES DE RESPUESTA TEMPRANA			GENES DE RESPUESTA TARDÍA			GENES DE DAÑO CARDIACO		ESTRÉS OXIDATIVO		
	FC	QRS	PLVI	LVI	CIRC	EI	<i>c-jun</i>	<i>c-fos</i>	<i>c-myc</i>	MEF2C	GATA-4	NFAT	ANP	BNP	MDA	GSH	ACT. GPx
FC	1	-.976^b	0.821	0.222	0.635	0.140	0.216	0.756	-0.968	-0.538	0.983	0.709	0.602	0.440	-0.305	0.140	-0.469
		0.005	0.088	0.719	0.250	0.822	0.861	0.454	0.162	0.638	0.117	0.498	0.589	0.710	0.618	0.823	0.689
QRS		1	-.920^a	-0.206	-0.726	-0.256	-0.249	-0.778	0.959	0.567	-0.977	-0.685	-0.575	-0.410	0.423	-0.224	0.498
			0.027	0.739	0.165	0.678	0.840	0.432	0.184	0.617	0.138	0.520	0.610	0.731	0.477	0.717	0.668
PLVI			1	0.254	.891^a	0.546	0.345	0.837	-0.925	-0.647	0.950	0.608	0.490	0.316	-0.452	0.185	-0.583
				0.681	0.043	0.341	0.775	0.368	0.248	0.552	0.202	0.584	0.674	0.796	0.444	0.766	0.604
LVI				1	0.453	0.658	-.998^a	-0.768	-0.093	0.919	0.021	0.581	0.691	0.815	0.652	-0.715	0.947
					0.443	0.227	0.036	0.443	0.941	0.259	0.987	0.605	0.515	0.393	0.233	0.175	0.207
CIRC					1	0.823	-0.187	-0.736	0.975	0.513	-0.988	-0.730	-0.626	-0.467	-0.095	-0.225	0.442
						0.087	0.880	0.473	0.143	0.657	0.097	0.479	0.569	0.691	0.879	0.716	0.709
EI						1	-0.628	-0.968	0.755	0.857	-0.800	-0.322	-0.185	0.005	0.256	-0.514	0.812
							0.568	0.161	0.456	0.345	0.410	0.791	0.882	0.997	0.678	0.375	0.396
<i>c-jun</i>							1	0.802	0.037	-0.939	0.035	-0.535	-0.649	-0.781	-0.925	0.829	-0.964
								0.407	0.976	0.223	0.978	0.641	0.550	0.429	0.249	0.378	0.172
<i>c-fos</i>								1	-0.567	-0.958	0.624	0.075	-0.067	-0.254	-0.969	.999^a	-0.932
									0.616	0.184	0.571	0.952	0.957	0.836	0.158	0.029	0.235
<i>c-myc</i>									1	0.308	-.997^a	-0.864	-0.784	-0.653	0.346	-0.528	0.231
										0.800	0.046	0.336	0.426	0.547	0.775	0.646	0.852

Continuación de la tabla 11.

Spearman *p≤0.05		Grupo HC+BX100															
	FUNCIONALIDAD CARDIACA		ANATOMÍA			DAÑO CELULAR	GENES DE RESPUESTA TEMPRANA			GENES DE RESPUESTA TARDÍA			GENES DE DAÑO CARDIACO		ESTRÉS OXIDATIVO		
	FC	QRS	PLVI	LVI	CIRC	EI	<i>c-jun</i>	<i>c-fos</i>	<i>c-myc</i>	MEF2C	GATA-4	NFAT	ANP	BNP	MDA	GSH	ACT. GPx
MEF2C										1	-0.376	0.213	0.349	0.520	.999 ^a	-0.971	0.997
											0.755	0.864	0.773	0.652	0.026	0.155	0.051
GATA-4											1	0.826	0.738	0.596	-0.413	0.588	-0.300
												0.382	0.472	0.593	0.729	0.600	0.806
NFAT												1	0.990	0.945	0.173	0.029	0.291
													0.090	0.211	0.889	0.982	0.812
ANP													1	0.982	0.311	-0.113	0.423
														0.121	0.799	0.928	0.722
BNP														1	0.485	-0.299	0.587
															0.678	0.807	0.601
MDA															1	-.941 ^a	0.993
																0.017	0.077
GSH																1	-0.948
																	0.206
ACT.GPx																	1

Abreviaturas: FC= Frecuencia cardiaca, QRS= Intervalo QRS, PLVI= Pared libre del ventrículo izquierdo, LVI= Luz ventricular izquierda, CIRC= Circunferencia, EI= Espacio Intersticial, Genes de respuesta temprana= *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, Genes de respuesta tardía, ANP= Péptido natriurético auricular, BNP= péptido natriurético cerebral, MDA= Malondialdehído, GSH= Glutatión, ACT. GPx= Actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Se empleó la prueba de correlación de Spearman. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La significancia se encuentra simbolizada por las letras a, b y c las cuales son significativas a una $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, o, $p \leq 0.001$ respectivamente.

10 Discusión.

Los compuestos de boro como el BX y el ácido bórico, son los principales componentes de la industria de alimentos como conservante, la industria química por su función antiséptica y fungicida, en agroquímica mezclado con bromacilo o clorato de sodio funcionan como insecticida, en la fabricación de textiles y se ha sido usado terapéuticamente como enjuague bucal para el tratamiento de úlceras aftosas y estomatitis (NCBI, 2023). Recientemente se ha informado sobre su función antioxidante (Ince et al., 2010). El boro es un metaloide esencial, que tiene una función clave en el metabolismo de plantas y animales. Diversos estudios destacan que el boro está involucrado en la mineralización ósea (Medrano-David et al., 2021; Rico et al., 2015), además se utiliza en la química sintética y recientemente su potencial se ha explorado en la química médica como biomateriales para la reparación muscular (Turkez et al., 2012). Algunos autores señalan que el BX es un agente natural útil y eficaz para la prevención y el tratamiento temprano de la toxicidad por acrilamida (AA) en peces, la AA es un compuesto que se usa en industrias del papel, tintes y plásticos (Atamanalp et al., 2022).

10.1 La suplementación del bórax y su efecto cardiotóxico indirecto.

Hasta el momento no existen en la literatura estudios sobre la suplementación del BX en animales gestantes que valoren sus efectos en el corazón de crías de 6 semanas. Por ello, nuestro grupo de trabajo evaluó tres diferentes concentraciones de BX, con la finalidad de determinar su beneficio o actividad nociva para la salud.

Se ha reportado que la suplementación de BX tiene diferentes efectos según la dosis. Trabajos pioneros realizado por Conn et al. (1955) destacaron anomalías temporales de tipo hipóxico, que se reflejaron por cambios en los segmentos S-T y las ondas T del ECG en pacientes con tumores cerebrales, después de la administración de BX en un rango de concentración de 32-50 mg/kg de peso corporal por vía intravenosa. En contraste, otros autores refirieron que la suplementación de 30 mg de boro/L en agua puede tener efectos benéficos sobre los tejidos mineralizados en un modelo animal de obesidad, que presenta estrés inflamatorio constante (Hakki et al., 2021). Por su parte Hazman et al. (2018), revelaron que la administración de 200 mg/kg de ácido bórico o BX disminuyen la inflamación y el estrés oxidativo causados por cisplatino, pero aumentan el estrés del retículo endoplásmico (RE). Estos autores sugieren que los escasos efectos antiapoptóticos, antiinflamatorio y antioxidante, dependen de la dosis de borato. Es decir, a mayor concentración

de BX mejor respuesta celular. En contraste, nuestros resultados revelaron que la suplementación oral de BX a 6.4 mg/kg durante la gestación, no altera la funcionalidad cardiaca en las crías de 6 semanas, pero sí indujo la remodelación del VI, con pérdida de la organización fibrilar. Mientras, que la administración oral de 100 mg/kg de BX, no tiene efectos adversos en el corazón de las crías, ya que no alteró la morfología cardiaca ni se observó daño celular. Es importante mencionar que ambas concentraciones, favorecieron la expresión de los ARNm de BNP y ANP en el corazón de las crías de 6 semanas. Lo cual permite suponer daño cardiaco, ya que BNP y ANP son indicadores del desarrollo de insuficiencia cardiaca (Alejandro Salomone, 2002), que posiblemente se refleje con cambios morfológicos del corazón a edades avanzadas. Por lo que se sugiere prolongar los estudios hasta etapas posteriores. En cuanto al grupo que recibió la suplementación de 12 mg/kg de BX no presentaron remodelación del VI, ni la presencia de fibrosis intersticial, tampoco se favoreció la expresión de los ARNm de BNP y ANP, sin embargo, presentaron incremento en la circunferencia total del corazón. Por lo que se sugiere realizar técnicas para identificar si se presenta incremento en la proliferación celular.

10.2 Participación del bórax en la mitigación de la respuesta hipertrófica.

En el contexto de regeneración del tejido muscular, recientemente se ha descrito un efecto dosis dependiente de la actividad del boro en la diferenciación miogénica de células madre derivadas de tejido adiposo humano (hADSC) (Apdik et al., 2015). Por otro lado, se ha señalado que 4 mg/kg/7 días de boro induce proliferación celular de los cardiomiocitos favoreciendo la regeneración del tejido cardíaco, veintiún días después de una lesión miocárdica en ratón adulto. Destacando que no solo se observó una mejora significativa en las funciones sistólica y diastólica, también redujo la fibrosis miocárdica y la apoptosis en los corazones lesionados (Bouchareb et al., 2020). Por el contrario, en nuestros resultados el BX estimula un crecimiento excesivo de todo el corazón hipertrófico. Además, se mantiene la desorganización fibrilar con focos de fibrosis intersticial (daño celular). A pesar, de observar ligeras mejoras sobre la funcionalidad cardiaca en crías que recibieron indirectamente alguna de las tres concentraciones de BX. Por tanto, estos datos nos permiten suponer que el BX estimula la proliferación del cardiomiocito, pero no es capaz de inhibir el daño celular. Probablemente el impacto del BX sobre el tejido es dependiente no solo de la concentración, si no del momento de la administración. En relación a esto Hernández-Gutiérrez et al. (2020) demostraron que BX puede actuar como cardioprotector

cuando se realiza un pretratamiento. Es decir, el BX puede prevenir el daño celular inducido por ISO en cardiomiocitos (efecto cardioprotector), al aumentar la tasa de proliferación e inhibir la apoptosis. En cambio, cuando el BX se adiciona simultáneamente con el ISO, solo atenúa el daño celular al reducir la tasa de proliferación, pero no inhibe la apoptosis.

Se ha demostrado que el mecanismo de acción del ISO está ligado a la activación de los receptores alfa y beta adrenérgicos (Novak et al., 2012), estos regulan la vía de las MAPK, y con ellos a los factores de respuesta temprana (*c-myc*, *c-jun* y *c-fos*) y respuesta tardía (GATA-4, Mef2c y NFAT) (Melaku & Desalegn, 2019).

Nosotros revelamos que la administración de BX afecta negativamente la expresión de *c-jun*, *c-myc*, GATA-4 y Mef2c, pero esta reducción no fue suficiente para mitigar el daño celular, debido a que la HVI es un proceso caracterizado por la multiplicidad de vías que se activan y se interconectan entre sí, vías como la p38 (MAPK), ERK y JNK, de las cuales, la proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK) es esencial para la activación del NFAT (Zhang et al., 2020). Al desfosforilar la CaN a NFAT este se libera y transloca al núcleo del cardiomiocito, donde media la transcripción de numerosos genes involucrados en el crecimiento hipertrófico (Melaku & Desalegn, 2019). Al parecer en el corazón hipertrófico de las crías de 6 semanas que recibieron BX en diferentes concentraciones, se favoreció el incremento gradual del mensajero de NFAT. Por otro lado, en cuanto a los mecanismos responsables de la activación de la vía CaN/NFAT se propone que la modulación de la amplitud y la frecuencia de la señal está mediada por el calcio que desencadena la activación de CaN (Pitt, 2009). Rico et al. (2015) demostró que el BX tiene un papel esencial como bloqueador o quelante de Ca^{2+} en mioblasto de rata. Por lo que su uso en biomembranas favorece la regeneración muscular. Pese a que nosotros no evaluamos Ca^{2+} en el corazón hipertrófico de las crías tratadas con BX, hipotetizamos que los aniones de borato introducidos en el tejido reducen la concentración de Ca^{2+} liberado por el retículo sarcoplásmico, ya que los reportes del EGG, sugieren una mejora en la funcionalidad cardiaca principalmente al emplear la concentración de 12 mg/kg de BX. Al parecer, la actividad de la vía CaN/NFAT, es suficiente para mantener el estímulo hipertrófico, que podría ser regulada por p38. Por ello, proponemos en futuros trabajos medir la concentración de Ca^{2+} e inhibir la actividad de p38 MAPK con la finalidad de mitigar el daño.

En este estudio demostramos que, sin importar la concentración de BX, los niveles de expresión de *c-fos* incrementan en el corazón hipertrófico de las crías. La proteína *c-fos* se heterodimeriza con proteínas de la familia jun, generando así el factor de transcripción AP-1, que regulan la expresión de genes blanco involucrados en eventos de proliferación celular (Wang et al., 2016). Generalmente *c-fos* no es un componente constitutivo de las células, pero su expresión es rápida y transitoriamente inducida en respuesta a estímulos tales como factores de crecimiento, neurotransmisores e hipertrofia, hasta el momento se ha descrito que *c-fos* tiene una función dual, puede activar la diferenciación o proliferación celular (Windak et al., 2013). Estos antecedentes nos permiten sugerir que el aumento del ARNm de *c-fos* podría favorecer la proliferación y, por lo tanto, estar ligado al crecimiento total del corazón hipertrófico. Sin embargo, es necesario determinar en futuros estudios la tasa de proliferación y el crecimiento del cardiomiocito, ya que los resultados morfológicos no solo revelan un incremento de la PLVI, sino que además muestran ganancia en la circunferencia del corazón, es decir una macrosomía general. Este proceso ya fue reportado en los estudios de cultivo de cardiomiocitos de ratón tratados con BX (Hernández-Gutiérrez et al., 2020).

Por otro lado, algunos autores señalan que el BX no es un antioxidante (Alak, Parlak, et al., 2019), pero su mecanismo de acción se ha asociado con la reducción del estrés oxidativo en diversos organismos y tejidos de adultos. Al respecto, Yeltekin et al. (2022) revelaron que el BX mitiga la neurotoxicidad inducida por ferroceno en el cerebro de peces. Mientras que en hígado de peces, el BX tiene un efecto paliativo sobre la toxicidad inducida por cobre y podría usarse como antídoto en la nutrición de los peces (Alak, Yeltekin, et al., 2019). Además, en los tejidos branquiales y hepáticos de trucha arco iris, el BX mejora el mecanismo de defensa antioxidante en respuesta a metales pesados (Alak, Parlak, et al., 2019). Por lo que respecta a los mamíferos, el tratamiento con BX protege la médula espinal contra lesiones en un modelo de isquemia/reperfusión de rata y mejora el resultado neurológico (Koc et al., 2015). Mediante la administración oral de BX a ratones hembras gestantes previamente tratados con ISO vía intraperitoneal, demostramos que, en las crías hipertróficas de 6 semanas, las tres concentraciones de BX empleadas favorecieron gradualmente el incremento en la actividad de GPx y GSH; mientras decayeron ligeramente los niveles MDA, esto demostró la reducción del estrés oxidativo. Claramente, en el corazón hipertrofiado de las crías de 6 semanas, la inhibición

del estrés oxidativo por el BX, no fue suficiente para revertir el daño inducido durante la gestación con el ISO. Pues los niveles de expresión de BNP y ANP nunca alcanzaron los niveles basales. Por tanto, el conjunto de resultados presentados en este trabajo, sugieren que el BX podría ser un excelente candidato administrado vía oral durante el embarazo cuando exista el riesgo de desarrollar HVI fetal, debido a que el BX mitiga parcialmente la hipertrofia inducida durante la gestación, al mejorar la contractibilidad, reducir el estrés oxidativo y estimular la proliferación, no obstante, el mecanismo de daño hipertrófico es sostenido por la expresión de los ARNm de c-fos, NFAT y BNP.

11 Conclusiones.

1. La suplementación con BX a 6.4 y mg/kg durante la gestación, no altera la funcionalidad cardiaca. Sin embargo, induce remodelación del ventrículo izquierdo, con pérdida de la organización fibrilar e incrementa los niveles de expresión del ARNm de BNP y ANP, indicadores del daño cardiaco.
2. La suplementación con BX a 12 mg/kg durante la gestación podría ser benéfica para el corazón ya que no presenta indicio de insuficiencia cardiaca a nivel molecular debido a que la expresión de BNP y ANP se encuentran en niveles basales, sin embargo, presenta incremento en el tamaño del corazón sin daño en la organización fibrilar lo que se puede relacionar con aumento en la proliferación celular.
3. La administración de 100 mg/kg de BX no modifica la morfología cardiaca y tampoco induce daño celular, pero presenta daño cardiaco al incrementar los niveles de expresión del ARNm de BNP y ANP, lo que indica el desarrollo de insuficiencia cardiaca en edades avanzadas.
4. Las tres concentraciones de BX administradas en las crías durante la gestación, reducen el estrés oxidativo en el corazón hipertrófico.
5. La administración de BX mitiga la expresión de los genes de respuesta temprana *c-jun* y *c-myc*, así como los factores de transcripción GATA-4 y mef2c. Sin embargo, el mecanismo hipertrófico se mantiene por la vía CaN/NFAT.

12 Perspectivas.

A partir de la discusión generada en esta investigación las perspectivas de futuros trabajos se enlistan a continuación con la finalidad de complementar este primer estudio *in vivo* y poder resolver las dudas generadas.

1. Evaluar mediante fluorescencia la alteración del Ca^{2+} en el musculo cardiaco utilizando el reactivo Furo-2 AM (Thermo Fisher, EE.UU), con la finalidad de corroborar si las altas concentraciones de Ca^{2+} mantienen activa la vía de señalización CaN/NFAT.
2. Medir por fluorescencia utilizando la sonda Aglutinina de germen de trigo (*por sus siglas en ingles* WGA, Invitrogen, USA) la circunferencia del cardiomiocito con ayuda del programa Image J, con la finalidad de identificar el aumento del tamaño celular o la existencia de proliferación.
3. Cuantificar apoptosis celular mediante la técnica de marcado final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (*por sus siglas en inglés* TUNEL) lo que nos ayudaría a confirmar el motivo de la alta producción de colágeno en el grupo BX6.4.
4. Determinar el estado en que se encuentra la proteína p38 MAPK, fosforilada o no fosforilada, con ayuda de la técnica de Western Blot. Con esto nos permitiría confirmar que esta proteína mantiene activa la vía de señalización CaN/NFAT.
5. Cuantificar la expresión relativa del ARNm del gen AP-1 mediante RT-qPCR en tiempo real, como causa probable de proliferación celular.
6. Analizar el efecto del Bx en órganos como hígado y riñones, realizando los estudios antes mencionados de apoptosis y proliferación celular por fluorescencia para observar si existen posibles daños citotóxicos causados en estos tejidos celulares debido a la metabolización del BX.

13 Referencias bibliográficas

- Alak, G., Parlak, V., Yeltekin, A., Ucar, A., Çomaklı, S., Topal, A., . . . Türkez, H. (2019). The protective effect exerted by dietary borax on toxicity metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 216, 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.10.005>
- Alak, G., Yeltekin, A., Uçar, A., Parlak, V., Türkez, H., & Atamanalp, M. (2019). Borax Alleviates Copper-Induced Renal Injury via Inhibiting the DNA Damage and Apoptosis in Rainbow Trout. *Biol Trace Elem Res*, 191(2), 495-501. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1622-5>
- Alejandro Salomone, Ó. (2002). Los péptidos natriuréticos en la insuficiencia cardíaca: mejorando el diagnóstico y el manejo del síndrome. *Revista española de cardiología*, 55(1), 4-6. <https://www.revespcardiol.org/es-los-peptidos-natriureticos-insuficiencia-cardiaca-articulo-13024713>
- Almazán-Ávila, M. A. (2020). Cardiovascular risk factors in young Mexican adults. *Archivos de cardiología de México*, 90, 427-435. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402020000400427&nrm=iso
- Apdik, H., Doğan, A., Demirci, S., Aydın, S., & Şahin, F. (2015). Dose-dependent Effect of Boric Acid on Myogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells (hADSCs). *Biol Trace Elem Res*, 165(2), 123-130. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0253-3>
- Atamanalp, M., Türkez, H., Yeltekin, A., Özgeriş, F. B., Ucar, A., Çağlar, Ö., . . . Alak, G. (2022). Borax relieved the acrylamide-induced hematotoxic, hepatotoxic, immunotoxic and genotoxic damages in rainbow trout by regulating apoptosis and Nrf2 signaling pathway. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 259, 109396. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109396>
- Aydın, T., Gönen, B., & Eseceli, H. (2018). Bor'un İnsan Sağlığı ve Beslenme Üzerine Etkisi. *SDU Journal of Health Science Institute/SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2).
- Bouchareb, R., Katz, M., Saadallah, N., Sassi, Y., Ali, S., & Lebeche, D. (2020). Boron improves cardiac contractility and fibrotic remodeling following myocardial infarction injury. *Sci Rep*, 10(1), 17138. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73864-w>
- Carlos, A. (2010). Guía de Práctica Clínica, Detección de Cardiopatías Congénitas en Niños Mayores de 5 años, Adolescentes y Adultos. *Gobierno Federal De México-Secretaría de Salud*.
- Carreño, J. E., Apablaza, F., Ocaranza, M. P., & Jalil, J. E. (2006). Hipertrofia cardíaca: eventos moleculares y celulares. *Revista española de cardiología*, 59(5), 473-486.
- Cervantes, C. A. D. (2019). Tendencia e impacto de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en México, 1990-2015. *Revista Cubana de Salud Pública*, 45(4), 1-18.
- Chorro, F. J., Such-Belenguer, L., & López-Merino, V. (2009). Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Revista española de cardiología*, 62(1), 69-84.
- Cinvestav, C. (2021, 16 de mayo). *Analizan efectos de sacarosa y fructuosa en desarrollo de hipertrofia cardíaca* <https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/analizan-efectos-de-sacarosa-y-fructuosa-en-desarrollo-de-hipertrofia-cardiaca>
- Conn, H. L., Jr., Antal, B. B., & Farr, L. E. (1955). The effect of large intravenous doses of sodium borate on the human myocardium as reflected in the electrocardiogram. *Circulation*, 12(6), 1043-1046. <https://doi.org/10.1161/01.cir.12.6.1043>
- D'Oría, R., Schipani, R., Leonardini, A., Natalicchio, A., Perrini, S., Cignarelli, A., . . . Giorgino, F. (2020). The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Del Olmo-Turrubiarte, A., Calzada-Torres, A., Díaz-Rosas, G., Palma-Lara, I., Sánchez-Urbina, R., Balderrábano-Saucedo, N. A., . . . Contreras-Ramos, A. (2015). Mouse models for the study of postnatal cardiac hypertrophy. *IJC Heart & Vasculature*, 7, 131-140. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352906715000202>

- Dong, B., Liu, C., Xue, R., Wang, Y., Sun, Y., Liang, Z., . . . Huang, H. (2018). Fisetin inhibits cardiac hypertrophy by suppressing oxidative stress. *J Nutr Biochem*, 62, 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.010>
- Dorn, G. W., 2nd, Robbins, J., & Sugden, P. H. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*, 92(11), 1171-1175. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000077012.11088.Bc>
- EFSA. (2006). Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals by the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies (NDA) and Scientific Committee on Food (SCF).
- Escudero, E. M., Pinilla, O. A., & Ennis, I. L. (2010). Remodelamiento ventricular izquierdo: conceptos y utilidad del ecocardiograma.
- Giraldo, A. (2010). Papel del estrés oxidativo y nitrosativo en la hipertrofia cardiaca y remodelación ventricular. *Acta Médica Colombiana*, 35(2), 82-95.
- Guadalajara Boo, J. F. (2007). Entendiendo la hipertrofia ventricular izquierda. *Archivos de cardiología de México*, 77(3), 175-180.
- Hakki, S. S., Götz, W., Dundar, N., Kayis, S. A., Malkoc, S., Hamurcu, M., . . . Nielsen, F. H. (2021). Borate and boric acid supplementation of drinking water alters teeth and bone mineral density and composition differently in rabbits fed a high protein and energy diet. *J Trace Elem Med Biol*, 67, 126799. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126799>
- Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., & Çelik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, 41(3), 1032-1048. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0756-0>
- Hernández-del Rio, J. E., Cárdenas, M. T. M., & Hernández-Flores, M. S. (2013). Miocardiopatía hipertrófica en el hijo de madre con diabetes. *Revista Medica MD*, 4(3), 152-158.
- Hernández-Gutiérrez, S., Roque-Jorge, J., López-Torres, A., Díaz-Rosas, G., García-Chequer, A. J., & Contreras-Ramos, A. (2020). Role of sodium tetraborate as a cardioprotective or competitive agent: Modulation of hypertrophic intracellular signals. *J Trace Elem Med Biol*, 62, 126569. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126569>
- Hernández, A., Duque, J., Rosales, W., & Lizcano, F. (2017). Perspectivas moleculares en cardiopatía hipertrófica: abordaje epigenético desde la modificación de la cromatina. *Revista Colombiana de Cardiología*, 24(2), 146-152.
- Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 24(3), 161-164. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.003>
- Koc, E. R., Gökce, E. C., Sönmez, M. A., Namuslu, M., Gökce, A., & Bodur, A. S. (2015). Borax partially prevents neurologic disability and oxidative stress in experimental spinal cord ischemia/reperfusion injury. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 24(1), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.07.037>
- Londoño Agudelo, E. (2017). Las enfermedades crónicas y la ineludible transformación de los sistemas de salud en América Latina. *Revista Cubana de Salud Pública*, 43, 68-74.
- Medrano-David, D., Lopera, A. M., Londoño, M. E., & Araque-Marín, P. (2021). Formulation and Characterization of a New Injectable Bone Substitute Composed PVA/Borax/CaCO₃ and Demineralized Bone Matrix. *J Funct Biomater*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/jfb12030046>
- Melaku, L. S., & Desalegn, T. (2019). Molecular mediators, characterization of signaling pathways with descriptions of cellular distinctions in pathophysiology of cardiac hypertrophy and molecular changes underlying a transition to heart failure. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 8(1), 1.
- Militaru, C., Donoiu, I., Craciun, A., Scorei, I. D., Bulearca, A. M., & Scorei, R. I. (2013). Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. *Nutrition*, 29(1), 178-183.

- Mogoşanu, G. D., Biţă, A., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Croitoru, O., Rău, G., . . . Scorei, R. I. (2016). Calcium Fructoborate for Bone and Cardiovascular Health. *Biol Trace Elem Res*, 172(2), 277-281. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0590-2>
- Morales, C., Hita, A., & Gelpi, R. J. (1999). Fisiología integrada de la hipertrofia cardíaca. *REVISTA ARGENTINA DE CARDIOLOGIA*, 67(3), 377-388.
- NCBI. (2023). *PubChem Compound Summary for CID 16211214, Borax* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Borax>
- Nielsen, F. H. (2014). Update on human health effects of boron. *J Trace Elem Med Biol*, 28(4), 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.06.023>
- Novak, A., Barad, L., Zeevi-Levin, N., Shick, R., Shtrichman, R., Lorber, A., . . . Binah, O. (2012). Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation. *J Cell Mol Med*, 16(3), 468-482. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01476.x>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- OMS. (2017). *Enfermedades cardiovasculares*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Pawa, S., & Ali, S. (2006). Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. *Chem Biol Interact*, 160(2), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.002>
- Pietrzkowski, Z., Mercado-Sesma, A. R., Argumedo, R., Cervantes, M., Nemzer, B., & Reyes-Izquierdo, T. (2018). Effects of once-daily versus twice daily dosing of calcium fructoborate on knee discomfort. A 90 day, double-blind, placebo controlled randomized clinical study. *J Aging Res Clin Pract*, 7(1), 31-36.
- Pitt, G. S. (2009). Calcineurin finds a new partner in the L-type Ca²⁺ channel. *Circ Res*, 105(1), 7-8. <https://doi.org/10.1161/circresaha.109.201236>
- Reyes-Izquierdo, T., Nemzer, B., Gonzalez, A. E., Zhou, Q., Argumedo, R., Shu, C., & Pietrzkowski, Z. (2012). Short-term intake of calcium fructoborate improves WOMAC and McGill scores and beneficially modulates biomarkers associated with knee osteoarthritis: a pilot clinical double-blinded placebo-controlled study. *Am J Biomed Sci*, 4(2), 111-122.
- Rico, P., Rodrigo-Navarro, A., & Salmerón-Sánchez, M. (2015). Borax-Loaded PLLA for Promotion of Myogenic Differentiation. *Tissue Eng Part A*, 21(21-22), 2662-2672. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0044>
- Ruiz-Hurtado, G., Morel, E., Domínguez-Rodríguez, A., Llach, A., Lezoualc'h, F., Benitah, J. P., & Gomez, A. M. (2013). Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 58, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.021>
- Sabri, A., Hughie, H. H., & Lucchesi, P. A. (2003). Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal*, 5(6), 731-740. <https://doi.org/10.1089/152308603770380034>
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zerouh, M., Schmack, B., Farag, M., . . . Weymann, A. (2016). Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res*, 22, 75-79. <https://doi.org/10.12659/msmbr.900437>
- Sánchez, A. H., del Castillo, J. G., Díaz, G. J., & Sánchez, F. M. (2014). Enfermedades cardiovasculares, respiratorias y renales. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(62), 3677-3690.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Scorei, R., Ciubar, R., Iancu, C., Mitran, V., Cimpean, A., & Iordachescu, D. (2007). In vitro effects of calcium fructoborate on fMLP-stimulated human neutrophil granulocytes. *Biol Trace Elem Res*, 118(1), 27-37. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0019-7>
- Scorei, R., Mitrut, P., Petrisor, I., & Scorei, I. (2011). A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the effect of calcium fructoborate on systemic inflammation and dyslipidemia markers for middle-aged people with primary osteoarthritis. *Biol Trace Elem Res*, 144(1-3), 253-263. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9083-0>
- Scorei, R. I., Ciofrangeanu, C., Ion, R., Cimpean, A., Galateanu, B., Mitran, V., & Iordachescu, D. (2010). In vitro effects of calcium fructoborate upon production of inflammatory mediators by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biol Trace Elem Res*, 135(1-3), 334-344. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8488-5>
- Scorei, R. I., & Rotaru, P. (2011). Calcium fructoborate--potential anti-inflammatory agent. *Biol Trace Elem Res*, 143(3), 1223-1238. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8972-6>
- Takimoto, E., & Kass, D. A. (2007). Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*, 49(2), 241-248. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000254415.31362.a7>
- Tejada López, M. E., Pustovrh, M. C., Salazar Monsalve, L., & Ortiz, M. A. (2018). Efectos de la obesidad materna sobre el patrón de apoptosis en la cardiogénesis tardía. *Entramado*, 14(1), 292-301.
- Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y., Weeks, K. L., & McMullen, J. R. (2015). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*, 89(9), 1401-1438. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1477-x>
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2006). *Principios de anatomía y fisiología/Principles of Anatomy and Physiology*. 11a Ed. Editorial Médica Panamericana.
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., & Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(6), H2181-2190. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011>
- Turkez, H., Geyiköglü, F., Dirican, E., & Tatar, A. (2012). In vitro studies on chemoprotective effect of borax against aflatoxin B1-induced genetic damage in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64(6), 607-612. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9454-1>
- Vitamins, E. G. o., & Minerals. (2003). *Safe upper levels for vitamins and minerals*. Food Standards Agency.
- Wang, S., Lu, J., You, Q., Huang, H., Chen, Y., & Liu, K. (2016). The mTOR/AP-1/VEGF signaling pathway regulates vascular endothelial cell growth. *Oncotarget*, 7(33), 53269-53276. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10756>
- Windak, R., Müller, J., Felley, A., Akhmedov, A., Wagner, E. F., Pedrazzini, T., . . . Ricci, R. (2013). The AP-1 transcription factor c-Jun prevents stress-imposed maladaptive remodeling of the heart. *PLoS One*, 8(9), e73294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073294>
- Yeltekin, A., Ucar, A., Parlak, V., Özgeriş, F. B., Türkez, H., Esenbuğa, N., . . . Alak, G. (2022). Borax exerts protective effect against ferrocene-induced neurotoxicity in *Oncorhynchus mykiss*. *J Trace Elem Med Biol*, 72, 126996. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126996>
- You, J., Wu, J., Zhang, Q., Ye, Y., Wang, S., Huang, J., . . . Zou, Y. (2018). Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314(3), H552-h562. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00212.2017>
- Zhang, Y., Cui, Y., Dai, S., Deng, W., Wang, H., Qin, W., . . . Guo, H. (2020). Isorhynchophylline enhances Nrf2 and inhibits MAPK pathway in cardiac hypertrophy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 393(2), 203-212. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01716-0>
- Zhao, L., Wu, D., Sang, M., Xu, Y., Liu, Z., & Wu, Q. (2017). Stachydrine ameliorates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by suppressing inflammation and oxidative stress through inhibiting NF-κB and JAK/STAT signaling pathways in rats. *Int Immunopharmacol*, 48, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.002>