

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

“Evaluación del efecto de Bórax en cultivo primario de
miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

JORGE LUIS ROQUE JORGE

Director: Dr. Adolfo López Torres

Codirectora: Dra. Alejandra Contreras Ramos

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2018

Copia de acta de revisión de tesis.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC


ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 24 de septiembre de 2018 a las 16 hr, 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 **"Evaluación del efecto de bórax en cultivo primario de miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico"** presentada por el alumno **Jorge Luis Roque Jorge**, con número de matrícula 12090353, aspirante al título 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 el aspirante puede proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 24 de septiembre de 2018

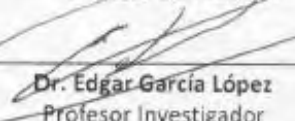
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



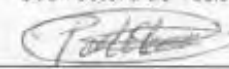
Dr. Adolfo López Torres
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



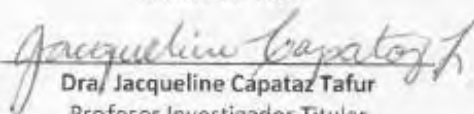
Dra. Alejandra Contreras Ramos
Investigadora en Ciencias Médicas
Hospital Infantil de México "Federico Gómez"
Codirectora de Tesis




Dr. Edgar García López
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis




Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador Titular
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis




Dra. Guadalupe Diaz Rosas
Químico "A"
Hospital Infantil de México "Federico Gómez"
Revisor de Tesis



Dr. Salomón Hernández Gutiérrez
Profesor Investigador
Universidad Panamericana
Revisor de Tesis

Copia de oficio de autorización de tesis.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de octubre de 2018
Oficio No. JCIB/009/10/2018

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

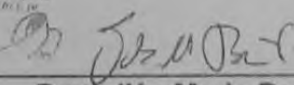
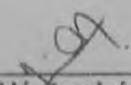
Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Jorge Luis Roque Jorge** titulado "**Evaluación del efecto de bórax en cultivo primario de miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado 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. Edgar García López (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Salomón Hernández Gutiérrez (Vocal, Universidad Panamericana)
- Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dra. Guadalupe Díaz Rosas (Segundo Suplente, Hospital Infantil de México "Federico Gómez")

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

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

 Dr. Julián Mario Peña Castro Jefe de Carrera de Ingeniería en Biotecnología Universidad del Papaloapan	 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. Dra. Alejandra Contreras Ramos, Co-directora de tesis. Para su conocimiento
c.c.p. Jorge Luis Roque Jorge, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Hoja de originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado por 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.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo en conjunto de los:

Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), Ciudad de México.

Laboratorio de Cultivo Celular y Biología Molecular, Universidad Panamericana (UP), Ciudad de México.

Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca.

Agradezco a los Bioterios del HIMFG y UP por facilitar a los roedores necesarios para la realización de los experimentos.

Agradezco a mi Co-Asesora Dra. Alejandra Contreras Ramos del Hospital infantil de México Federico Gómez y a mi Asesor Dr. Adolfo López Torres de la Universidad del Papaloapan por aceptarme como su alumno, por sus valiosas enseñanzas y por todo el apoyo en la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Salomón Hernández Gutiérrez de la Universidad Panamericana por aceptarme en su laboratorio y por siempre apoyarme en todo lo que requería para realizar mis experimentos adecuadamente.

Agradezco a mi comité revisor por sus comentarios y sugerencias.

Este proyecto fue financiado por fondos internos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo el número de proyecto HIM/2014/045 SSA 1131 el cual incluye los códigos de ética a seguir de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Dedicatoria.

A mis amados padres y mis héroes. Papá Gerardo y mamá Lucrecia.

A mis amados hermanos y sobrinos. Daniel, Fer, Elvia, Carlos; Ivonne, Steven, Pancho, Lupita, Brandon y Gertrudis.

A mis abuelos. Petra, Miguel y Josefa.

A mis familiares. En especial a Gaby, Luz, Moñongo, Juany, Isma, Negro, tío chucho, tía Faby.

A mi comunidad de fe, Bethesda. En especial a Jahir, Alfredo, Adri, Fátima, Josías, Pas Cesar, David, Davidzin; a mis hnos de la CDMX: Mike, Uri, Jeremy, José Luis.

A mis asesores. Dra. Alejandra Contreras, Dr. Adolfo López, Dr. Salomón Hdz.

A mis q amigos de laboratorio. Dra. Guadalupe, Elisa, Víctor, Diego, Janeth, Esme, Las Dianis, Logan, Rick, Lucy.

A mis profesores de toda la carrera. En especial a la Dra. Nelda, Dra. Sandra, Dra. Laura, Dr. Abad, Dr. Aurelio, Dr. Julián, Dra. Blanca, Dr. Fabrisio, Dr. Edgar, Dr. Paul, Dra. Jacquie, Dr. Lemuel, Dr. Omar, M.C Luis, Lic. Silvester.

A mis estimados compañeros de generación. Biotecnología 2012-2017. Betzy, Mafer, Frank, Nuria, May, Abi, José, David, Samuel, Fernando, Celenia, Sosa, Magda y Cris.

Sin todos ustedes jamás hubiese podido lograrlo, sus consejos, asesorías, apoyo, amistad, comprensión y amor me bastó para siempre seguir y dar mi mejor esfuerzo. Las palabras no alcanzan para expresar mi agradecimiento. Dios los bendiga y haga resplandecer su luz sobre ustedes, los amo.

Al único y sabio Dios.

“Bendito eres Dios, Señor mío. Tuya es, oh Señor, la magnificencia y el poder, la gloria, la victoria y el honor; porque todas las cosas que están en el cielo y en la tierra son tuyas. Tuyo, oh Dios, es el reino, y tú eres excelso sobre todos. Las riquezas y la gloria proceden de ti, y tú dominas sobre todo.” Crónicas 29:10-12.

Muchas gracias.

Resumen.

La hipertrofia cardiaca patológica (HC) es el incremento del volumen celular del corazón que provoca la disminución de la capacidad de volumen de los ventrículos. La HC se da en respuesta al estrés en el tejido cardiaco y se caracteriza por la expresión de genes de respuesta temprana tales como *c-Fos*, *c-Myc*, *c-Jun*; y genes de etapa tardía como GATA4, MEF2c, Nkx2-5 entre otros, encargados de dirigir la expresión de α y β -miosina, proteínas estructurales del sarcómero, el cual aumenta considerablemente el volumen celular. El estrés oxidativo provocado por la liberación de radicales libres conlleva a un daño progresivo al ADN, incrementando la apoptosis y producción excesiva de fibrosis, procesos que superan la capacidad de regeneración intrínseca del corazón. La HC es considerada un marcador de mal pronóstico por ser causa de insuficiencia cardiaca y como consecuencia de mortalidad prematura en hombres, mujeres e infantes. Hasta el momento no existe tratamiento preventivo, o que active el proceso de regeneración, los tratamientos existentes no están enfocados en restablecer la homeostasis del corazón; aunque los trasplantes de corazón son la mejor opción, son muy costosos y por lo tanto poco accesibles. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del Bórax (BX) en cultivo primario de miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico. Para ello se evaluó *in vitro* el efecto cardioprotector y/o competitivo del BX sobre el miocito, tratado con isoproterenol (ISO), cuantificando el incremento de tamaño celular, la tasa de proliferación, la apoptosis, la expresión de genes de respuesta temprana a la hipertrofia (*c-Myc*, *c-Jun* y *c-Fos*) por RT-qPCR y la inmunexpresión de los factores de transcripción GATA-4, MEF2c, NFAT, NKx2-5. Se encontró que los miocitos al ser tratados con BX antes del ISO disminuyeron su crecimiento acelerado, favoreciendo su actividad mitótica y reduciendo la apoptosis, mientras que el gen *c-Myc* se sobre expresó, *c-Fos* y *c-Jun* se reprimieron; se elevó la expresión de los factores GATA4, NKx2-5 y NFAT. Por otro lado, en la administración en paralelo de BX e ISO, se minimizó el daño hipertrófico en el miocito, evitó el crecimiento acelerado y se inhibió la apoptosis, hubo una respuesta tardía en la expresión de *c-Myc* y *c-Jun*, que se correlaciona con la presencia tardía de los factores GATA4, MEF2c y NKx2-5. Por lo que se concluye que el BX tiene un efecto protector y benéfico ante el estímulo hipertrófico causado por ISO en cultivo de miocitos.

Palabras clave: Hipertrofia Cardiaca, cardioprotector, Bórax, Isoproterenol.

Abstract

Pathological cardiac hypertrophy (HC) is the increase in the heart's cellular volume that causes the decrease in the volume capacity of the ventricles. HC occurs in response to stress in cardiac tissue and is characterized by the expression of early response genes such as c-Fos, c-Myc, c-Jun; and late-stage genes such as GATA4, MEF2c, Nkx2-5, among others, responsible for directing the expression of α and β -myosin, structural proteins of the sarcomere, which increases cell volume. Oxidative stress caused the release of free radicals leads to a progressive damage to DNA, increasing apoptosis and excessive production of fibrosis, processes that exceed the capacity of intrinsic regeneration of the heart. HC is considered a marker of poor prognosis due to the cause of heart failure and because of premature mortality in men, women and infants. So far there is no preventive treatment, or that active regeneration process, treatments are not focused on the homeostasis of the heart; Although heart transplants are the best option, they are very expensive and therefore not very accessible. The objective of the present work was to evaluate the effect of Borax (BX) in primary culture of myocytes subjected to a hypertrophic stimulus. To this end, the cardioprotective and / or competitive effect of BX on the myocyte, treated with isoproterenol (ISO), was evaluated in vitro, evaluating the increase in cell size, the proliferation rate, apoptosis, and the expression of early-response genes. hypertrophy (c-Myc, c-Jun and c-Fos) by RT-qPCR and immunoexpressing of the transcription factors GATA-4, MEF2c, NFAT, NKx2-5. It was found that myocytes when treated with BX before ISO decreased their growth, their mitotic activity was favored and reduced to apoptosis, while the Myc-gene was over expressed, c-Fos and c-Jun were repressed; the expression of the factors GATA4, Nkx2-5 and NFAT is elevated. On the other hand, in the parallel administration of BX and ISO, minimized hypertrophic damage in the myth, prevented the increase and inhibition of apoptosis, late and late in the expression of C-Myc and c-Jun, which correlates with the late presence of GATA4, MEF2c and Nkx2-5 factors. Therefore, it is concluded that BX has a protective and beneficial effect against the hypertrophic stimulus caused by ISO in culture of myocytes

Key words: Cardiac Hypertrophy, cardioprotective, Borax, Isoproterenol.

Índice de contenido.

1.	Introducción.	1
2.	Antecedentes.....	2
2.1.	Corazón.....	2
2.2.	Enfermedades cardiovasculares.	2
2.3.	Hipertrofia cardiaca.	3
2.4.	Modificación del sarcómero en la HC.....	4
2.5.	Vías de señalización.	4
2.6.	Eventos epigenéticos en la HC.....	7
2.7.	Tratamiento en la HC.....	8
2.8.	Compuestos de boro.....	9
2.9.	Cultivo celular.	11
2.10.	Inducción de Hipertrofia Cardiaca <i>in-vitro</i>	11
3.	Justificación.	12
4.	Hipótesis.	13
5.	Objetivos.....	13
5.1.	Objetivo principal.....	13
5.2.	Objetivos secundarios.....	13
6.	Materiales y Métodos.....	14
6.1.	Aislamiento y cultivo de miocitos <i>in vitro</i>	15
6.2.	Evaluación de las concentraciones de bórax en cultivo primario de miocitos.....	15
6.3.	Inducción de hipertrofia cardiaca en cultivo primario de miocitos con isoproterenol.	16
6.4.	Ensayos de cardioprotección y competitivo en cultivo primario de miocitos.....	16
6.5.	Tinción por hematoxilina y eosina y análisis morfométrico.	16
6.6.	Inmunofluorescencia	17
6.7.	Extracción de ARN.....	18
6.8.	Síntesis de ADNc	18
6.9.	Análisis de expresión mediante qPCR tiempo real.	19
6.10.	Análisis estadístico.....	20
7.	Resultados y Discusión.	21
7.1.	Efecto del bórax sobre cultivos primarios de miocitos.....	21

7.1.1.	Análisis de la proliferación/viabilidad de los miocitos en cultivo primario tratados con BX.	21
7.1.2.	Análisis del incremento de tamaño de los miocitos en cultivo primario tratados con BX. ...	26
7.1.3.	Análisis histológico de los miocitos en cultivo primario tratados con BX.....	27
7.2.	Inducción de hipertrofia cardiaca en cultivos primarios de miocitos.....	28
7.2.1.	Análisis de la proliferación/viabilidad de miocitos en cultivo primario tratados con ISO.	28
7.2.2.	Análisis del incremento de tamaño de los miocitos en cultivo primario tratados con ISO. ...	33
7.2.3.	Análisis histológico de los miocitos en cultivo primario tratados con ISO.....	34
7.3.	Análisis <i>in vitro</i> del ensayo de Cardioprotección en miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico.	35
7.3.1.	Tasa de proliferación vs apoptosis en miocitos.	35
7.3.2.	Análisis <i>in vitro</i> del incremento de tamaño de los miocitos.	37
7.3.3.	Análisis histológico.	37
7.3.4.	Análisis de expresión de genes de respuesta temprana a la HC.....	38
7.3.5.	Análisis de factores de transcripción de respuesta tardía a la HC.	40
7.4.	Análisis <i>in vitro</i> del ensayo competitivo en miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico.	46
7.4.1.	Tasa de proliferación vs apoptosis en miocitos.	46
7.4.2.	Análisis del incremento de tamaño de los miocitos.	46
7.4.3.	Análisis histológico.	47
7.4.4.	Análisis de expresión de genes de respuesta temprana a la HC.....	47
7.4.5.	Análisis de factores de transcripción de respuesta tardía a la HC.	48
8.	Conclusiones.....	53
9.	Perspectivas.....	54
10.	Referencias.	55
11.	Anexos.	a
I.	Soluciones:	a
I.I.	PBS 1X.	a
I.II.	Paraformaldehído 4% en PBS 1X.	a
I.III.	Medio de cultivo (DME+SFB 10% + AB 1x).	a
I.IV.	Disolución de Bórax.....	b
I.V.	Disolución de isoproterenol.	b

I.VI. Disolución de Isoproterenol 10 μ M más Bórax 13 μ M (ensayo competitivo)	c
I.VII. Disoluciones para Hematoxilina - Eosina	c
II. Técnicas.....	d
II.1 H-E Tinción de Hematoxilina Eosina.....	d
II.2 Disgregación celular de la placa de cultivo.....	e
II.3 Conteo de células con cámara de Neubauer.....	e
II.4 Ensayo de apoptosis por TUNEL.....	f

Índice de figuras.

Figura 1. Esquema de los patrones principales de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica que las origina..... 4

Figura 2. Vías de señalización en la respuesta hipertrófica del miocito ante un estímulo hipertrófico..... 6

Figura 3. Diagrama experimental. 14

Figura 4. Condiciones del termociclador..... 19

Figura 5. Análisis de proliferación y viabilidad de miocitos tratados con BX..... 22

Figura 6. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 24 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μ M de BX..... 23

Figura 7. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 48 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μ M de BX..... 24

Figura 8. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 72 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μ M de BX..... 25

Figura 9. Micrografías de cultivo de miocitos tratados con 13, 26 Y 39 μ M de BX a 24, 48 y 72 h de exposición..... 27

Figura 10. Análisis de proliferación y viabilidad de miocitos tratados con ISO..... 29

Figura 11. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 24 h a las concentraciones de 5, 10 y 15 μ M de ISO..... 30

Figura 12. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 48 h a las concentraciones de 5, 10 y 15 μ M ISO..... 31

Figura 13. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 72 h a las concentraciones de 5, 10 y 15 μ M de ISO..... 32

Figura 14. Micrografías de cultivo de miocitos tratados con 5, 10 y 15 μ M de ISO a 24, 48 y 72 h de exposición..... 34

Figura 15. Análisis de proliferación y apoptosis en miocitos en ensayos cardioprotector y competitivo..... 36

Figura 16. Micrografías de cultivo de miocitos de ensayo cardioprotector y competitivo. 38

Figura 17. Análisis de la expresión de marcadores de respuesta temprana en miocitos en ensayo cardioprotector y competitivo. 39

Figura 18. Análisis de la expresión de marcadores de respuesta tardía en miocitos en ensayos cardioprotector y competitivo. 41

Figura 19. Análisis de la expresión de GATA4/MEF2c por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. 42

Figura 20. Análisis de la expresión de NKx2-5/NFAT por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados..... 43

Figura 21. Análisis de la expresión de Miogenina/CDK9 por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. 44

Figura 22. Análisis de la expresión de GATA4/MEF2c por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados..... 49

Figura 23. Análisis de la expresión de NKx2-5/NFAT por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. 50

Figura 24. Análisis de la expresión de Miogenina/CDK9 por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados..... 51

Índice de tablas.

Tabla 1. Descripción de ensayos cardioprotector y competitivo	16
Tabla 2 Proceso celular determinada por anticuerpos	17
Tabla 3. Secuencia de iniciadores de ratón.....	19
Tabla 4. Valores de tamaño de los miocitos cultivados in vitro con diferentes concentraciones de BX.....	26
Tabla 5. Valores de tamaño de los miocitos cultivados in vitro con diferentes concentraciones de ISO.....	33
Tabla 6. Valores de tamaño de los miocitos cultivados in vitro en ensayos cardioprotector y competitivo.....	37

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc	ADN de cadena complementaria.
ARN	Ácido Ribonucleico.
Ask-1	Quinasa 1 reguladora de señal de apoptosis.
BA	Ácido Bórico
BX	Bórax
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulina Proteíncinasa II.
CAT	Catalasa.
CO₂	Dióxido de Carbono.
COL	Colemanite.
Csl	Chisel.
Csx/Nkx2-5	Factor de Trascrición de Homeobox Cardíaco Csx/Nkx2-5.
DAG	Diacilglicerol.
DMEM	Medio Mínimo Esencial de Dulbecco Modificado.
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
EROS	Especies reactivas de oxígeno.
GPCR	Receptores Acoplados a Proteína G.
Gq	Proteína de transmembrana tipo q.
GSH	Glutación.
GSH-Px	Glutación peroxidasa.
GSK-3	Cinasa Glucógeno Sintasa.
HC	Hipertrofia Cardíaca.
HDAC	Histona Deacetilasas.
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato.
ISO	Isoproterenol.
MAPKs	Proteínas activadas por mitógenos.
MDA	Malondialdeído.
MMPs	Metaloproteasas.
mTOR	Diana de Rapamicina de Células T.
NFAT	Factor Nuclear y Activador de Células T.
pb	Pares de bases.
PBS	Tampón Fosfato Salino.
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación.
PKC	Proteíncinasa C.
rpm	Revoluciones por minuto.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SOD	Superóxido dismutasa.
SRF	factor de Respuesta al Suero.
TGSH	Glutación total.
UX	Ulexita.

1. Introducción.

La hipertrofia cardiaca patológica (HC) se define como un aumento absoluto de la masa ventricular, caracterizado por una ganancia de 200 g arriba de la masa normal (250 g en mujeres 300 g en hombres), lo que representa un incremento en tamaño del 60%; Aunque las células musculares cardiacas constituyen sólo el 30% del tejido cardiaco, éstas ocupan el 70% de la masa total del corazón y debido a que estas células aumentan de tamaño al inicio de la patología tienen una influencia considerable sobre el peso final del corazón [1]. La HC es la antesala de la insuficiencia cardiaca seguido de la muerte súbita, por tanto es considerada uno de los principales problemas de salud pública, que puede desencadenarse en personas que presentan enfermedades como cardiopatías congénitas, obesidad, hipertensión, diabetes y trastornos renales entre otros [1]. La HC se puede desarrollar debido a estímulos hemodinámicos prolongados, hormonales, oxidativos etc. A pesar de conocer algunos de los factores que están involucrados en el desarrollo de la HC, no ha sido posible encontrar un tratamiento oportuno que permita revertir o prevenir el desarrollo de esta patología y que se utilice como profilaxis en poblaciones vulnerables.

Debido a la carencia de estudios sobre el posible papel benéfico del BX en el corazón, en este trabajo se analizó su efecto en cultivo in vitro de miocitos en tratamientos de protección y competitivos a la exposición al isoproterenol (ISO), un compuesto inductor de la HC [2].

2. Antecedentes.

2.1. Corazón.

El corazón es un órgano muscular de contracción involuntaria, compuesto de 4 cámaras cardíacas, las cuales son: en la parte superior la aurícula derecha e izquierda y en la parte inferior los ventrículos derecho e izquierdo, las cuatro cavidades se encuentran divididas por el tabique [3].

El corazón es considerado el órgano más importante del sistema circulatorio, su función es bombear el componente sanguíneo hacia todo el organismo a través de lo que se conoce como ciclo cardíaco, conformado por dos procesos simultáneos denominados sístole y diástole. La sístole es la fase en el que el músculo cardíaco se contrae, bombeando así la sangre hacia la arteria pulmonar y la aorta. Mientras que la diástole consiste en la relajación del corazón, permitiendo que las 4 cámaras cardíacas sean llenadas del líquido sanguíneo provenientes de las venas cavas y venas pulmonares. [3].

Un mal funcionamiento tanto del ciclo cardíaco o del corazón, así como de los otros componentes del sistema circulatorio (venas, arterias, vasos sanguíneos, etc.) conducen al desarrollo de algunas enfermedades cardiovasculares severas [4].

2.2. Enfermedades cardiovasculares.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos de los vasos sanguíneos y del corazón. Actualmente ocupan el primer lugar de muertes ocasionadas en el mundo, y representan el 30 % de las bajas registradas, superando a casi el doble de las ocasionadas por el cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes. Se prevé que para el 2030, 6.7 millones de habitantes morirán por alguna enfermedad cardiovascular, además de que seguirá siendo la principal causa de muerte [4].

Las enfermedades cardiovasculares afectan principalmente a países desarrollados, sin embargo en países de ingreso bajo y medio, ocupan el 80% del total de defunciones ocasionadas por este

tipo de patología, además afectan casi por igual a hombres, mujeres, ancianos e incluso infantes [4].

Las enfermedades cardiovasculares de mayor morbilidad y mortalidad son: hipertensión arterial, cardiopatía coronaria (infarto al miocardio), enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita, miocardiopatías, la hipertrofia cardíaca (HC), entre otras [4].

2.3. Hipertrofia cardíaca.

La hipertrofia se define como un incremento del volumen celular, cuando este ocurre en el corazón, este se conoce como HC y se caracteriza por el engrosamiento del miocardio, lo que conlleva en una disminución del volumen de recepción de los ventrículos [5].

La HC es considerada como una respuesta adaptativa del corazón debido a diversos tipos de estímulos. Dependiendo del estímulo podemos establecer dos tipos de hipertrofias: fisiológica y patológica (Figura 1). La HC fisiológica o excéntrica se caracteriza por el crecimiento a lo largo del miocito cardíaco como respuestas a estímulos no hemodinámicos no prolongados, tal es el caso en el embarazo o la práctica de actividad física intensa; en este tipo de hipertrofia no hay fibrosis o daño celular, por lo que el corazón puede regresar a su estado normal cuando el estímulo desaparece [1]. En contraste, la HC Patológica o concéntrica se distingue a nivel anatómico por el incremento en la masa ventricular, principalmente en ventrículo izquierdo y tabique interventricular, cabe señalar que en esta patología existe un daño progresivo, debido a los focos de apoptosis generados por el crecimiento excesivo de los miocitos.

La HC patológica responde a estímulos como hipertensión arterial, estenosis aórtica, hipotiroidismo, valvulopatías, trastornos hormonales y trastornos metabólicos (diabetes y obesidad), por lo cual, es considerada un marcador de mal pronóstico, ya que en la mayoría de los pacientes se detecta hasta que su calidad de vida disminuye (insuficiencia cardíaca) y culmina en muerte súbita [6]. Entre los síntomas más generales en los pacientes con HC son: el

dolor torácico, disnea, palpitaciones, síncope, y, con poca frecuencia, arritmias, fibrilación auricular y taquicardia ventricular [5-8].

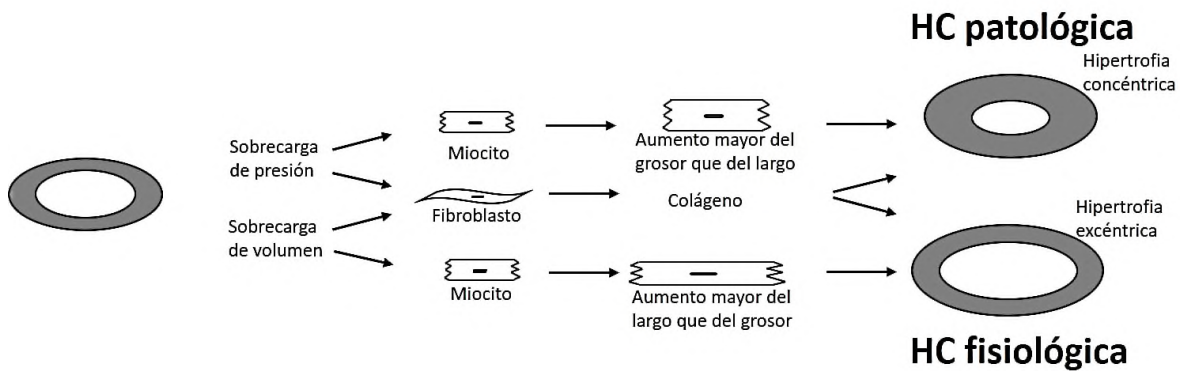


Figura 1. Esquema de los patrones principales de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica que las origina. Los sólidos de revolución en forma elíptica representan un corte transversal del corazón. Modificado de L. Enis y E. Escuderos et al [1].

2.4. Modificación del sarcómero en la HC

El sarcómero es la unidad anatómica y funcional del músculo, formado principalmente por actina y miosina. En condiciones normales, el sarcómero, tiene un alargamiento que va desde 1.85 micrómetros en el período de contracción, y hasta los 2.05 micrómetros en el estado de reposo (sístole y diástole, respectivamente) [9]. Durante la HC, hay un exceso de producción de proteínas estructurales del sarcómero, así como también la formación de estas estructuras; la acumulación del sarcómero de forma lineal favorece al crecimiento longitudinal del miocito, generando la HC fisiológica, en cambio, la acumulación en paralelo, favorece el crecimiento transversal, lo que consecuentemente tiene severas implicaciones en la arquitectura y función del musculo cardiaco, generando la HC patológica [7, 8].

2.5. Vías de señalización.

Para el desarrollo de la HC patológica es necesario que ocurran diversos estímulos al tejido miocárdico, estos pueden ser, estiramiento del mismo, activación neuro humoral y/o liberación de factores de crecimiento y citocinas, entre otros [8].

Diversos estímulos son reconocidos por los receptores acoplados a proteína G (por sus siglas en inglés GPCR) ubicados en la membrana del miocito, que, a su vez, interactúan con la proteína heterotrimérica de transmembrana tipo q (Gq). La Gq estimula a la fosfolipasa C (PLC), y por ese intermediario al di-fosfatidil-inositol, a partir del cual se forma inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 interviene en el movimiento y liberación del Ca^{2+} intracelular, contenido en el retículo sarcoplásmico.

El Ca^{2+} liberado conjuntamente con DAG activan a la fosfatasa calcineurina, que después de ser activada desfosforila al factor nuclear y activador de células T (NFAT) [10, 11], que activa los genes de respuesta temprana a la hipertrofia como *c-Myc*, *c-Jun* y *c-Fos* (protooncogenes); la transcripción de estos genes ocurre a los 30 min y alcanza un máximo dentro de la primera hora [12] y tiene como finalidad la transcripción de factores como GATA4, MEF2C, Nkx2-5, NFAT, entre otros (genes de etapa embrio-fetal) denominados genes de respuesta tardía a la hipertrofia [6]. La expresión de estos factores, inducen la producción excesiva de β miosina, modificando la estructura del sarcómero el cual es determinante durante la contractibilidad muscular [12-14].

Por otro lado, el DAG induce la formación de Proteínacinas C (PKC) que actúa a través de una serina/treonina proteínacinas, desembocando en la llamada cascada de las MAPKs (proteínacinas activadas por mitógenos). Entre ellos la diana de la rapamicina en células de mamífero (mTOR) y la cinasa glucógeno sintasa (GSK-3), los cuales fosforilan a GATA4 o NFAT, sustratos celulares que son importantes en los procesos de crecimiento y diferenciación celular que finalmente inducen la HC patológica [6].

En cuanto a las especies reactivas de oxígeno (EROS) funcionan como segundos mensajeros (Figura 2), mediante la activación de numerosas cinasas y factores de transcripción involucrados en la respuesta hipertrófica del corazón, entre ellas a la tirosina cinasa Src, PKC, MAPKs, Ask-1 y Akt. Además estimulan la proliferación de fibroblastos [15], encargado de sintetizar metaloproteasas (MMPs), favoreciendo el desarrollo de fibrosis intersticial [8].

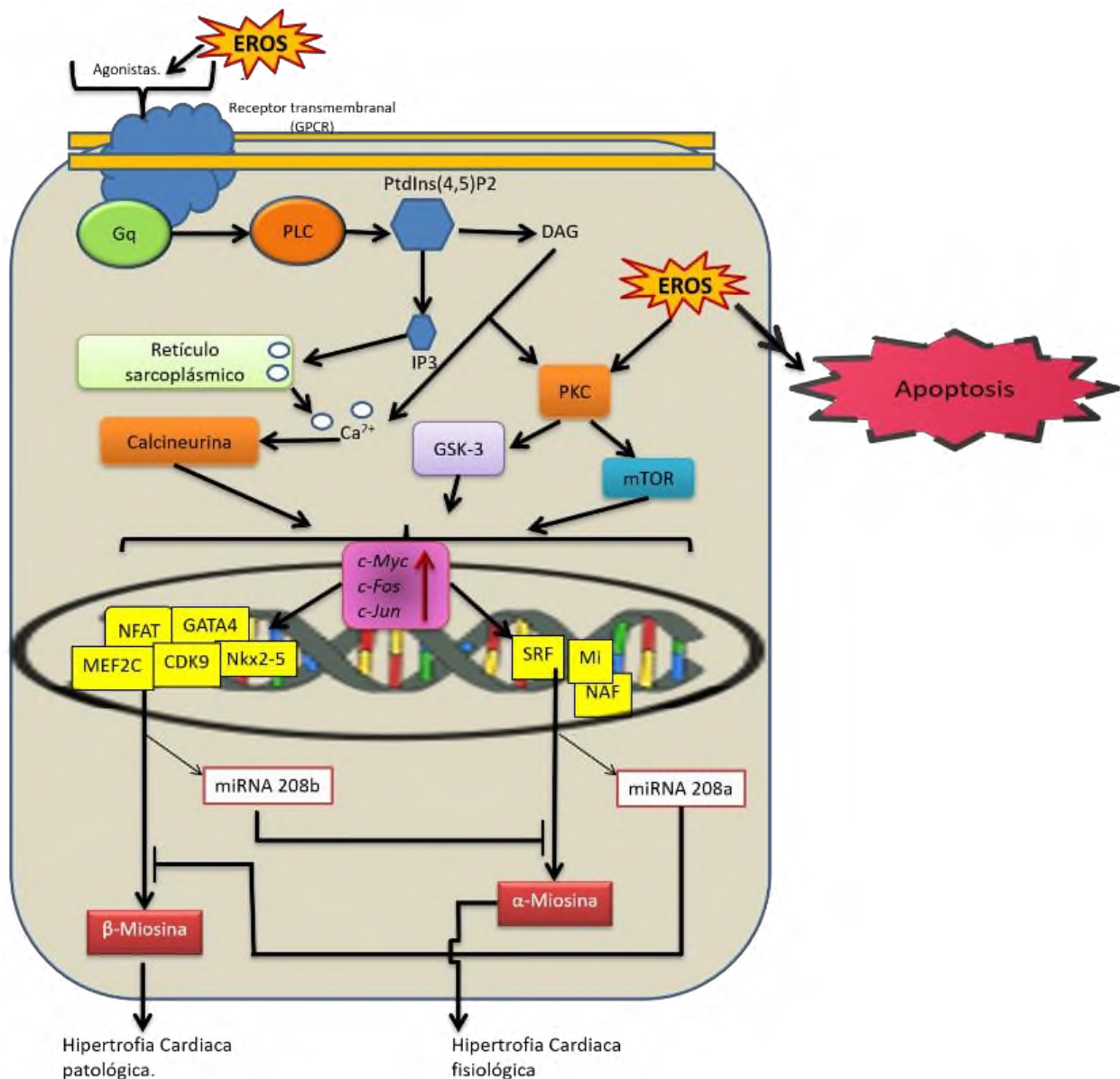


Figura 2. Vías de señalización en la respuesta hipertrofica del miocito ante un estímulo hipertrofico. Especies reactivas de oxígeno (ROS) funcionan como segundos mensajeros en las vías de señalización de crecimiento celular, incluida en la respuesta hipertrofica. GPCR: receptores acoplados a proteína G, Gq: proteína heterotrimerica de transmembrana tipo q, PLC: Fosfolipasa C, IP3: inositol 1,4,5-trifosfatol, DAG: diacilglicerol, PKC: Proteínas C, mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero, GSK-3: glucógeno sintasa, EROS: Especies Reactivas de Oxígeno, NFAT: factor nuclear de células T, c-Jun, C-Fos y C-Myc son protooncogenes, MEF2C: Factor potenciador de miocitos 2C, Nkx2-5: Factor de Transcripción de Homeobox Cardíaco Csx/Nkx2-5, NFAT Factor nuclear y activador de células T, CDK9: Quinasa dependiente de ciclina 9, SRF: factor de respuesta a suero Mi: Miogenina, NAF Factor de ensamblaje 1 de ribonucleoproteína. Imagen compilada de Carreño et al, 2006 [8], Escudero et al, 2010 [10] y Elnakish et al, 2015 [16].

2.6. Eventos epigenéticos en la HC.

La epigenética es el estudio de modificaciones en la expresión de genes que dependen de la conformación de la cromatina y no de la secuencia nucleotídica. En la HC, se han descrito al menos 9 genes de histonas deacetilasas (HDAC), los cuales se agrupan en dos categorías mayores: clase I y II, con procesos totalmente opuestos. Así, mientras HDAC I, inhibe genes prohipertrofos, las HDAC II actúan como anti-hipertrofos, «secuestrando» factores de transcripción implicados en la HC [9].

Recientes estudios demuestran que ratones carentes de genes HDAC 4, 5 y 9 (pertenecientes a la clase II) tienen una alta sensibilidad de responder a los estímulos mecánicos y de sobre carga hemodinámica, y consecuentemente desarrollan HC patológica. Debido a la capacidad de estas enzimas de unirse y de inhibir a MEF2c, un factor de transcripción que promueve la expresión génica de genes pro-hipertrofia (genes de respuesta tardía), en respuesta a un estímulo prohipertrofos, dos cinasas inducibles por estrés- Ca^{2+} /Calmodulina Proteíncinasas II (CaMK II) y proteíncinasa D (PKD) fosforilan a HDAC 5 y 9; los HDAC fosforilados a continuación enlazan a 14-3-3, que es una proteína chaperona que transporta los HDAC desde el núcleo hasta el citoplasma; esto hace que ocurra una separación entre los HDAC 5 y 9 de MEF2c, el cual es libre para interactuar con p300, una acetil transferasa de histonas que promueve la transcripción [16-19]. Por otro lado, la HDAC 4 (perteneciente a la clase II), funciona como un represor de MEF2 y del factor de respuesta de suero (SRF) [16].

Estudios moleculares han revelado que la actividad de HDAC 4 depende de su estado de oxidación/reducción: La oxidación de HDAC 4 provoca un desplazamiento de la HDAC desde el núcleo hasta el citoplasma, y la des represión de genes pro-hipertrofia [20, 21]. Además, la PKD desencadena la escisión proteolítica de HDAC 4 para producir un fragmento de HDAC 4 N-terminal (HDAC 4-NT) que inhibe selectivamente la actividad de MEF2 pero no de SRF, antagonizando la remodelación cardíaca sin afectar la supervivencia de cardiomiocitos [9].

2.7. Tratamiento en la HC.

A pesar de conocer algunos de los factores que están involucrados en el desarrollo de la HC, no ha sido posible encontrar un tratamiento preventivo, que active el proceso de regeneración, o que se utilice como profilaxis en poblaciones vulnerables, los tratamientos existentes no están enfocados en restablecer la homeostasis del corazón [22]; aunque los trasplantes de corazón son la mejor opción, son muy costosos y por lo tanto poco accesibles [23].

Por tal motivo se siguen buscando alternativas, o nuevos tratamientos que generen un cambio positivo en la evolución de esta enfermedad, hay diversos tipos de investigaciones que buscan relacionar la dieta con el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares los cuales pueden ser ingeridos y producir efectos benéficos en contra de la HC, uno de ellos realizado en España, donde se evaluó la dieta de 1300 participantes y quienes tenían mayor adherencia a la dieta mediterránea exhibieron un menor riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular, cabe señalar que la dieta mediterránea se basa principalmente en la ingesta de grandes proporciones de vegetales, cereales, granos, y aceite de oliva como aceite principal [24]. Por tal motivo se sugiere que pacientes con predisposición a contraer HC patológica ingieran estos alimentos ya que contienen altas cantidades de boro y por tanto este agente pudiese actuar como agente profiláctico.

Es sabido que el boro se encuentra ampliamente en plantas principalmente en mayor proporción en las dicotiledóneas, abundando mayoritariamente en las hojas, semillas y flores; el aguacate (40-100ppm), alcachofa (40-150ppm), camote (30-150ppm), cítricos (30-100ppm), clavel y esparrago (40-150ppm), jengibre (50-140ppm), olivo (20-150ppm) poseen alto contenido de este mineral en comparación con otras especies de vegetales [25].

2.8. **Compuestos de boro.**

El boro es un elemento químico que tiene el símbolo B, número atómico 5 y con masa atómica de 10.811 g/mol. Es un elemento metaloide, semiconductor, trivalente, existe abundantemente en el mineral bórax. El boro es un nutriente esencial en el metabolismo de las plantas, y, parece tener un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura de la pared celular (mediante formación de grupos cis-diol) y de las membranas [26].

Científicamente no se ha demostrado que el boro sea una sustancia considerada esencial en la dieta humana o que sea un requerimiento dietario en vertebrados e invertebrados, o al menos de la misma importancia que ocupa en los vegetales, sin embargo el boro tiene efectos bien definidos y puede ser de beneficio terapéutico [27]. El cuerpo humano contiene al menos 0.7 mg de Boro por kilogramo de peso. Una persona consume en su ingesta diaria alrededor de 0.8 a 2.5 mg de boro por kilogramo de peso, el exceso es eliminado fácilmente a través de la orina. Mossemant y col (1994) determinaron que el corazón tiene una concentración basal de 0.04 ppm de boro, en la misma publicación ellos informan que este es fácilmente absorbido por tejidos blandos, entre ellos, el corazón [28].

El bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, borato de sodio o tetraborato de sodio, BX) es un cristal blanco y suave que se disuelve fácilmente en agua. Tiene un comportamiento anfótero en solución, lo que permite regular el pH en disoluciones y productos químicos en base acuosa, se origina de forma natural en los depósitos producidos por la evaporación continua de los lagos estacionarios [9].

Los boratos son absorbidos alrededor del 95% en mamíferos, después de ingerirlos aparece con rapidez boro en la sangre y en los tejidos corporales, la distribución en el organismo parece producirse por difusión pasiva en todos los líquidos del cuerpo [28].

Se ha demostrado que al suplementar la dieta de ratas con compuestos de boro aumenta la actividad de enzimas antioxidantes tales como el aldehído deshidrogenasa, xantina oxidasa y citocromo b5 reductasa [29, 30]. Además el nivel medio de malondialdehído (MDA) en sangre disminuye y el nivel medio de glutatión (GSH) en sangre aumenta por la suplementación de

ácido bórico y BX en la dieta de ratas en comparación con el control [31]. Otra determinación realizada muestran que a bajas dosis de compuestos de boro incrementan la actividad de Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) en eritrocitos [32].

Cuando el BX (4 mg/kg), fue administrado como fuente de boro, de forma oral en ratas, por tres días consecutivos en un intervalo de 24 h seguido de la administración de tioacetamida, un agente oxidante (400 mg/kg), el BX disminuyó el efecto deteriorante de la tioacetamida en el hígado evitando la falla hepática por modulación de los parámetros del estrés oxidativo, esto sugiere que el boro puede ayudar a mantener el balance oxidante/antioxidante de los tejidos afectados [27].

Turkez *et al*, [33] en un estudio en contra de los metales pesados utilizaron cuatro dosis diferentes de compuestos de boro, los cuales son: BX, Ácido bórico (BA), Colemanite (COL) y Ulexita (UX) en concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ppm, los cuales llevaron importantes alteraciones positivas en las actividades de las enzimas antioxidantes y el nivel de glutatión total (TGSH) en un cultivo primario de linfocitos. Además, encontraron que el BX (5 y 10 ppm), COL (5 ppm) elevan significativamente las actividades disminuidas de las enzimas SOD, CAT y Glutatión peroxidasa (GSH-Px) por dosis bajas de compuestos metálicos. La disminución de los niveles de TGSH en eritrocitos inducidos por metales pesados puede prevenirse mediante la adición de BX, COL, UX en concentraciones de 5 ppm y BA (5 y 10 ppm). Además, ellos indican que todas las concentraciones de BX, BA, COL y UX (5, 10, 15 y 20 ppm) no causan ningún efecto genotóxico en los linfocitos humanos en comparación con los controles que no recibieron exposición a los compuestos del boro, además ellos corroboran que de acuerdo con la evidencia experimental, que el boro en sí, no es un antioxidante, sin embargo, fortalece el sistema de defensa antioxidante del tejido, aunque se desconoce qué mecanismos estén involucrados en el proceso [34].

2.9. Cultivo celular.

En la actualidad, el uso de cultivos celulares está aumentando debido a la versatilidad, economía y conveniencia de la metodología en comparación con experimentos con animales completos [35]. Los experimentos con miocitos individuales han demostrado una gran comprensión de su fisiología celular y subcelular. Estos estudios han utilizado una variedad de técnicas, incluyendo electrofisiología, imágenes de calcio, mecánica celular, bioquímica de proteínas, inmunohistoquímica y expresión en tiempo real de genes de interés [36]. El estudio de los miocitos aislados en lugar de todo el corazón elimina otros tipos de células, especialmente células endoteliales y fibroblastos, lo que reduce significativamente su influencia [37], proporcionando mayor robustez a los resultados obtenidos. Además, los miocitos neonatales cultivados se han convertido en uno de los sistemas más versátiles para el estudio de las funciones celulares cardíacas *in vitro* [38]. Otra gran ventaja es que los miocitos se someten a una desdiferenciación rápida - ciclo de re-diferenciación que típicamente resulta en un latido espontáneo por las células 20 h después de la siembra, mientras que los cardiomiocitos adultos suelen requerir de estimulación para inducir la contracción [38].

2.10. Inducción de Hipertrofia Cardíaca *in-vitro*.

Actualmente se han implementado diversas formas de inducir la HC en modelos *in vivo* e *in vitro*. Una de las más comunes es mediante la administración de un agonista de los β adrenoreceptores, tal es el caso del Isoproterenol (ISO), que se ha utilizado para activar los receptores β adrenérgicos y desencadenar la respuesta hipertrófica, el cual ha sido probado exitosamente en ambos modelos. En cuanto al modelo *in vitro* Liu y *et al* 2016 utilizaron una concentración de 10 μ M de ISO para inducir la HC *in vitro* en cultivo primario de miocitos de ratas neonatales, tales resultados fueron comparados con un modelo de HC *in vivo* obteniendo resultados comparables en cuanto al incremento de tamaño en los miocitos y la elevada expresión relativa de CaSR, CaMKII y β ciclina, entre otros [2].

3. Justificación.

El corazón es el blanco de muchos factores de tipo, hormonal, metabólico, genético y epigenético; en respuesta, el corazón es capaz de modificar su estructura, sin embargo, este cambio usualmente genera lesiones irreversibles en el microambiente, afectando principalmente al miocito.

La HC es una afectación del corazón que ocurre en respuesta a diferentes estímulos de sobrecarga hemodinámica, así como también de diferentes enfermedades cardiovasculares, como lo son, enfermedad vascular periférica, hipertensión vascular, cardiopatía coronaria (infarto de miocardio), insuficiencia cardíaca, cardiopatía congénita etc. En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total (WHO 2008), afectando por igual a hombre y mujeres, sin importar la edad, incluyendo desde los infantes hasta los ancianos.

Por tal motivo, se han buscado nuevas alternativas para la prevención y el tratamiento de la HC. Actualmente existen numerosas evidencias que involucran al estrés oxidativo en el desarrollo de la HC patológica y en la progresión a Insuficiencia Cardíaca [8]. Por otro lado está bien descrito que los compuestos de Boro tienen un efecto protector en contra de las especies reactivas de oxígeno, elevando la actividad de las enzimas antioxidantes, por lo que es probable que al exponer a las células con compuestos de boro, las enzimas antioxidantes estén preparadas para contrarrestar el estrés oxidativo evitando el desarrollo de la HC.

4. Hipótesis.

El bórax tiene un efecto cardioprotector en los miocitos de cultivo *in vitro* y evita el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por Isoproterenol.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo principal.

Evaluar el efecto del bórax en cultivo primario de miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico.

5.2. Objetivos secundarios.

- Establecer las condiciones de desarrollo de cultivo primario de miocitos.
- Establecer las concentraciones adecuadas de exposición del cultivo primario de miocitos al bórax.
- Establecer las concentraciones de Isoproterenol para inducir una respuesta hipertrófica en el cultivo primario de miocitos.
- Evaluar el efecto cardioprotector y competitivo del bórax en cultivo primario de miocitos hipertróficos.

6. Materiales y Métodos.

Esquema general. En la Figura 3, se muestra el procedimiento utilizado en el presente trabajo, el cual consta de una fase de estandarización de condiciones de exposición y la fase de ensayos, de cardioprotección y competitivo.

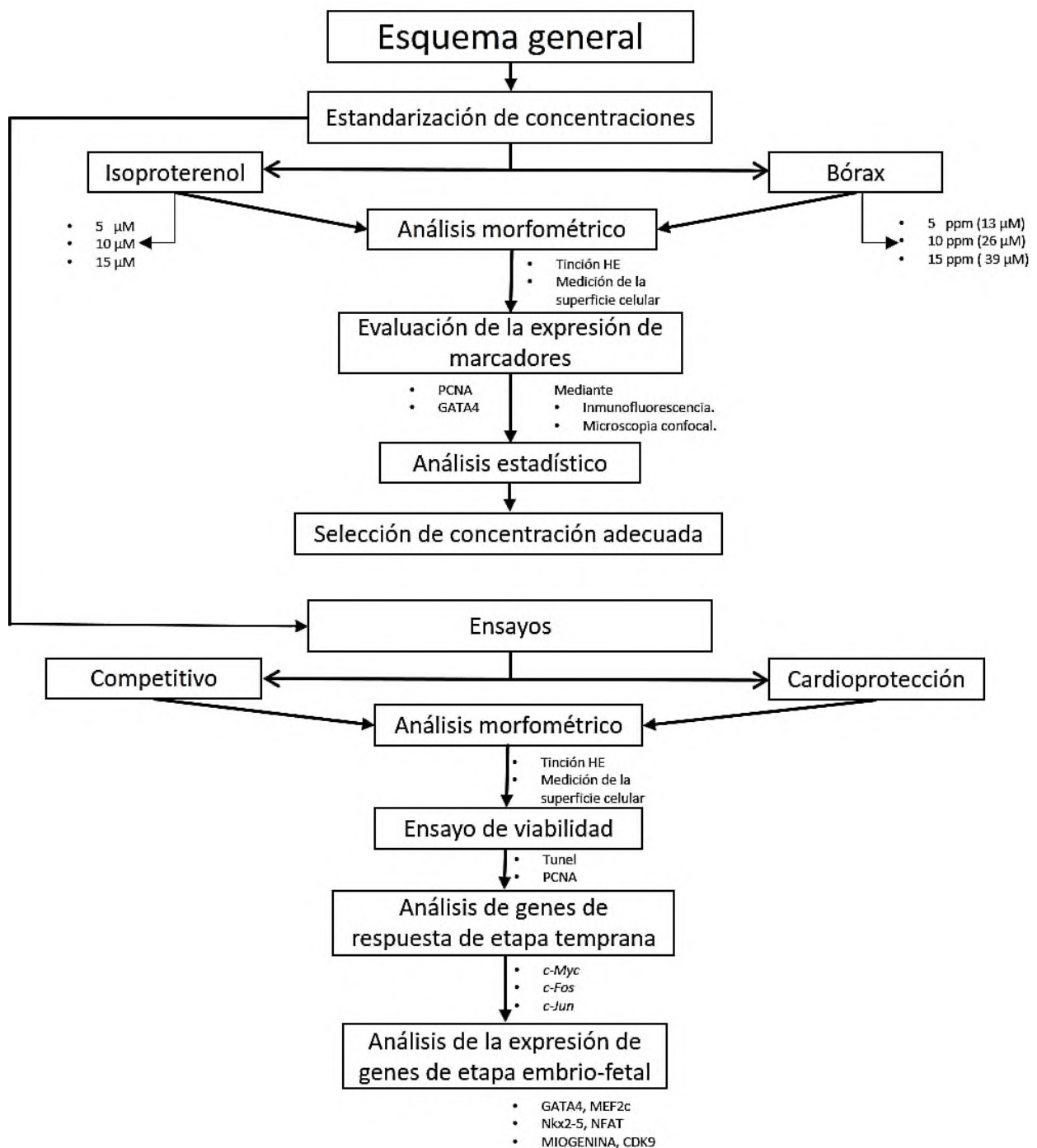


Figura 3. Diagrama experimental.

6.1. **Aislamiento y cultivo de miocitos *in vitro*.**

Las muestras de tejido para el aislamiento de miocitos, se obtuvieron de ratones neonatos CD1 (sin diferenciar sexo) de 0 a 2 días de edad proporcionados por el Bioterio de la Universidad Panamericana; el sacrificio fue realizado por decapitación, sin administración previa de anestesia, a cada ratón se le hizo una incisión a nivel de tórax para extraer el corazón, el cual fue colocado en una solución PBS 1% – EDTA 0.5% – Antibiótico 1X (100 U de Penicilina, 100 µg de Estreptomina, 0.25 µg Anfotericina) posteriormente los corazones fueron disectados, lavados 3 veces con PBS 1% – EDTA 0.5% estéril [38], posteriormente se utilizó el kit comercial Neonatal Heart dissociation Kit mouse and rats (MACS, Miltenyi Biotec, ciudad, USA) para la disgregación del tejido y la obtención de los miocitos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los miocitos obtenidos se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM + 10% SFB + antibiótico 1X) para obtener una concentración final de 20,000 células/mL, y fueron sembrados 2 mL por caja Petri de 35 mm (P35) y 500 µL en portaobjetos con cámara de cultivos de 8 pozos; las células sembradas fueron 40,000 células/placa en P35 y en los portaobjetos con cámaras de cultivo de 8 pozos 25,000 células/pozo según el ensayo que se realizó. Los cultivos primarios de miocitos se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% por 24 h para que las células fueran adheridas a la superficie de la placa; cumpliéndose este tiempo se realizaron 5 lavados con PBS 1 % estéril, al finalizar los lavados se incubaron en medio de cultivo DMEM + 10 % SFB + Antibiótico 1 X, durante 24 h más para alcanzar una confluencia de 75%.

6.2. **Evaluación de las concentraciones de bórax en cultivo primario de miocitos.**

Los cultivos de miocitos al 75% de confluencia, fueron tratados con BX (ALDRICH, Missouri, USA) en concentraciones de 0, 13, 26 y 39 µM con tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h [33]. Se realizaron estudios histológicos, mediciones micrométricas e inmunofluorescencia.

6.3. Inducción de hipertrofia cardiaca en cultivo primario de miocitos con isoproterenol.

Los cultivos al 75% de confluencia celular, fueron tratados con ISO (ALDRICH, Missouri, USA) a partir de 0, 5, 10 y 15 μM con tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h esto en base al experimento realizado por Liu y col 2016 [2]. Se realizaron estudios histológicos, mediciones micrométricas e inmunofluorescencia para determinar la concentración adecuada que induce el estímulo hipertrófico.

6.4. Ensayos de cardioprotección y competitivo en cultivo primario de miocitos.

Para evaluar el efecto cardioprotector y competitivo del BX en cultivos primarios de miocitos hipertróficos se evaluaron diferentes combinaciones como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de ensayos cardioprotector y competitivo

Control	BX	ISO	CARDIOPROTECTOR	COMPETITIVO
SIN TRATAMIENTO incubado por 24 h	BX 13 $\mu\text{M}/24$ h	ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h	BX 13 $\mu\text{M}/24$ h después ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h	BX 13 μM y ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h
SIN TRATAMIENTO Incubado por 48 h	BX 13 $\mu\text{M}/48$ h	ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h	BX 13 $\mu\text{M}/24$ h después ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h	BX 13 μM y ISO 10 $\mu\text{M}/48$ h
SIN TRATAMIENTO Incubado por 72 h	BX 13 $\mu\text{M}/72$ h	ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h	BX 13 $\mu\text{M}/24$ h, después ISO 10 $\mu\text{M}/24$ h	BX 13 μM y ISO 10 $\mu\text{M}/72$ h

6.5. Tinción por hematoxilina y eosina y análisis morfométrico.

Una vez finalizado los tratamientos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 24h, y post-fijadas con etanol al 70%. Posteriormente las células se hidrataron con agua destilada por 5 minutos. Se empleó hematoxilina y eosina (Anexo II. a.), para teñir el citoplasma y núcleos, respectivamente. Se empleó PBS-Glicerol 1:1 como medio de montaje [39]. Se capturaron 5 micrografías por grupo con aumento de 10 X (100 aumentos reales) empleando un microscopio de epifluorecencia (Zeis, Oberkochen, Alemania). Se usó el programa Axio-Vision (4.8sp1 (12-2011) Alemania) para determinar el área celular.

Para los estudios morfométricos se midieron 100 células por cada grupo, se establecieron los promedios a partir del control (crecimiento basal del miocito), a partir de dicho promedio, se determinó la ganancia se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Ganancia} = \left(\frac{(\text{Promedio de tamaño del grupo tratado})}{(\text{Promedio del tamaño del grupo control})} * 100 \right) + 100$$

6.6. Inmunofluorescencia

Las células previamente fijadas con paraformaldehído al 4% y post-fijadas con etanol al 70%, fueron permeabilizadas con PBS 1%-Tritón X 100 0.05%. El reconocimiento inespecífico de las proteínas fueron reducidas con bloqueador universal (Universal blocking reagent Power Block™ Biogenex, California, USA). Los anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) fueron incubados 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda con agitación suave, los anticuerpos primarios empleados para cada determinación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Proceso celular determinada por anticuerpos

Análisis	Anticuerpo primario
Actividad apoptótica	Tunel (anti-Digoxigenina)
Proliferación	Anti-PCNA
Factores de transcripción	Anti-GATA4, Anti-Nkx2-5, Anti-MEF2c, Anti-NFAT, Anti-CDK9, Anti-Miogenina.

Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo Alexa Fluor (Termo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) por 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con Draq7 (BioStatus, Leicestershire, United Kingdom) durante 20 min y se empleó PBS-Glicerol 1:1 como medio de montaje, los cubreobjetos fueron sellados, para facilitar la observación. Las muestras se analizaron empleando un microscopio confocal y como programa de captura Zen 2009, la lectura de los anticuerpos secundarios fue a 488 nm y 594 nm [39]. Se cuantificaron 5 microfotografías para cada anticuerpo capturadas con 40 X (400 aumentos reales).

Para determinar el porcentaje relativo de expresión se consideró como 100% el número total de núcleos marcados con DQ7 en las 5 micrografías, posteriormente se contabilizaron los núcleos que presentaban la expresión para cada anticuerpo y con esta cantidad se procedió a determinar el porcentaje relativo de expresión.

6.7. Extracción de ARN.

Una vez finalizado los tratamientos, se retiró el medio de cultivo, el cultivo celular se lavó 3 veces con PBS 1%. Las células se disgregaron utilizando tripsina 0.05% por el método descrito en el apéndice (II. c.) las células se colectaron en microtubo de 1.5 mL y se almacenaron a -70 °C hasta que se colectaron todas las muestras. Posteriormente se utilizó el protocolo de extracción de ARN utilizando el reactivo TRizol Reagent™ (Invitrogen Life, Massachusetts, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El botón de ARN obtenido fue hidratado con 15 µL de agua libre de ARNsas, y se incubó a 55 °C durante 15 minutos. La concentración y pureza del ARN fue cuantificado por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm, además, la calidad de la extracción se verificó mediante valores superiores de 1.9 de la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} . El ARN obtenido se almacenó a -70°C hasta su uso [39].

6.8. Síntesis de ADNc

Para la síntesis del ADN complementario, se empleó 1 µg de ARN total en un volumen final de 20 µL. La mezcla de reacción contenía Hexámeros 25 µM (Biobasic®, Ontario, Canadá), Reverse Transcription Buffer 1X (Biobasic®, Ontario, Canadá), dNTPs 1 µM (Promega®, USA), Inhibidor de RNAsas 20 U (Fermentas®, Massachusetts, USA) y 100 U de MuLV Reverse Transcriptase (Biobasic®, Ontario, Canadá). La reacción de transcripción reversa se realizó bajo las siguientes condiciones: 25°C durante 15 min, 37°C durante 60 min y 70°C por 15 min. Al finalizar se añadieron 30µL de agua libre de nucleasas teniendo un volumen final de 50µL con una concentración de 20 ng/µL de ADNc [39].

6.9. Análisis de expresión mediante qPCR tiempo real.

Los niveles de expresión de los mensajeros de *c-Myc*, *c-Fos*, *c-Jun* (genes de respuesta temprana en la HC) se analizaron por qPCR tiempo real, y se utilizó como gen constitutivo a *GAPDH*, las secuencias de los iniciadores tanto sentido como anti sentido se encuentra detallados anteriormente en la Tabla 3

Tabla 3. Secuencia de iniciadores de ratón.

Iniciadores	Sentido	Antisentido
C-Myc.	GCC CAG TGA GGA TAT CTG GA	ATC GCA GAT GAA GCT CTG GT
C-Fos.	CTC CCG TGG TCA CCT GTA CT	TTG CCT TCT CTG ACT GCT CA
C-Jun.	AAA ACC TTG AAA GCG CAA AA	CGC AAC CAG TCA AGT TCT CA
GADPH	ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC	GGT TAC CAG GGC TGC CTT C

Los perfiles de expresión de los genes fueron visualizados con SyBR-Green como método de detección. Las condiciones del termociclador se programaron de acuerdo con la figura 4.

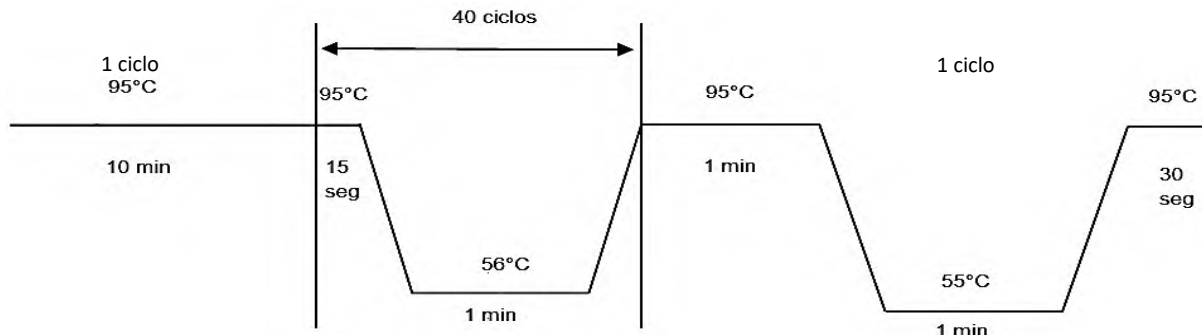


Figura 4. Condiciones del termociclador.

La qPCR se realizó en un sistema Mx30005Tm (termociclador), utilizando el software MxPro QPCR versión 3.00 (Agilent Technologies, USA).

El volumen final de la reacción fue de 20 µL que contenía lo siguiente a concentraciones finales: SyBR-green Universal PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems®, California, USA), iniciador sentido 0.4 µM (IDT®, USA), iniciador antisentido 0.4 µM (IDT®, USA), 50 ng de cDNA µM (IDT®, USA) y agua libre de nucleasas.

Los iniciadores *c-Myc*, *c-Fos* y *c-Jun* se diseñaron con el programa bioinformático Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) utilizando como templado la secuencia del gen de ratón. Sintetizados a una concentración de 100 nmol, 20 pb cada uno, las secuencias de los iniciadores tanto sentido como anti sentido se encuentra detallados anteriormente en la Tabla 3.

La expresión relativa de los mensajeros determinada por qPCR se estableció por el método $2\Delta\text{ct}$ tomando como constitutivo al gen GAPDH [39].

6.10. Análisis estadístico.

Se realizaron estudios de comparación cohortes prospectivo utilizando el programa estadístico SPSS Statics v.25 (SPSS Inc. Chicago, USA). Se realizó análisis de varianza de un factor (ANOVA), previa evaluación de la homogeneidad de las varianzas de cada grupo con la prueba de Levene. Para la comparación de grupos (análisis post hoc) se empleó la prueba de Dunnet.

7. Resultados y Discusión.

7.1. Efecto del bórax sobre cultivos primarios de miocitos.

Debido a la carencia de estudios sobre el posible papel benéfico del BX en células cardiacas y con la finalidad de determinar si este compuesto modifica la actividad de los miocitos *in vitro*, se analizaron el efecto de las concentraciones 13, 26 y 39 μM de BX, de acuerdo a un trabajo previo realizado para leucocitos [34].

7.1.1. Análisis de la proliferación/viabilidad de los miocitos en cultivo primario tratados con BX.

En la figura 5 A, se muestra que las diversas concentraciones de BX favorecieron la capacidad de proliferación de los miocitos (PCNA), y su cambio fue en promedio 40% mayor que la determinada en el grupo control a las 24 h, cabe destacar que 13 μM de BX favoreció la proliferación en todos los tiempos de exposición. Al incrementar la concentración de BX (26 y 39 μM) la capacidad de proliferación supera al cultivo control en un 30%, pero dicha capacidad no se mantiene relativamente constante con respecto al tiempo. Esto nos podría indicar que el BX puede contribuir a la regeneración de tejido cardiaco, esto se explica debido a que PCNA es un marcador de proliferación en la etapa G1 y S1 de la división celular y al ser activado induce la división celular [40].

En la figura 5 B podemos observar que la viabilidad de los miocitos tratados con BX 13 μM no se cambió en un intervalo de tiempo de 24 hasta 168 h, este siempre fue estadísticamente igual al control. Notamos que el porcentaje de viabilidad se mantiene estable entre 30 y 40% a lo largo del análisis, este porcentaje relativamente bajo puede deberse al estrés ocasionado durante la disgregación celular y en los lavados que se tienen que realizar a las células antes del tratamiento con azul de tripano para determinar la viabilidad [38].

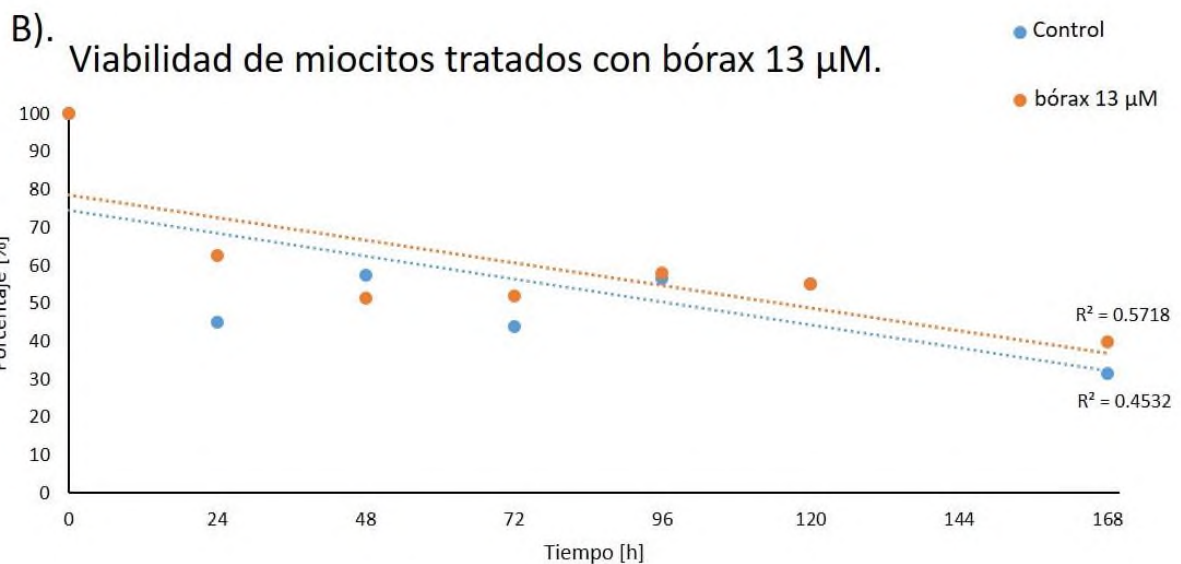
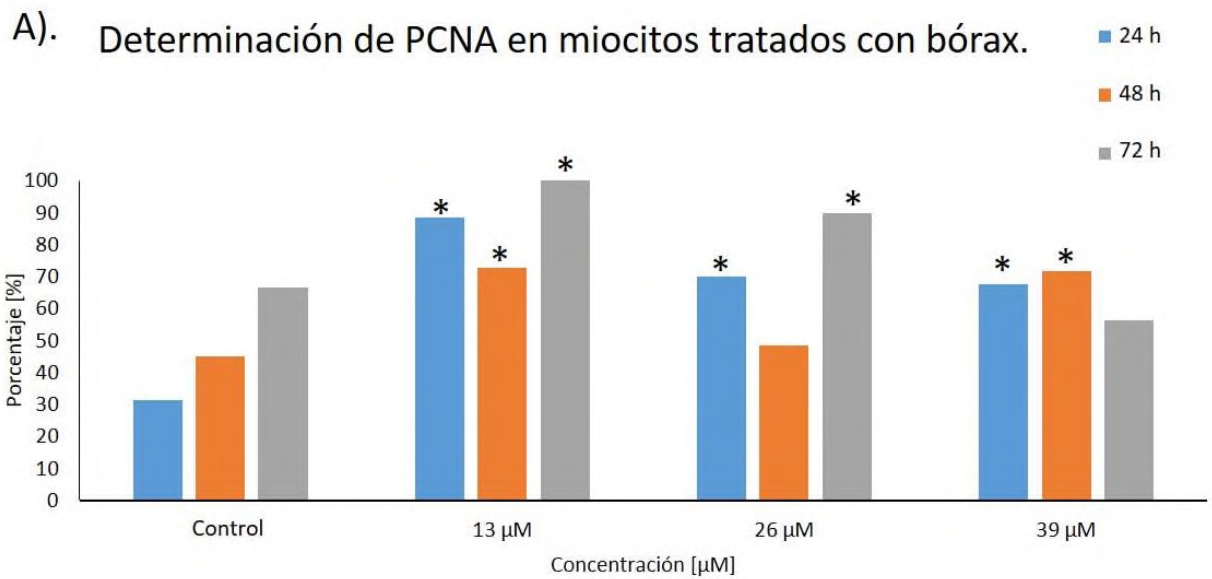


Figura 5. Análisis de proliferación y viabilidad de miocitos tratados con BX.

A) Porcentaje de células positivas a PCNA (antígeno nuclear de proliferación) B) Porcentaje de viabilidad celular.

* representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

En la Figura 6 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 24 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μM de BX. Note la presencia de GATA4 en los cultivos tratados con BX vs el control, note también que las células tratadas con BX dan positivo a PCNA y colocalizan con GATA4. Esto indica que el mecanismo de división y diferenciación celular esté activado desde las 24 h sin embargo esto no indica que la célula se divida [41].

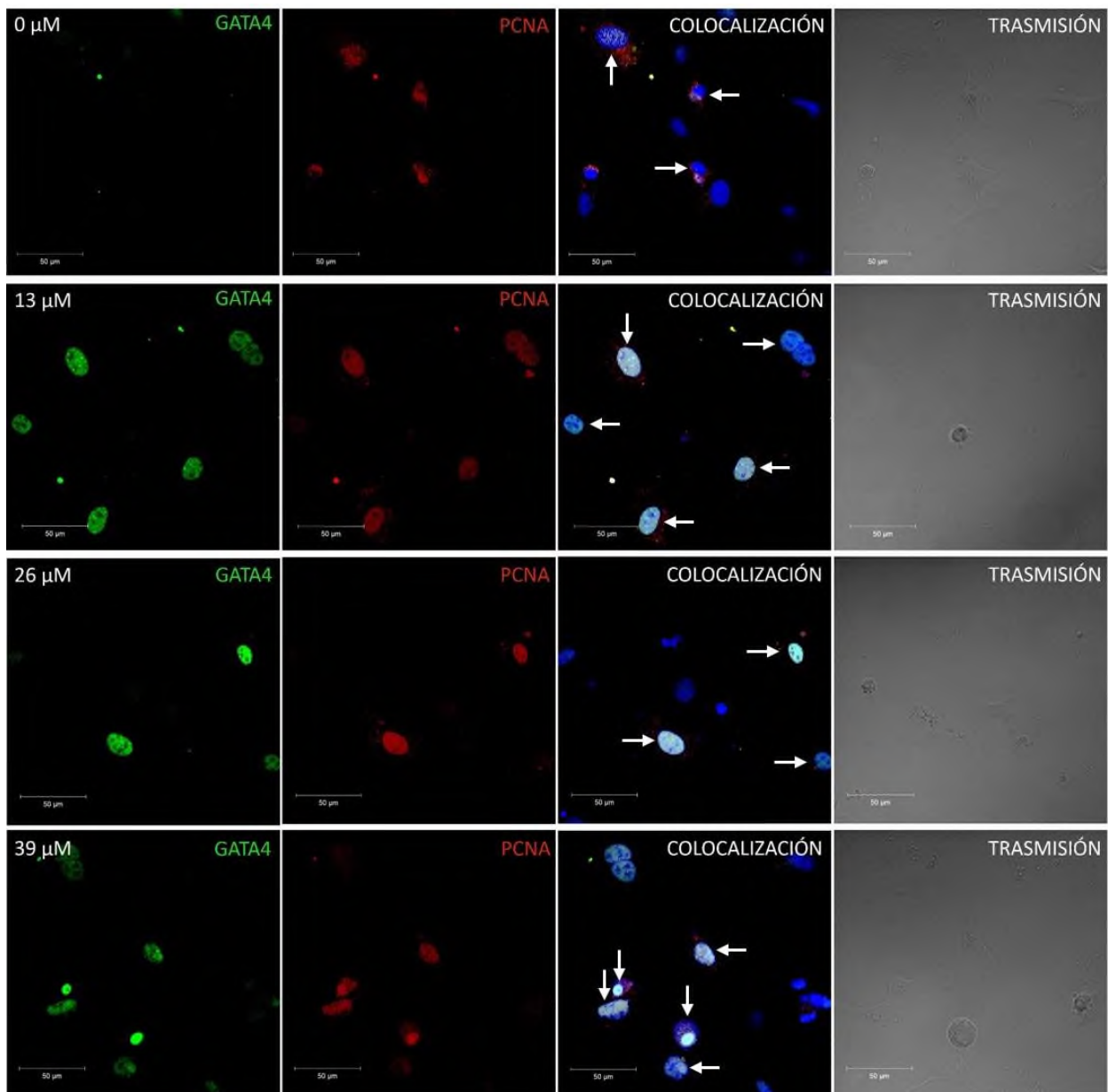


Figura 6. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 24 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μM de BX.

Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la Figura 7 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 48 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μM de BX. Observe que la expresión de GATA4 se colocaliza en los cultivos tratados con BX y que conforme aumenta la concentración de BX aumenta la intensidad de GATA4. Sin embargo no todas las células dan positivo a GATA4 y aproximadamente la mitad colocaliza, esto podría indicar que para 26 y 39

μM de BX se está suprimiendo la expresión de este gen, aun no hay en la bibliografía investigaciones referentes a este efecto.

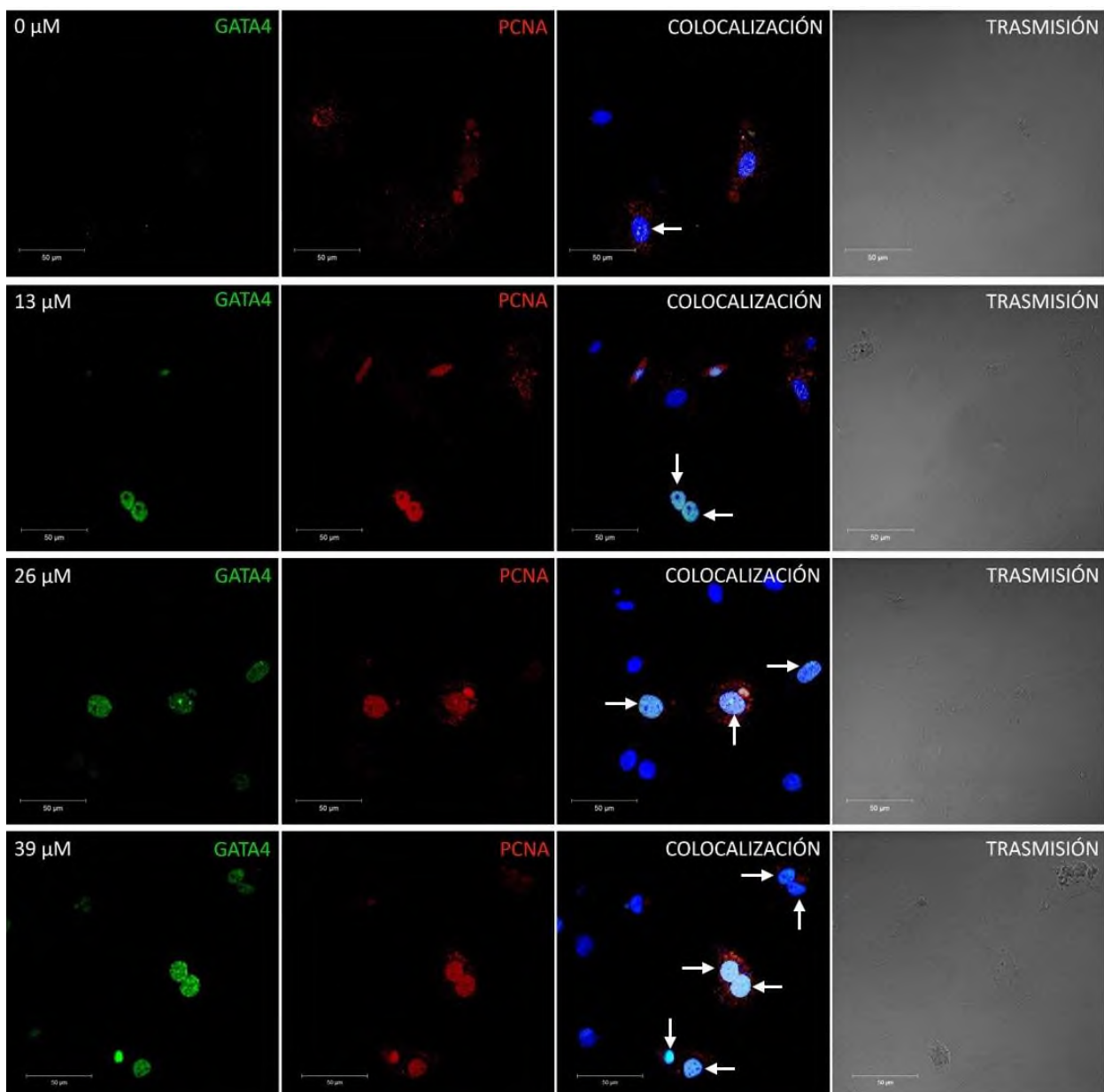


Figura 7. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 48 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μM de BX.

Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 8 se muestra el análisis de la expresión GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 72 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μM de BX. Note que GATA4 empieza a dar positivo en el control, lo que posiblemente signifique que los miocitos estén empezando a generar una respuesta hipertrófica causado por el estrés ocasionado en la

disgregación celular [38]; Además existe una pérdida de la intensidad de GATA4 y PCNA en 13 y 26 μM de BX, esto claramente indica que el BX a estas concentraciones está dejando de ejercer un efecto en la proliferación celular a las 72 h de exposición, mientras que a 39 μM la intensidad aun es alta, esto podría ser un indicio de que el miocito retuvo al BX en su interior y este compuesto esté ejerciendo un efecto a tiempos prolongados, el mecanismo por el cual el miocito almacene al BX no se encuentra dilucidado y aun no hay en la bibliografía investigaciones referentes a este efecto.

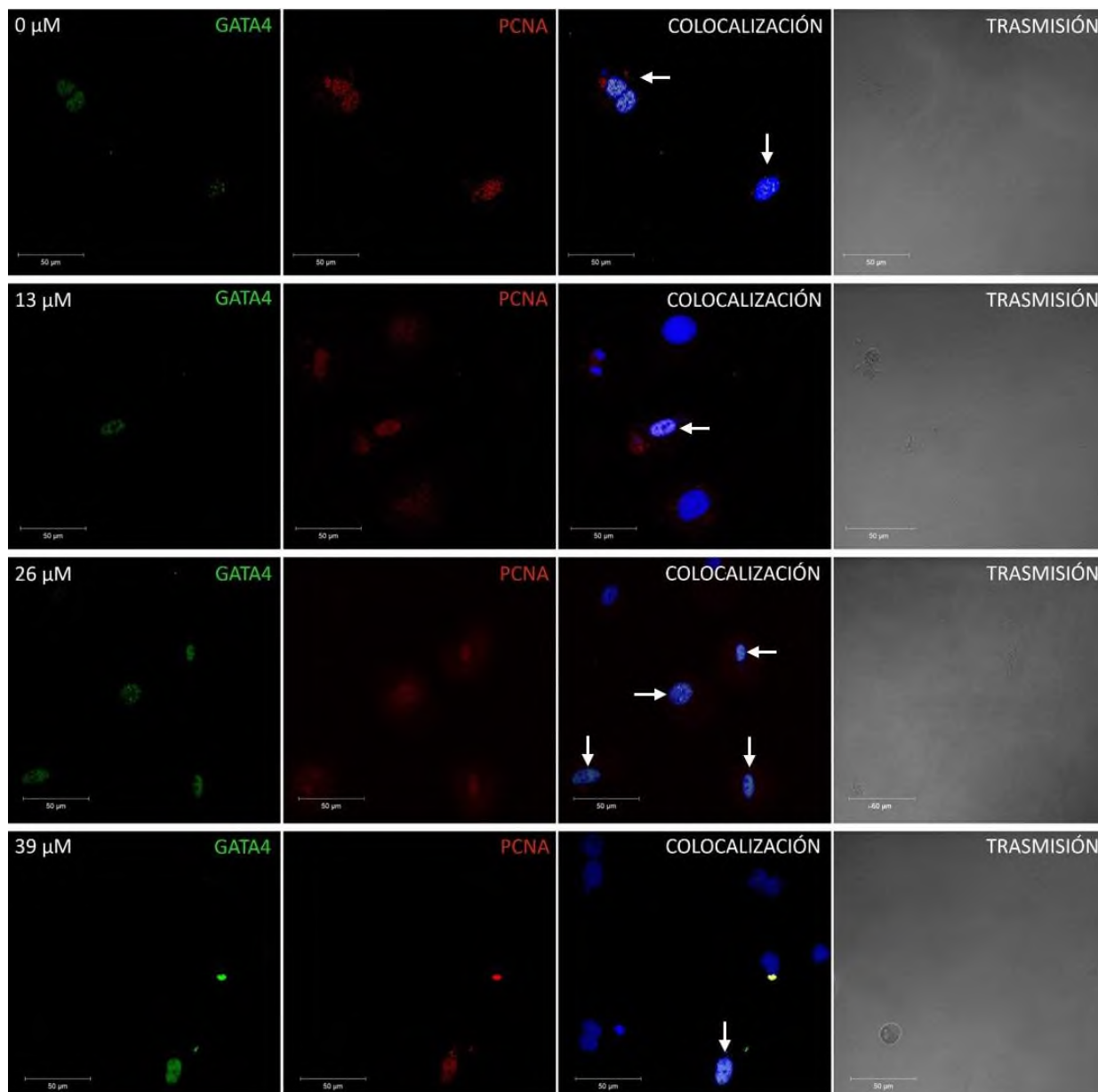


Figura 8. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 72 h a las concentraciones de 13, 26 y 39 μM de BX.

Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

7.1.2. Análisis del incremento de tamaño de los miocitos en cultivo primario tratados con BX.

En tabla 4, se describe el incremento de tamaño de los miocitos al ser tratados con BX, notamos que 26 y 39 μM se estimula su aumento en tamaño, cabe señalar que dicho incremento se favoreció conforme aumento el tiempo de exposición, fue significativamente mayor con relación al control con un nivel de $p < 0.05$. Por el contrario el crecimiento determinado en los miocitos tratados con 13 μM de BX fue similar al grupo control, mejora la viabilidad, favorece la proliferación (figura 1). Esto puede deberse a la capacidad antioxidante del BX, ya que podría estar participando en la reducción del estrés mecánico (disgregación) ocasionado durante la generación del cultivo primario [35]. Cabe mencionar que cuando la concentración de BX incrementa, los miocitos también incrementan en tamaño, sin embargo este tamaño no es lo suficientemente grande para considerarlo como hipertrófico patológico y de acuerdo con los hallazgos obtenidos en el análisis de proliferación esto podría indicar que tal vez los miocitos estén desarrollando una respuesta hipertrófica fisiológica o favorable.

Tabla 4. Valores de tamaño de los miocitos cultivados in vitro con diferentes concentraciones de BX.

Tiempo	Grupo							
	Control		13 μM		26 μM		39 μM	
	$\bar{X}_a \pm s$		$\bar{X}_a \pm s$	Δ	$\bar{X}_a \pm s$	Δ	$\bar{X}_a \pm s$	Δ
24 h	2970.6 \pm 258.6		2970.6 \pm 258.6	5.20%	3663.4 \pm 347.9	9.5%*	4972.7 \pm 232.4	48.7%*
48 h	3462.9 \pm 253	3344.4 \pm 312.3	2918.8 \pm 336	-12.7%*	3922.7 \pm 219.2	17.3%*	4788.9 \pm 191.7	43.2%*
72 h	3599.6 \pm 426.4		3064.8 \pm 354	-8.4%	4222.2 \pm 461.9	26.4%*	5003 \pm 678.7	49.6%*

Área celular [=] $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$, n=100 células.

\bar{X}_a : Media, s: desviación estándar, Δ : Incremento, μM : micromolar, %: porcentaje, -: valor negativo.

*representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control de 24 h, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

7.1.3. Análisis histológico de los miocitos en cultivo primario tratados con BX.

En la Figura 9, se muestran las micrografías de cultivo de miocitos tratados con BX. Notamos que 13 μM de BX no modifica la estructura de los miocitos sin importar el tiempo de exposición, por el contrario en los miocitos tratados con 26 y 39 μM de BX, se observó un incremento de tamaño del núcleo y del citoplasma, con cromatina laxa o eucromatina, lo que refleja su alta actividad transcripcional. La alta capacidad proliferativa evaluada en 13, 26 y 39 μM de BX podría ser un indicio de que los miocitos están teniendo una adaptación favorable, esto indica que existe una respuesta hipertrófica, para determinar que esta hipertrofia es fisiológica o patológica se tienen que realizar otros experimentos, principalmente en un modelo *in vivo* donde se pueda observar la respuesta en el corazón. A una concentración de 13 μM se observa la mejor respuesta del miocito a exposiciones prolongadas con el BX.

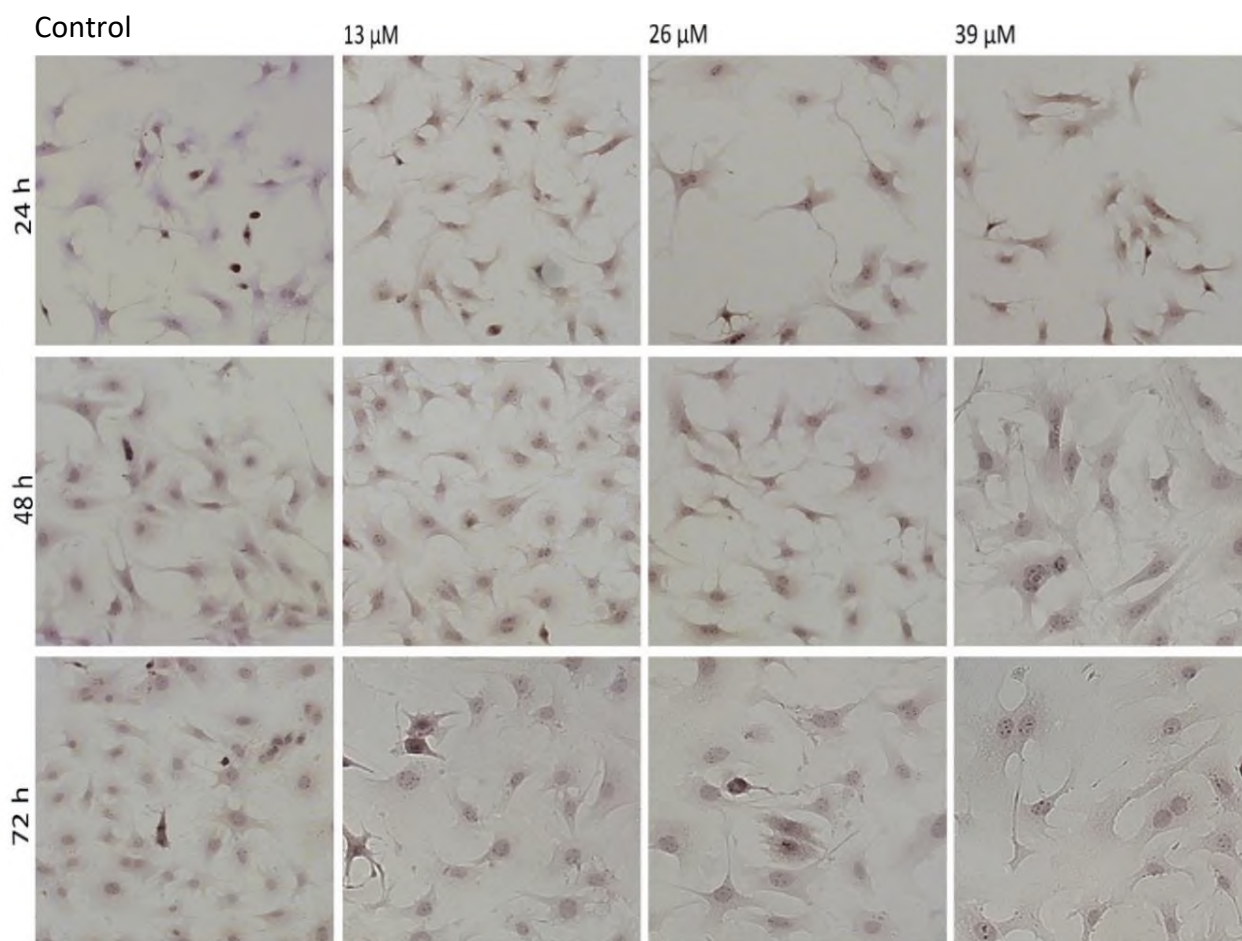


Figura 9. Micrografías de cultivo de miocitos tratados con 13, 26 Y 39 μM de BX a 24, 48 y 72 h de exposición.

7.2. Inducción de hipertrofia cardiaca en cultivos primarios de miocitos.

Para determinar la mejor respuesta hipertrófica a tiempos prologados de 24 a 72 h se evaluaron tres concentraciones de ISO que con anterioridad se había establecido un modelo *in-vitro* de HC [2], ellos analizaron la concentración de 10 μM y sin embargo solo evaluaron la tasa de crecimiento con la presencia de CaMKII y CaSR (Receptor sensor de calcio), relacionada con la vía de señalización CaMKK β -AMPK-mTOR, vía que se ve activada durante la administración de ISO por 48 h en cultivo primario de miocitos de ratas neonatales [2].

7.2.1. Análisis de la proliferación/viabilidad de miocitos en cultivo primario tratados con ISO.

En la figura 10 A se muestra el gráfico con los porcentajes relativos de proliferación de los miocitos expuestos a las concentraciones de 5, 10 y 15 μM de ISO. Estos valores muestran que la capacidad de proliferación de los miocitos se disminuye cuando se incrementó la concentración de ISO (10 y 15 μM). Es importante destacar que con una concentración de 5 μM de ISO existe una respuesta favorable en la proliferación, incrementa la proliferación celular hasta las 48 h de exposición, pero dicha proliferación disminuye a un 50 % al incrementar a 72 h de exposición de los miocitos, esto puede ser debido a que el ISO estimula la vía de los β -adrenoreceptores del miocito lo que a concentraciones bajas induce la división celular, este fármaco es utilizado en algunos procedimientos para el aislamiento y cultivo *in-vitro* de miocitos a concentraciones muy bajas [38], sin embargo a concentraciones más altas se ha utilizado para inducir una respuesta hipertrófica tanto *in vivo* como *in vitro* [2].

De acuerdo con la figura 10 B podemos observar que la viabilidad de los miocitos tratados con ISO 10 μM se reduce el 15% aproximadamente desde 24 hasta 168 h, cabe mencionar que la viabilidad siempre fue menor a la determinada en el control. Lo que indica que efectivamente a estas concentraciones existe una alteración negativa en estas células. Por lo que además de que el ISO hace crecer a los miocitos, este les está generando un decaimiento en la población total.

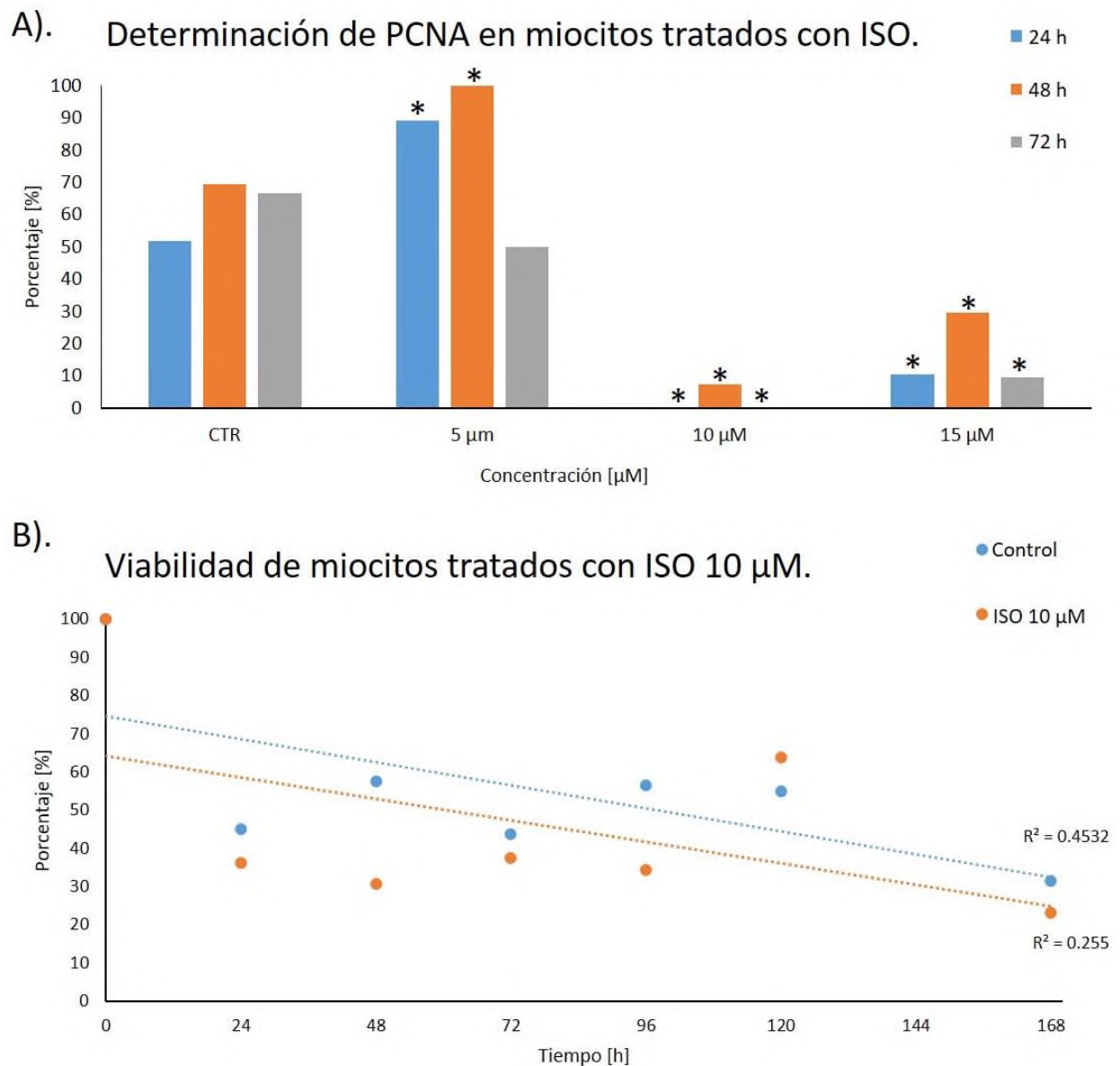


Figura 10. Análisis de proliferación y viabilidad de miocitos tratados con ISO.

A) Porcentaje de células positivas a PCNA (antígeno nuclear de proliferación), B) Porcentaje de viabilidad celular. * representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

En la figura 11 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos tratados 24 h con ISO. Note que la pérdida de expresión del marcador PCNA en el grupo de estudio tratados con ISO 10 y 15 μM. El ISO está provocando que las células pierdan su capacidad proliferativa al suprimir la presencia de PCNA [40].

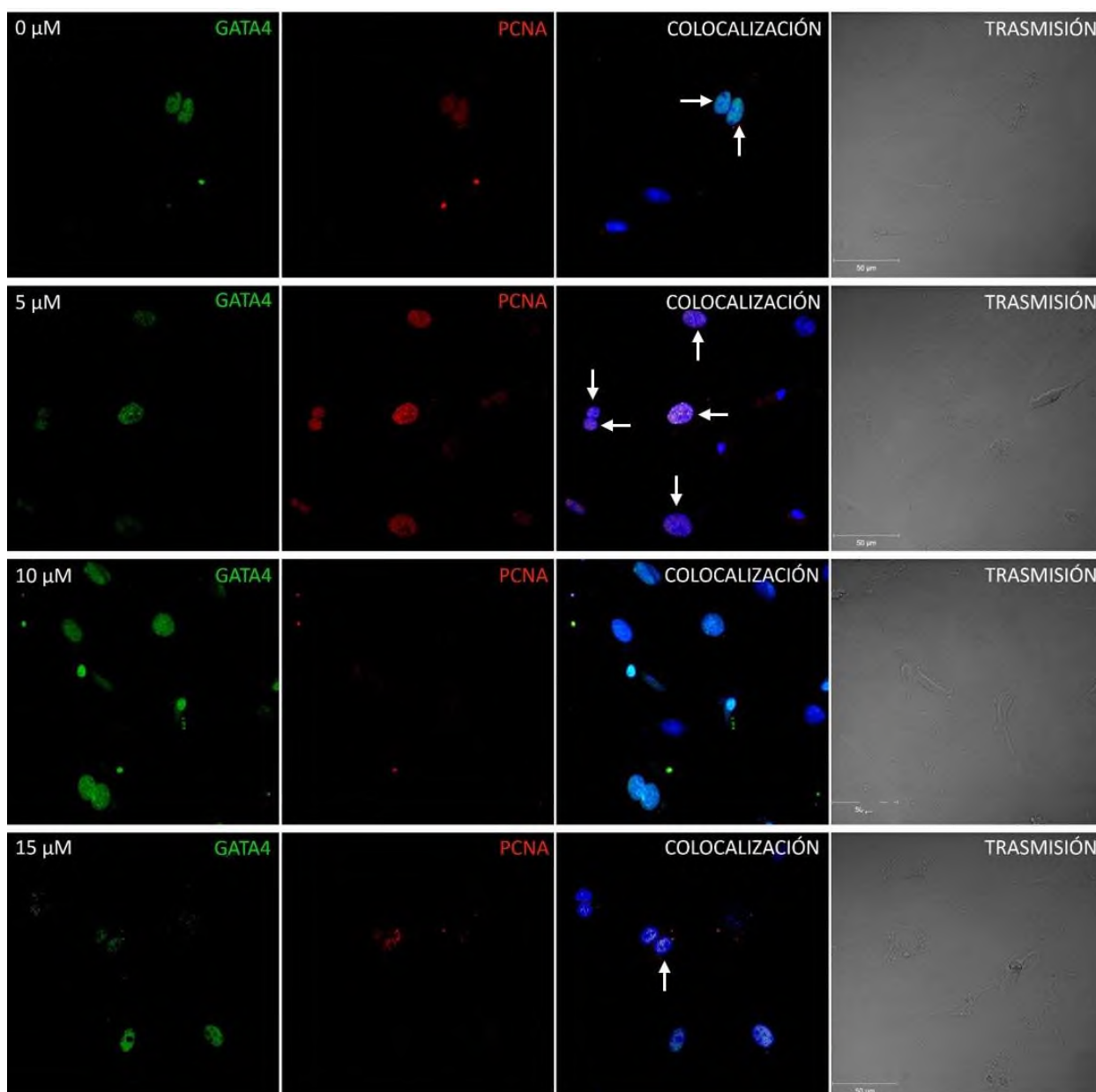


Figura 11. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 24 h a las concentraciones de 5, 10 y 15 μM de ISO. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 12 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos tratados 48 h con ISO. Note que se presenta una ligera elevación en la expresión del marcador PCNA en los grupos de estudios tratados con ISO 10 y 15 μM . Lo que indicaría que el miocito trata de producir una respuesta adaptativa a este estímulo, sin embargo no es capaz de contrarrestar este daño producido, el cual supera su capacidad de adaptación [2].

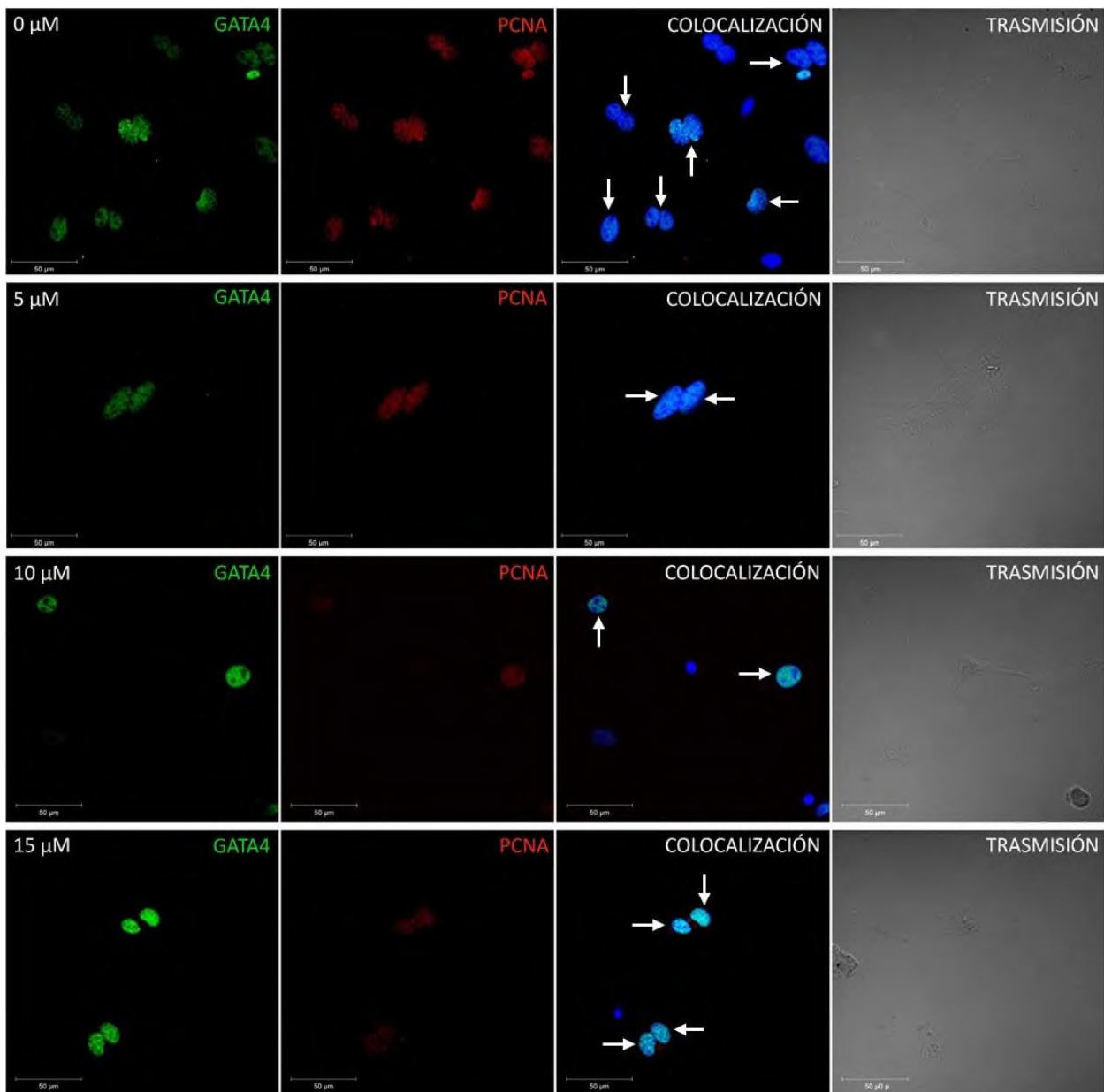


Figura 12. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 48 h a las concentraciones de 5, 10 y 15 μM ISO.

Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 13 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos tratados 72h con ISO. Además la pérdida de expresión del marcador GATA4 en el grupo de estudio tratado con ISO 10 y 15 μM . También fue evidente la pérdida de expresión del marcador PCNA en los grupos de estudio tratados con ISO 10 y 15 μM . Esto indica que la respuesta hipertrófica a 10 y 15 μM solo se da a las primeras 48 h de exposición a ISO, mientras que a 5 μM esta respuesta molecular apenas empieza.

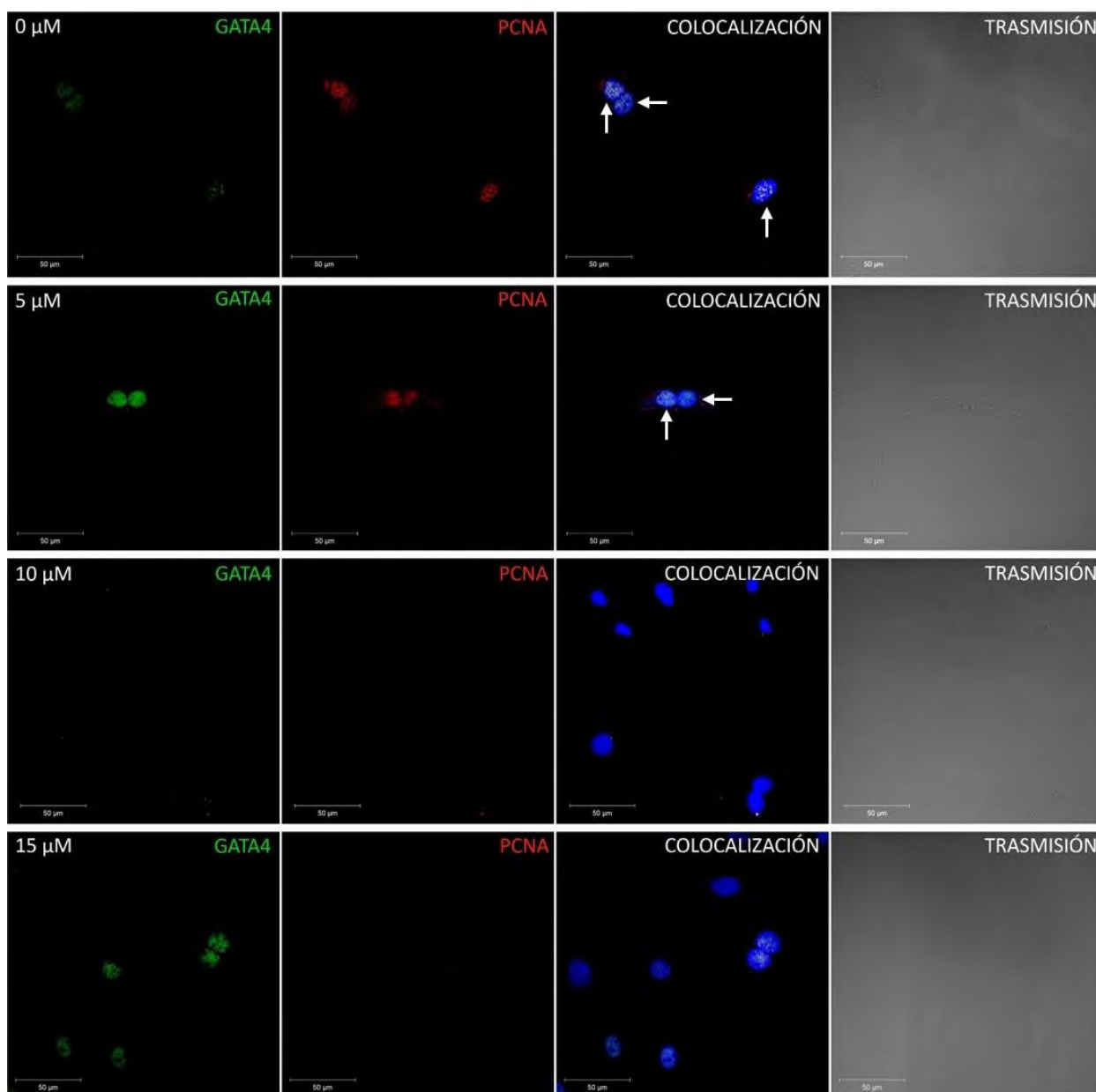


Figura 13. Análisis de la expresión de GATA4/PCNA por inmunofluorescencia en miocitos expuestos durante 72 h a las concentraciones de 5, 10 y 15 μM de ISO. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

Es importante mencionar que no hay en la bibliografía un análisis en el que se determine la expresión tanto de GATA4 y PCNA en conjunto a tiempos prolongados.

7.2.2. Análisis del incremento de tamaño de los miocitos en cultivo primario tratados con ISO.

Todas las concentraciones utilizadas de ISO (Ver tabla 5) favorecieron el incremento de tamaño celular, con relación al control. Interesantemente con 5 μM de ISO el miocito superó solo el 30% de su tamaño en comparación al control a las 24 h, pero al incrementar el tiempo de exposición la ganancia de tamaño no se favoreció. Por otro lado, 10 μM de ISO estimula el crecimiento hasta un 63.7%, 87% y 75% más en relación con el control conforme aumenta el tiempo de exposición (24, 48 y 72h respectivamente). Con 15 μM de ISO fue notable el incremento de volumen similar a las concentraciones de 10 μM . Esta determinación no se había realizado con anterioridad en cultivo *in-vitro*.

Tabla 5. Valores de tamaño de los miocitos cultivados *in vitro* con diferentes concentraciones de ISO.

Tiempo	Grupo							
	Control		5 μM		10 μM		15 μM	
	$\bar{X}_a \pm s$		$\bar{X}_a \pm s$	Δ	$\bar{X}_a \pm s$	Δ	$\bar{X}_a \pm s$	Δ
24 h	2702.9 \pm 241.1		4213.4 \pm 506.8	28.5%*	4776 \pm 226.1	45.6%*	4540.1 \pm 366.6	38.4%*
48 h	3198.3 \pm 721	3279.1 \pm 787.3	3597.7 \pm 963	9.7%	6053.4 \pm 592.2	84.6%*	5876 \pm 352.3	79.2%*
72 h	3936 \pm 1410.4		5480 \pm 1891.1	67.1%*	5768.5 \pm 1389	75.9%*	6655.3 \pm 805.3	103%*

Área celular [=] $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$, n=100 células.

\bar{X}_a : Media, s: desviación estándar, Δ : Incremento, μM : micromolar, %: porcentaje, -: valor negativo.

*representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control de 24 h, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

En base a lo anteriormente descrito en la literatura se considera HC al incremento del 60 % del volumen del tejido *in-vivo* por encima del volumen normal [7], por lo que de acuerdo con los porcentajes de incremento obtenidos en este ensayo encontramos que poco después de las 24 h de exposición con ISO a 10 μM se logra una respuesta hipertrófica; en concordancia con el análisis de proliferación se puede confirmar que el estímulo induce una hipertrofia patológica puesto que el porcentaje relativo de proliferación se ve afectada a 10 y 15 μM de ISO. Con una concentración de 10 μM los miocitos se mantienen en incremento de tamaño estable a las 48 y 72 h de exposición, sin embargo a 15 μM esta hipertrofia sigue en aumento, lo que implica que las células pronto entraran en apoptosis.

7.2.3. Análisis histológico de los miocitos en cultivo primario tratados con ISO.

En la Figura 10 se muestra las micrografías de cultivo de miocitos tratados con ISO. Observe la ganancia de citoplasma cuando los miocitos son tratados con ISO 10 μM desde las 24 h. En términos generales en los miocitos tratados con ISO observamos células irregulares con un núcleo grande, con eucromatina que refleja una alta actividad transcripcional [42]. Sin embargo no es posible observar los sarcómeros ni su disposición espacial en el citoplasma. A una concentración de 15 μM a 72 h de exposición las células presentan morfología de células senescentes [43]. Por lo que a una concentración de 10 μM ISO se genera una respuesta hipertrófica útil para realizar otros estudios empleando como modelo está concentración.

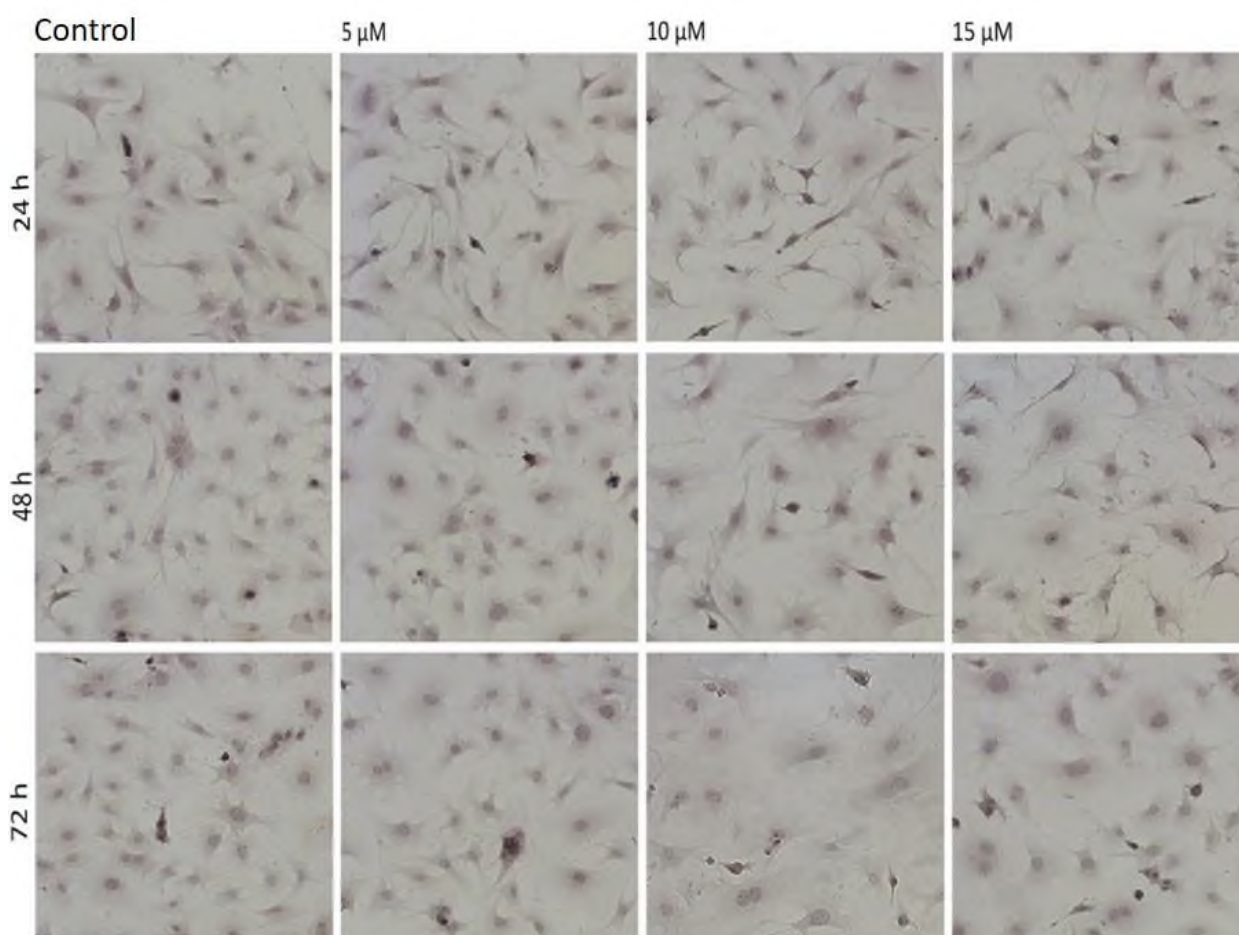


Figura 14. Micrografías de cultivo de miocitos tratados con 5, 10 y 15 μM de ISO a 24, 48 y 72 h de exposición.

7.3. Análisis *in vitro* del ensayo de Cardioprotección en miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico.

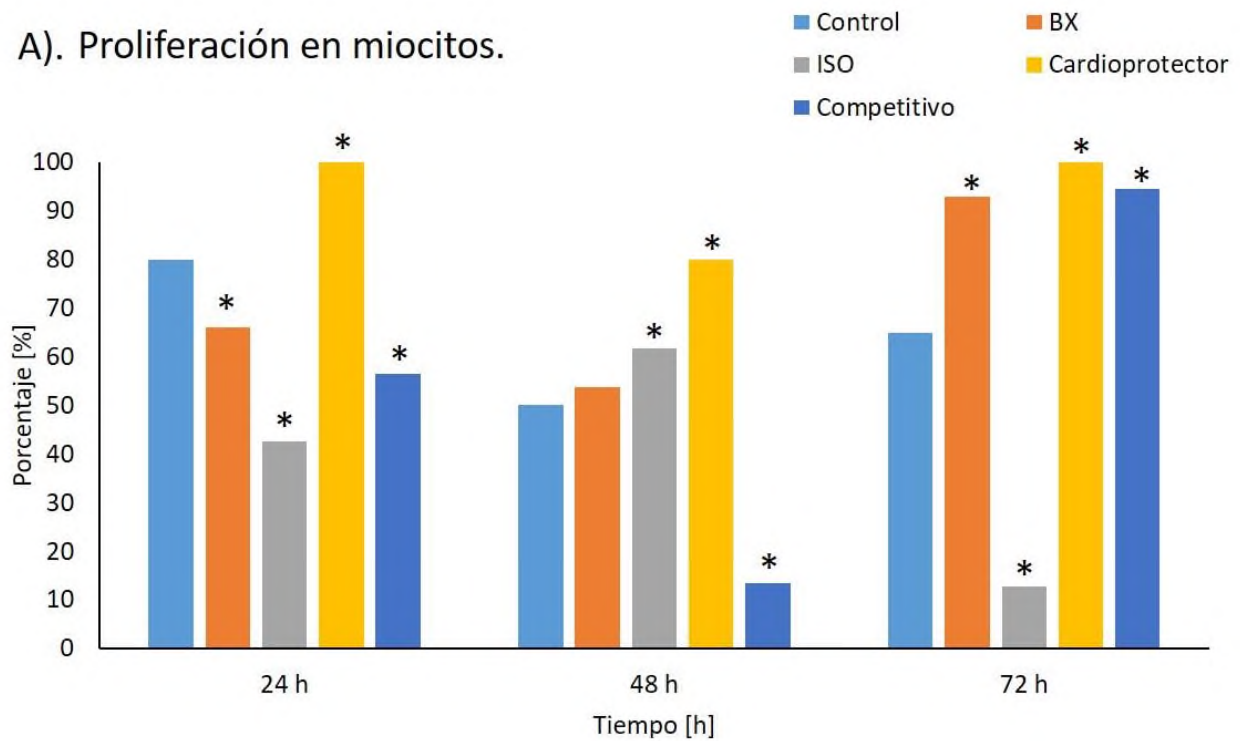
Una vez establecidas las concentraciones para estandarizar el modelo de HC en cultivo primario de miocitos neonatales y con la finalidad de determinar si BX ejerce un efecto protector en los miocitos ante un estímulo hipertrófico, realizamos estudios de cultivo *in vitro*, tratando a los miocitos con BX antes del tratamiento con ISO. Para evaluar si este agente podría interferir o impedir el desarrollo de la HC. Para ello, evaluamos miocitos previamente tratados con 13 μM de BX por 24h y después sometidos al estímulo hipertrófico con ISO 10 μM a tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h.

7.3.1. Tasa de proliferación vs apoptosis en miocitos.

En la figura 15 A se puede notar que la proliferación determinada por la presencia de PCNA fue del 100 % en los miocitos previamente tratados con BX y sometidos a un estímulo hipertrófico a las 24 h. Cabe mencionar que la presencia de PCNA fue observada después de 48 y 72 h en más del 80% de los miocitos. Este proceso fue corroborado cuando se analizó la actividad apoptótica mediante la técnica de TUNEL (figura 3B) el cual tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) desde las 24 hasta las 48 h con respecto al control. De esta manera, encontramos que BX regula el crecimiento del miocito como señal de inicio de hipertrofia, también observamos que favorece su actividad mitótica.

En la figura 15 B se muestra el gráfico que indica el porcentaje relativo de apoptosis en los miocitos, note que los miocitos previamente tratados con BX y después sometidos al estímulo hipertrófico no presentan índices de apoptosis, mientras que el grupo tratado solo con BX 24 h y después agregarle solo medio de cultivo este si presenta en un 50% a las 48 h, sin embargo este porcentaje es significativamente menor que el presentado en el control a ese tiempo. Esto indica que el BX administrado como protector está reduciendo la apoptosis en los miocitos.

A). Proliferación en miocitos.



B). Apoptosis en miocitos.

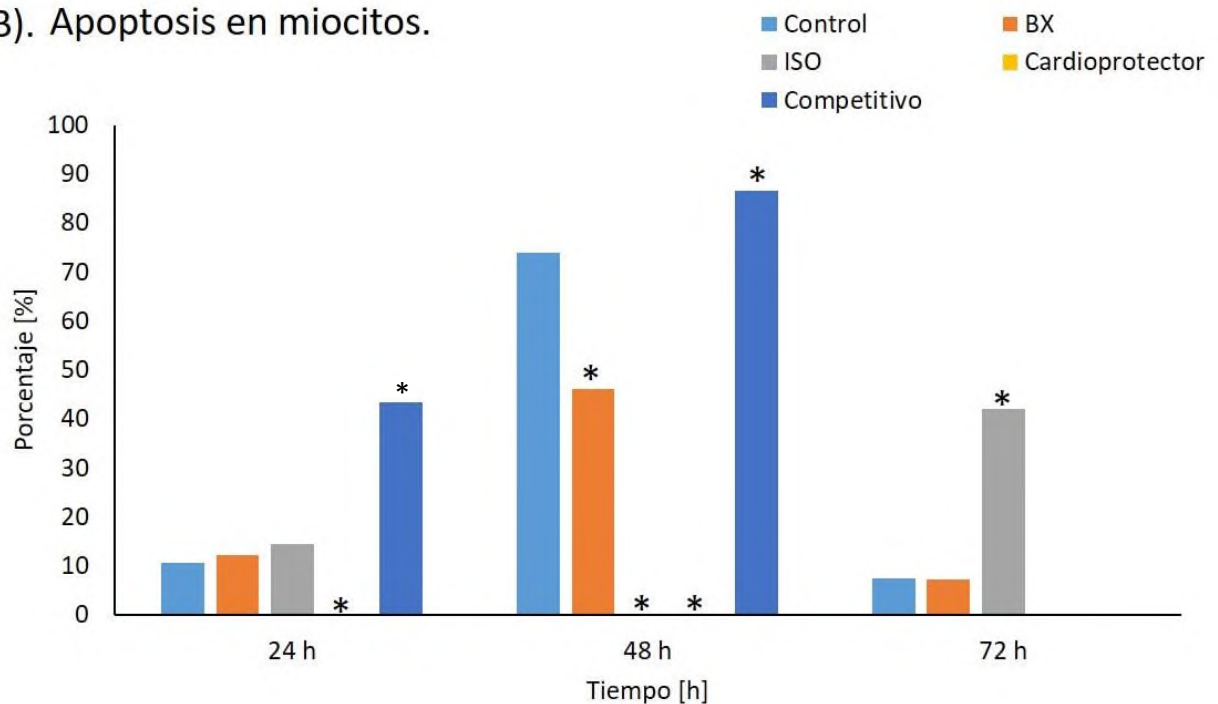


Figura 15. Análisis de proliferación y apoptosis en miocitos en ensayos cardioprotector y competitivo.

A) Porcentaje de proliferación en miocitos.

B) Porcentaje de Apoptosis en miocitos. Note que los miocitos tratados con ISO presentan una disminución significativa en la proliferación celular Además no se localizaron miocitos apoptóticos. El ensayo competitivo se describe y analiza más adelante.

*representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

7.3.2. Análisis *in vitro* del incremento de tamaño de los miocitos.

En la tabla 6 se observa que los miocitos al ser tratados con BX por 24 h antes del estímulo hipertrófico por 24 h, la ganancia de tamaño fue solo del 16.1% en comparación con el control, aunque este valor es significativamente mayor que el control este aun es 0.5 menor que el tamaño alcanzado por los miocitos que no recibieron un pretratamiento con BX por 24 h. Cabe destacar que el efecto de BX parece regular el crecimiento pese al estímulo hipertrófico prolongado a las 48 y 72h, puesto que las células se mantuvieron en un rango de tamaño que oscila en 3,400 μm^2 , mientras que el cultivo control siguió incrementando de tamaño como usualmente ocurre en cultivo primario. El hecho de que se den valores negativos en el incremento de tamaño indica que los miocitos ya no están cambiando de área y se están manteniendo al mismo tamaño observado en el momento de la primera medición incluso estos valores son iguales al control a 24 h.

Tabla 6. Valores de tamaño de los miocitos cultivados *in vitro* en ensayos cardioprotector y competitivo.

Tiempo	Grupo									
	Control		BX		ISO		Ensayo cardioprotector		Ensayo competitivo	
	$\bar{X}a \pm s$	$\bar{X}a \pm s$	Δ	$\bar{X}a \pm s$	Δ	$\bar{X}a \pm s$	Δ	$\bar{X}a \pm s$	Δ	
24 h	3315.2 \pm 351.8	3573.3 \pm 357.1	1.8%	4684.1 \pm 269.4	33.4%*	4075 \pm 467.5	16.1%*	3497 \pm 405.2	0.4%	
48 h	3472.5 \pm 424.63	3509.9 \pm 441.3	3.7%	6240.9 \pm 582.6	77.8%*	3400.6 \pm 469.2	-3.1%	3459.4 \pm 704.5	-1.4%	
72 h	3592.4 \pm 480.8	3258.2 \pm 369.1	-7.2%	6784.2 \pm 1142.3	93.3%*	3055.4 \pm 190.3	12.9%*	3056.1 \pm 545.3	-13%	

Área celular [=] $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$, n=100 células.

$\bar{X}a$: Media, s: desviación estándar, Δ : Incremento, μM : micromolar, %: porcentaje, -: valor negativo.

*representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

7.3.3. Análisis histológico.

En la figura 16 se muestran los cambios histológicos de los miocitos previamente tratados con BX a 13 μM y sometidos a un estímulo hipertrófico. En términos generales observamos células irregulares con alta actividad mitótica, poco incremento de citoplasma, similar al control. Los tratamientos con BX y en el ensayo de Cardioprotección muestran un fenotipo similar al control, lo que indica que los miocitos no están siendo alterados a pesar de recibir el estímulo hipertrófico, el ISO no está generando ningún efecto negativo.

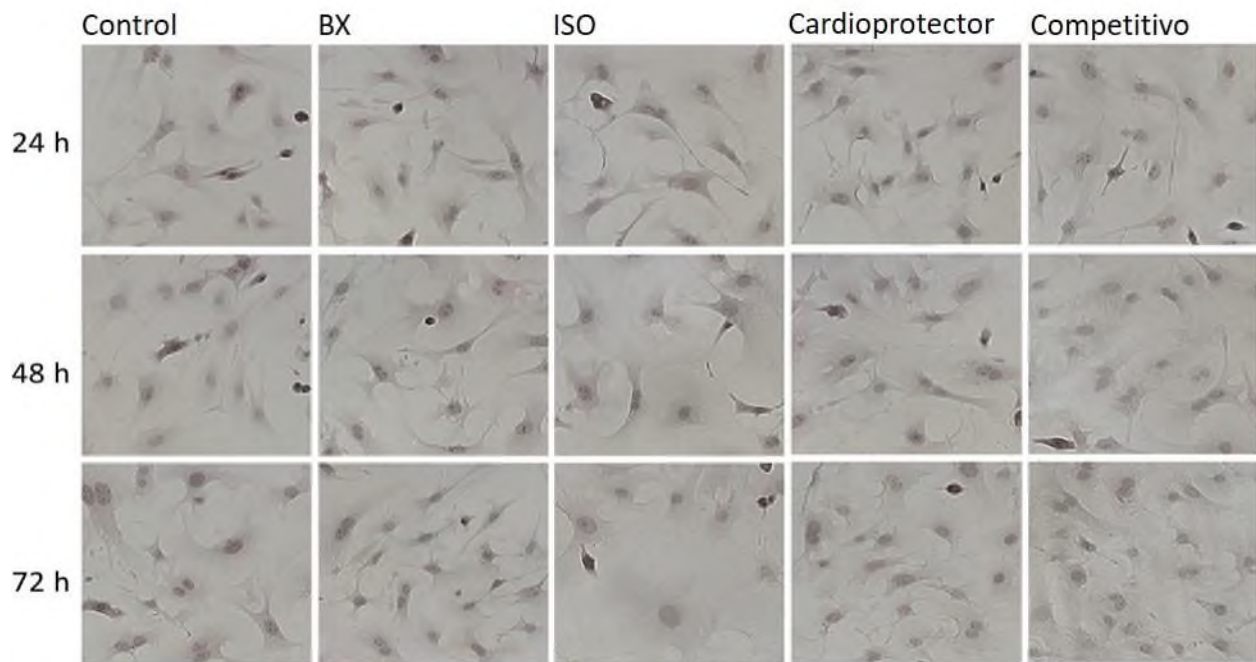


Figura 16. Micrografías de cultivo de miocitos de ensayo cardioprotector y competitivo. Observe la ganancia de citoplasma cuando los miocitos son tratados con ISO $10\mu\text{M}$ desde las 24 h. Note en ambos ensayos (cardioprotector y competitivo) no se logra observar una diferencia en el tamaño de las células comparadas con el control.

7.3.4. Análisis de expresión de genes de respuesta temprana a la HC.

En la figura 17 A, podemos notar que el mensajero de *c-Myc*, se sobre expresa desde las 24 hasta las 72 h en relación con el control (3.6, 3.6, 10.5 veces más respectivamente). Por lo que respecta al mensajero de *c-Fos* (figura 17 B), su expresión se mantiene por debajo del control desde las 24 h hasta las 48 h, pero a las 72 h alcanza niveles de expresión superiores al control (10.5 veces más). La misma respuesta de sobreexpresión fue encontrada al evaluar el mensajero de *c-Jun* (figura 17 C) a las 72 h (9.8 veces más que el control). Lo que indica que la maquinaria de respuesta temprana a la hipertrofia [22] sí se está activando en cuanto a *c-Myc*, pero el BX parece reprimir a los mensajeros de *c-Fos* y *c-Jun* y esta debe ser la razón por la cual no se desencadene todo el mecanismo de respuesta hipertrófica pues en el análisis anterior vemos que el miocito no incrementa de tamaño.

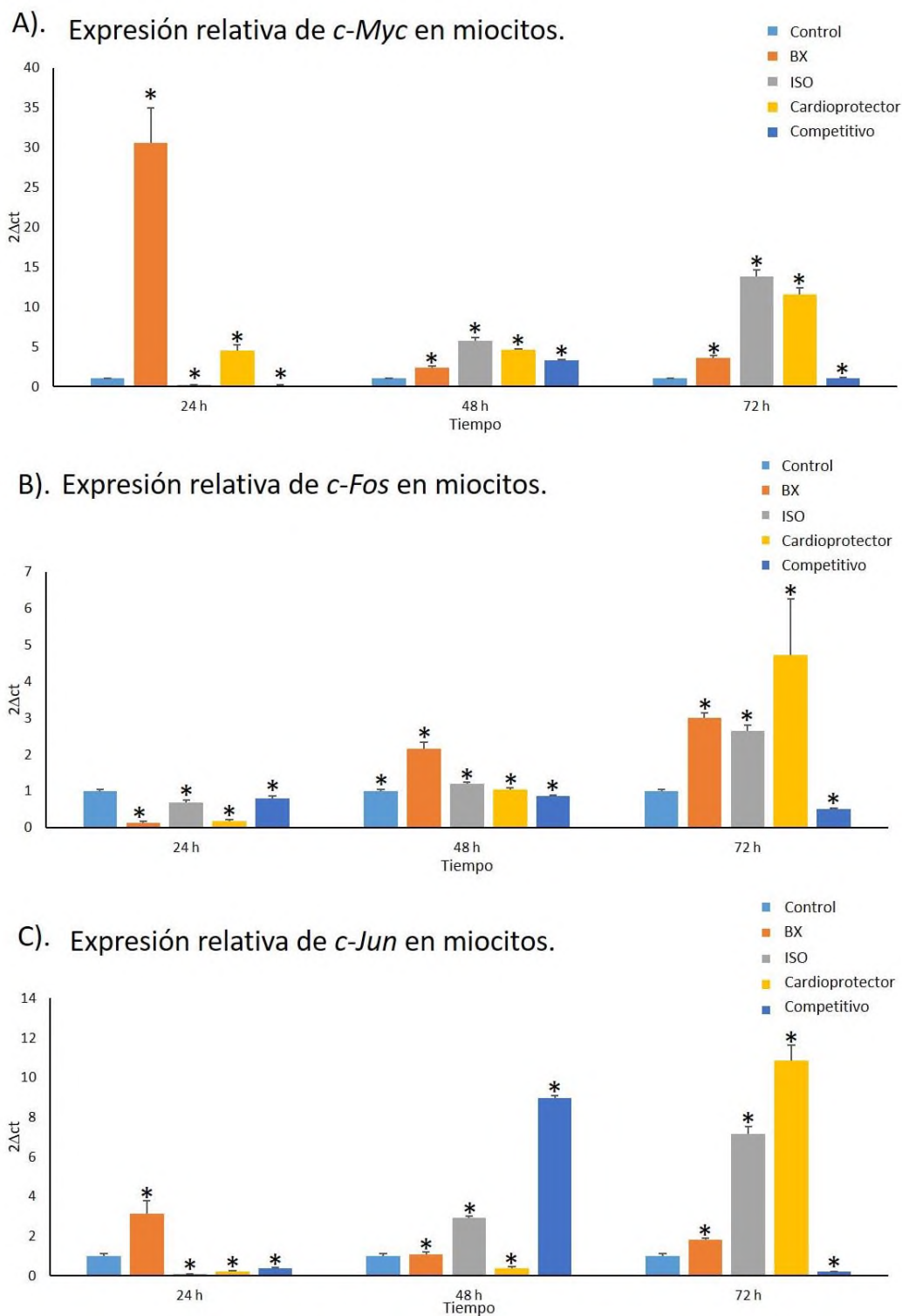


Figura 17. Análisis de la expresión de marcadores de respuesta temprana en miocitos en ensayo cardioprotector y competitivo.

A) Expresión relativa de *c-Myc* en miocitos. B) Expresión relativa de *c-Fos* en miocitos. C). Expresión relativa de *c-Jun* en miocitos. Los valores presentados indican el $2\Delta\Delta_{ct}$ de cada tratamiento. *representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control.

7.3.5. Análisis de factores de transcripción de respuesta tardía a la HC.

En la figura 18 se muestra el porcentaje de expresión relativa de los genes de respuesta tardía a la hipotrofia. Mediante inmunofluorescencia se determinó que GATA-4, MEF2c, NFAT, Miogenina y Nkx2-5 esta presente en más del 92 % de los miocitos previamente tratados con BX y sometidos a un estímulo hipertrófico por 24 h (con diferencias significativas $p < 0.05$ en todas las unidades experimentales), de forma interesante la expresión de NFAT, GATA-4 y Nkx2-5 disminuyó hasta el 0%, 9% y 40% respectivamente, en las células cuando el estímulo hipertrófico duro 48h. En contraste a las 72h, solo MEF2c, Nkx2-5 y NFAT fueron determinados en los miocitos. CDK9, solo fue encontrado a las 48h en el 88% de las células sin presentar diferencias significativas ($p < 0.05$) comparado con el control. BX por si solo favorece la expresión del mensajero de *c-Myc*, dicha expresión podría estar correlacionada la presencia de GATA4, determinada por inmunofluorescencia.

Diversas investigaciones sugieren que GATA4 es un regulador suficiente para la generación de HC [44, 45], sin embargo también se ha demostrado que GATA4 requiere de una modificación postraducciona (fosforilación) regulada por otros factores de transcripción tales como MEF2c, Csx/Nkx2-5 (factor de transcripción homeobox cardiaco Csx/Nkx2-5), NFAT entre otros [45]. BX podría reducir la actividad de esta cascada, debido a que puede fosforilarse y de esta forma son capaces de secuestrar a GATA4, evitando la sinergia con los otros factores de transcripción antes mencionados. Además BX ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) en disolución al liberar iones sodio y capturar iones de calcio intracelular, podría reducir la actividad de la calcineurina, proteína implicada en la desfosforilación de NFAT, al acoplarse con DAG [6]. Por tanto NFAT al no ser desfosforilado no se asocia a MEF2c, y la falta del grupo fosfato limita la actividad de GATA4, evitando la síntesis excesiva de proteínas del sarcómero.

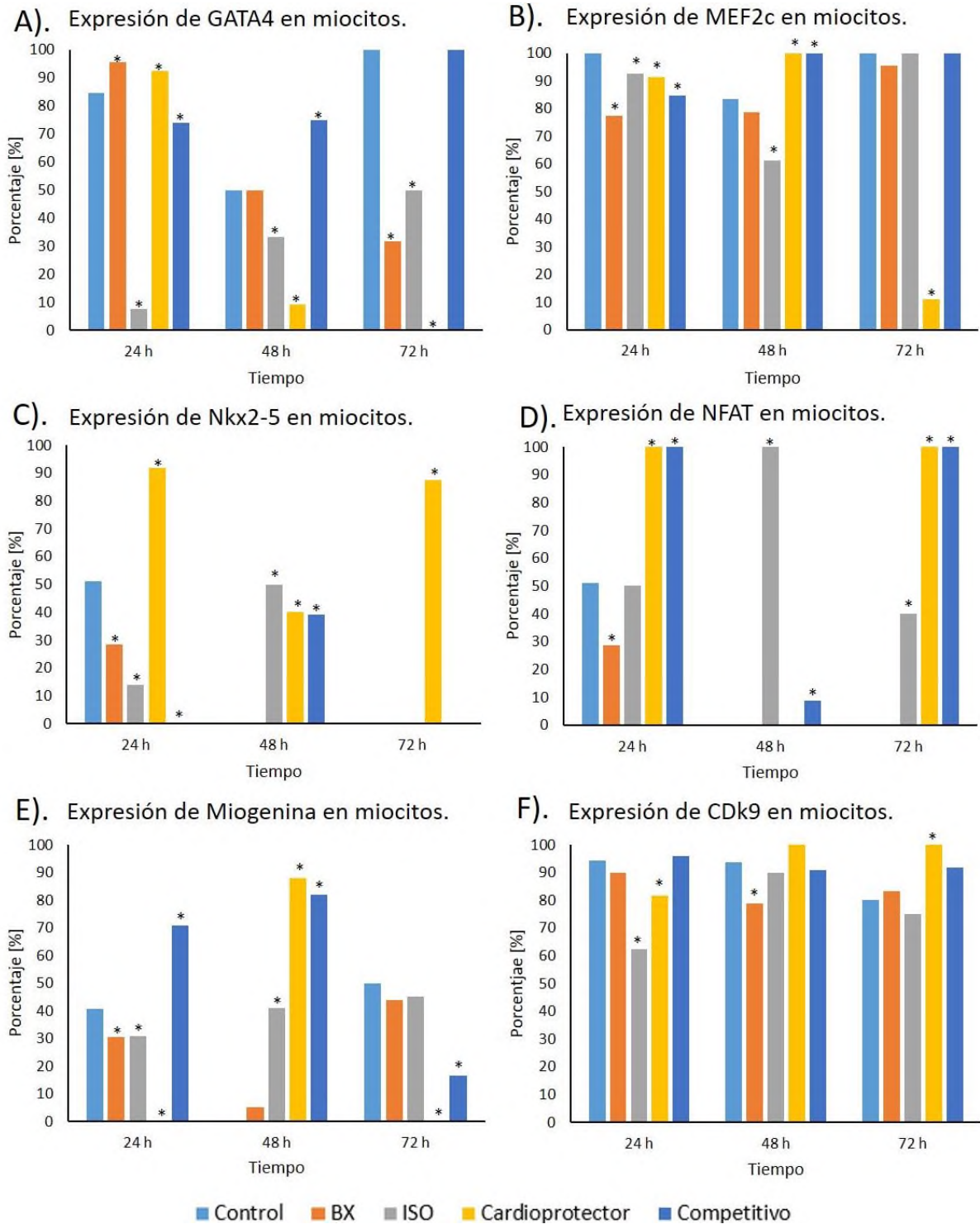


Figura 18. Análisis de la expresión de marcadores de respuesta tardía en miocitos en ensayos cardioprotector y competitivo.

A). Expresión de GATA4 en miocitos. B). Expresión de MEF2c en miocitos. C). Expresión de Nkx2-5 en miocitos. D). Expresión de NFAT en miocitos. E). Expresión de Miogenina en miocitos. F). Expresión de CDK9 en miocitos. Los valores presentados indican los porcentajes con relación a las medias de los tratamientos que presentaron positivo para el marcador correspondiente, el conteo fue de 20 células por tratamiento. *representa un valor estadísticamente significativo comparado con el control, con un valor de $p < 0.05$ para todas las unidades experimentales.

En la figura 19 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/MEF2c por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. Note que la expresión de GATA4 se presenta a las 24 y 72 h en cambio la expresión de MEF2c existe en los diferentes tratamientos y a diferentes tiempos con una expresión a niveles bajos.

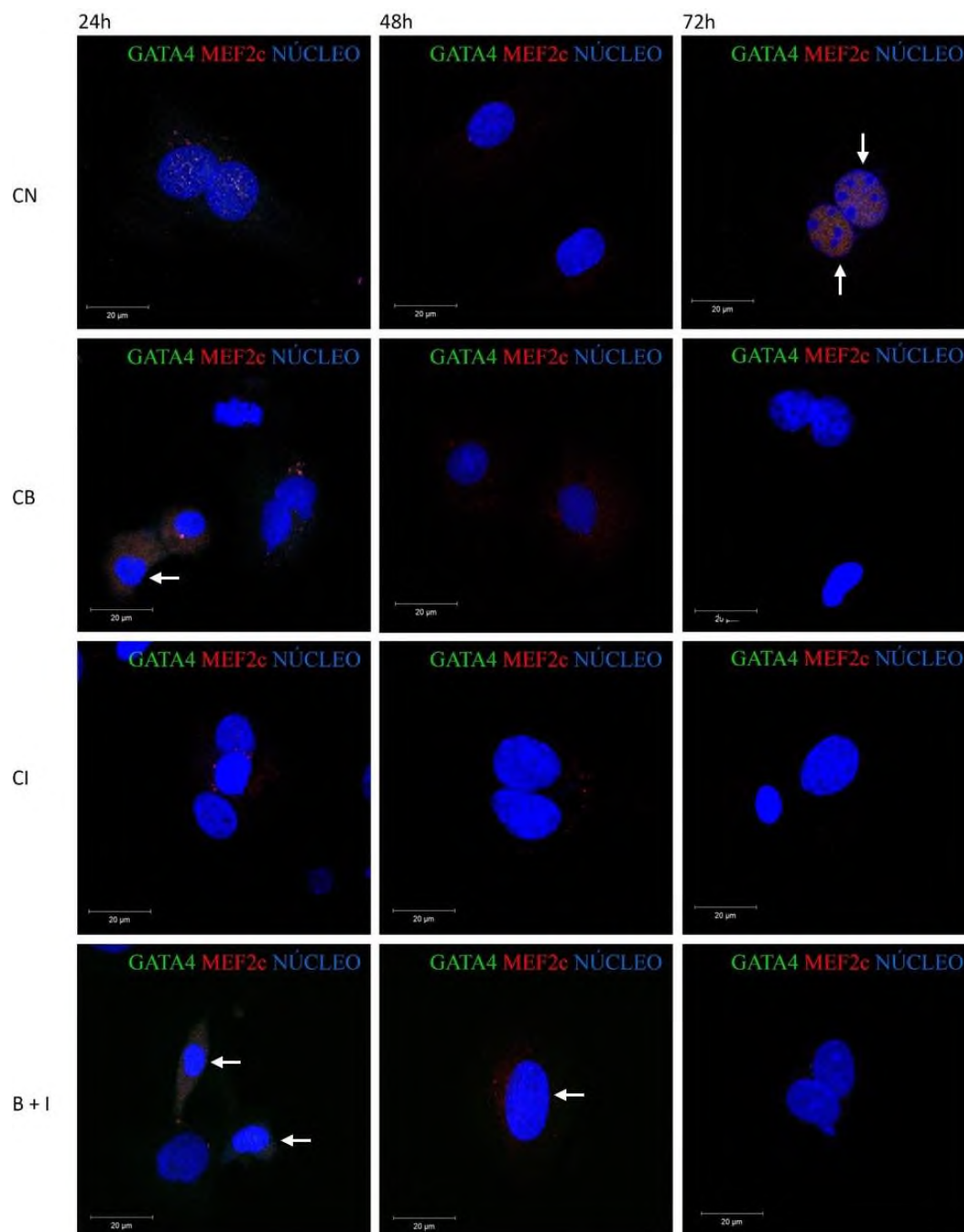


Figura 19. Análisis de la expresión de GATA4/MEF2c por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector.

Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 20 se muestra el análisis de la expresión de NKx2-5/NFAT por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. Note que la expresión de ambos marcadores es inconstante, sin embargo predomina a las 24 h y 72 h.

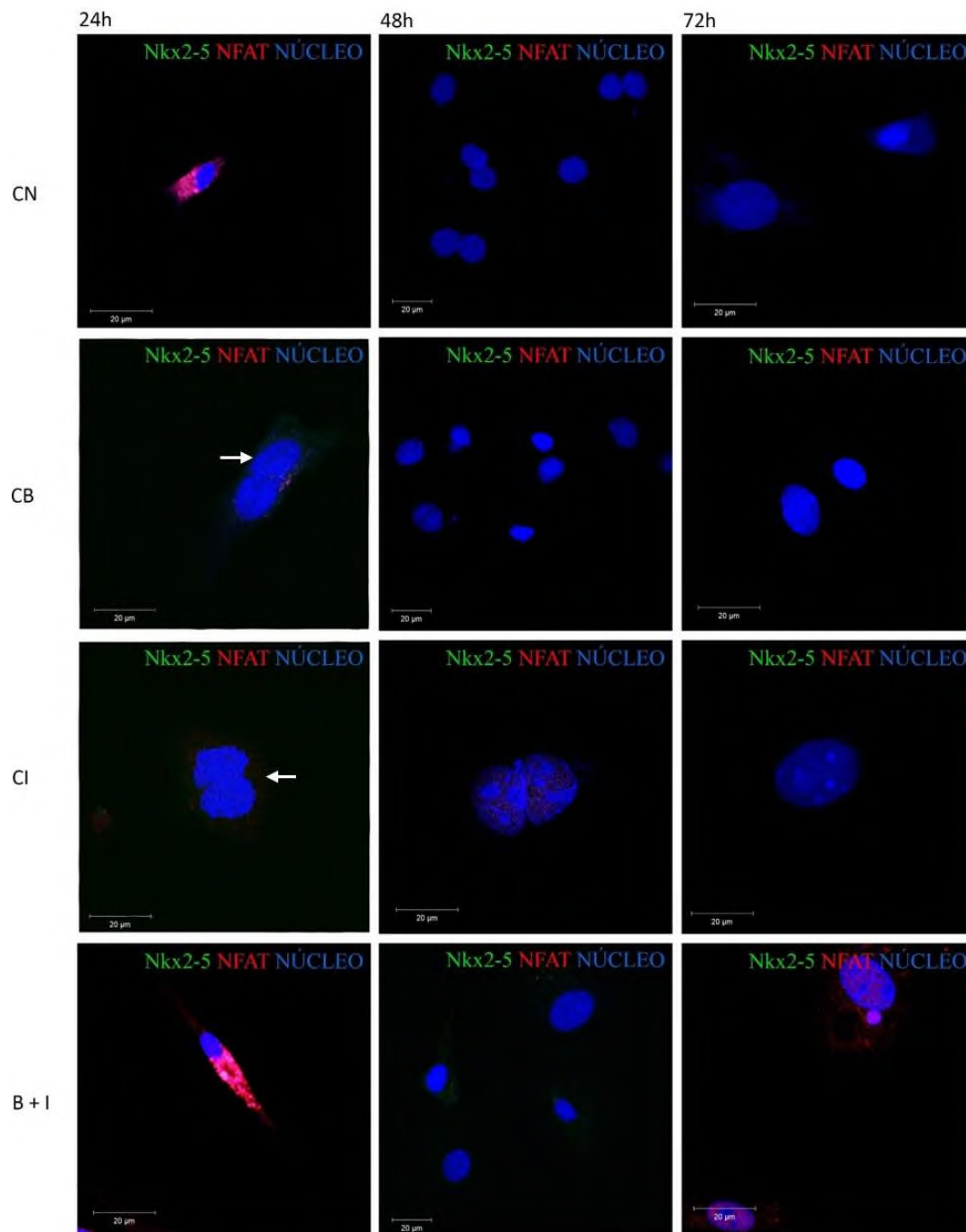


Figura 20. Análisis de la expresión de NKx2-5/NFAT por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 21 se muestra el análisis de la expresión de Miogenina/CDK9 por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. Observe que Miogenina solo se detecta a las 48 h del ensayo cardioprotector. Además que la detección de CDK9 es muy baja en el control tratado con ISO (CI).

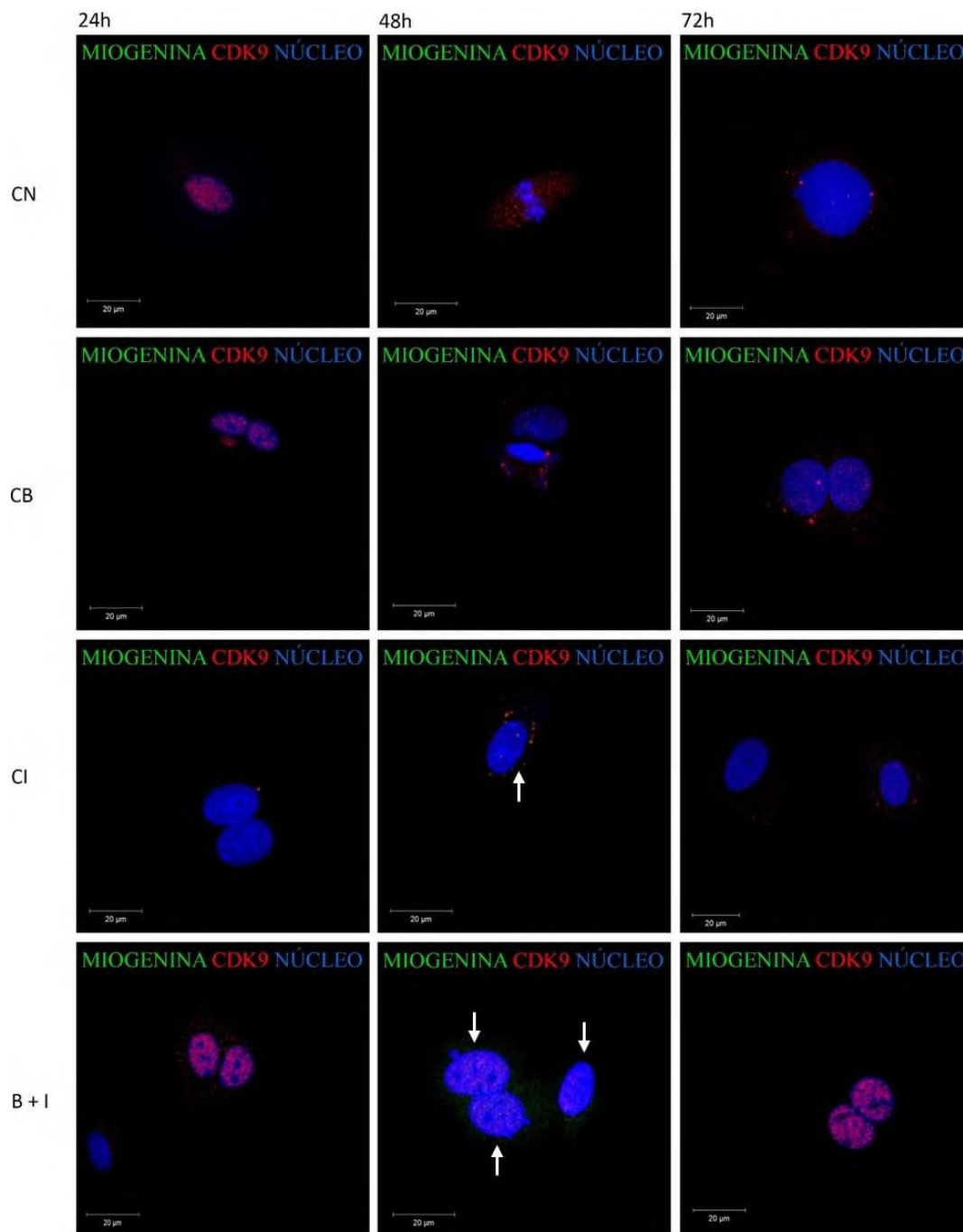


Figura 21. Análisis de la expresión de Miogenina/CDK9 por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo cardioprotector. Las flechas blancas indica cofocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

De acuerdo con lo observado en las inmunofluorescencias nos indican que existe una respuesta tardía a la hipertrofia, sin embargo estos factores de transcripción no están actuando como en una respuesta hipertrófica patológica [10, 19, 46-48] y esto se corrobora con el análisis histológico pues no hay incremento de tamaño.

Por otra parte, se sabe que BX activa diversas enzimas antioxidantes y que favorecen la disminución de EROS que se presenta durante el estrés celular [27, 33, 34], por tanto creemos que la capacidad antioxidante del BX, mejora la actividad de defensa antioxidante del miocito sometido a un estímulo hipertrófico, reduciendo la vía de señalización de PLC el cual desencadena la respuesta temprana y tardía en la hipertrofia cardiaca [49], los cuales fosforilan diversos sustratos celulares importantes para los procesos de crecimiento y diferenciación celular, que finalizan en HC patológica [6].

7.4. **Análisis *in vitro* del ensayo competitivo en miocitos sometidos a un estímulo hipertrófico.**

Con la finalidad de determinar si BX ejerce un efecto competitivo en los miocitos ante un estímulo hipertrófico, realizamos estudios de cultivo *in vitro*, tratando a los miocitos con BX 13 μ M simultáneamente con ISO 10 μ M. Para evaluar si este agente pudiera interferir o impedir el desarrollo de la HC. Para ello, evaluamos a los miocitos a tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h.

7.4.1. **Tasa de proliferación vs apoptosis en miocitos.**

En la figura 15 A presentado anteriormente, se muestra el porcentaje relativo de expresión a PCNA en la barra cuyo nombre es “competitivo”; a las 24 h solo el 56% de los miocitos son positivos, dicha expresión se redujo a un 13% a las 48 h. Esto quiere decir que el ISO ejerce una respuesta desfavorable a las primeras h de exposición porque reduce la proliferación de los miocitos, sin embargo el efecto de ISO se reduce en presencia de BX a las 72 h donde vemos un incremento de hasta 94% de miocitos positivos a PCNA dicho efecto es corroborado al analizar la tasa de apoptosis (figura 15 B) el cual a 24 y 48 h la tasa de apoptosis es superior al control y solo a las 72 h no presenta diferencias significativas con relación al control, lo que indica que el ISO está afectando negativamente a los miocitos y que el BX no alcanza a ejercer un papel en contra del ISO, pues la proliferación de los miocitos es reducida en un 50% aproximadamente.

7.4.2. **Análisis del incremento de tamaño de los miocitos.**

En la tabla 6 presentada anteriormente se observa que los miocitos al ser tratados con BX antes del estímulo hipertrófico por 24 h, la ganancia de tamaño es nula en comparación con el control, al parecer la presencia de BX impide el efecto del ISO en el tamaño celular, dicho efecto no se ve reducida al prolongar el tiempo hasta las 72 h, por lo que los resultados obtenidos son muy similares al grupo de miocitos que recibió solo el tratamiento con BX. Esto indica que a pesar de que existe una baja en la proliferación de los miocitos, el BX de alguna forma impide la

ganancia de tamaño, regulando la respuesta hipertrófica que pudiera ocasionar el ISO, sin embargo el mecanismo por el cual se desencadene este efecto aún se encuentra desconocido.

7.4.3. Análisis histológico.

En la Figura 16 presentado anteriormente, podemos notar que el efecto hipertrófico del ISO es reducido en presencia de BX, por lo que los miocitos permanecen con una morfología semejante al grupo control, con gran actividad mitótica y poco incremento de citoplasma, similar a las células del grupo control. Lo que indica claramente que ISO no genera cambios fenotípicos en presencia de BX.

Posiblemente BX también favorece la estabilidad de la membrana celular, tal y como lo hace con las plantas, pues el boro participa con diversas enzimas y otras proteínas plasmáticas a través de la membrana y su integridad, está involucrado también en el potencial de membrana, transporte de calcio y funcionalidad de ATPasa [26].

7.4.4. Análisis de expresión de genes de respuesta temprana a la HC

En la figura 17 mostrado anteriormente, en la barra cuyo nombre es competitivo podemos notar que los mensajeros de *c-Myc*, *c-Fos* y *c-Jun* permanecen sub-expresados en los miocitos cuando son tratados con BX e ISO simultáneamente, desde las 24 h hasta las 72 h, esto sugiere que la respuesta temprana a la hipertrofia no se activa al exponer a los miocitos a BX y a ISO simultáneamente, debido a que los genes de respuesta temprana no están elevados con relación al control, además de que estos resultados muestran que el BX aunque no está favoreciendo la proliferación celular, este se encuentra disminuyendo el efecto hipertrófico. En contraste cuando las células son tratadas solo con ISO, *c-Myc* y *c-Jun* se sobre expresan a las 48 h lo que claramente indica que se está dando una respuesta hipertrófica; mientras que al tratar miocitos solo con BX, *c-Myc* se incrementa 4.5 veces más con relación al control este resultado sumado a los resultados presentados en la sección donde se analiza la proliferación de BX indica que se está desencadenando una vía para la proliferación celular y que *c-Myc* está involucrado

en este proceso, sin embargo la cascada que probablemente se llegase a activar aún sigue siendo desconocido.

7.4.5. Análisis de factores de transcripción de respuesta tardía a la HC.

En la figura 18 presentada anteriormente, se muestra el porcentaje relativo de expresión de los factores de transcripción de respuesta tardía a la hipertrofia; determinamos que los factores GATA4, MEF2c, NFAT y Miogenina están presentes en más del 73% de los miocitos cuando son tratados con BX e ISO simultáneamente desde las 24 h hasta 72 h, lo que significa que se desencadenan los mecanismo de respuesta tardía a la hipertrofia, sin embargo al observar que el tamaño y el fenotipo de los miocitos tratados con ambos compuestos (tabla 6 y figura 16) y que son estadísticamente iguales que el control, nos indica que estos factores de transcripción no logran finalizar la respuesta y producir proteínas estructurales que atrofian al miocito y entorpecen su funcionalidad [1]; de forma interesante la expresión de Nkx2-5 fue determinada solo a los 48 h en el 39% de las células este factor de transcripción actúa en conjunto con GATA4, NFAT, MEF2c, CDK9 [22] para desencadenar los genes fetales involucrados en la HC, al mantenerse a niveles bajos la respuesta hipertrófica no se da adecuadamente y esto explicaría porque los miocitos no incrementan de tamaño, aunque GATA4 es suficiente para desencadenar la reprogramación de los genes fetales este factor de transcripción no actúa solo y al faltar Nkx2-5 implica que no se están produciendo los transcritos de las proteínas estructurales del sarcómero y si lo hacen estarían produciéndose en una cantidad muy baja el cual el miocito probablemente si pueda contrarrestar, lo que a su vez impediría que haya un exceso de EROS que generan activación de otras cascadas de señalización en la respuesta hipertrófica [15]. Además e encontró que para GATA4, MEF2c y CDK9 no existen diferencias significativas a las 72 h de tratamiento, esto indica que a tiempos prolongados estos mecanismos se mantienen regulados. Estos hechos nos sugieren que BX es capaz de minimizar el estímulo hipertrófico, además de ser un mineral de rápida absorción y fácil eliminación, por tanto este no se acumula [28].

En la figura 22 se muestra el análisis de la expresión de GATA4/MEF2c por inmunofluorescencia en miocitos del ensayo competitivo. Note que en los tratamientos con BX y en el ensayo

competitivo existe detección abundante de GATA4 en el citoplasma y en núcleo. Lo que indica que el miocito no está preparado para responder adecuadamente al estímulo hipertrófico y por tanto se desencadena la respuesta hipertrófica [46].

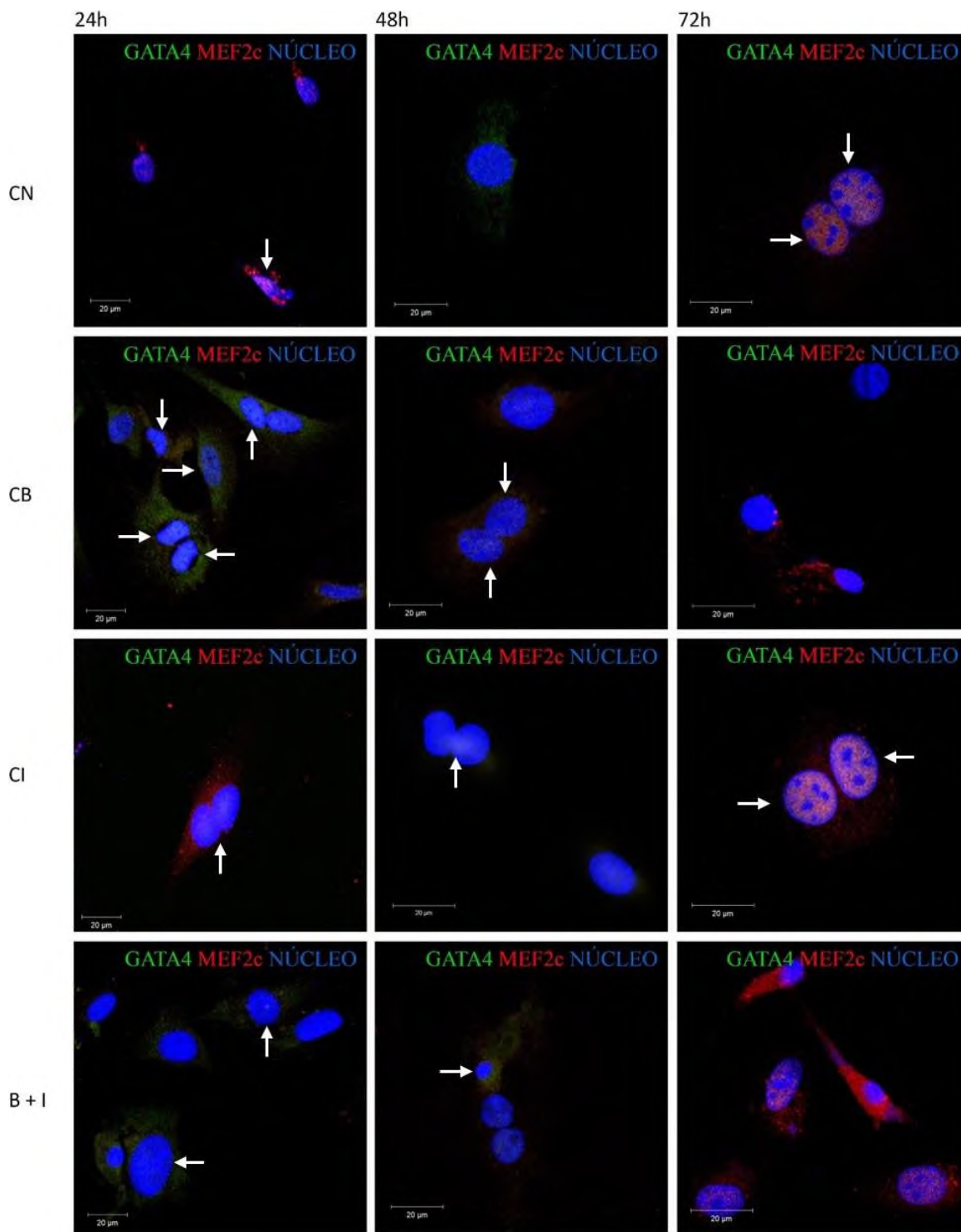


Figura 22. Análisis de la expresión de GATA4/MEF2c por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 23 se muestra el análisis de la expresión de NKx2-5/NFAT por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Note la ausencia de NKx2-5 en casi todos los tratamientos, así como la presencia de NFAT en el citoplasma en el control así como en el ensayo competitivo.

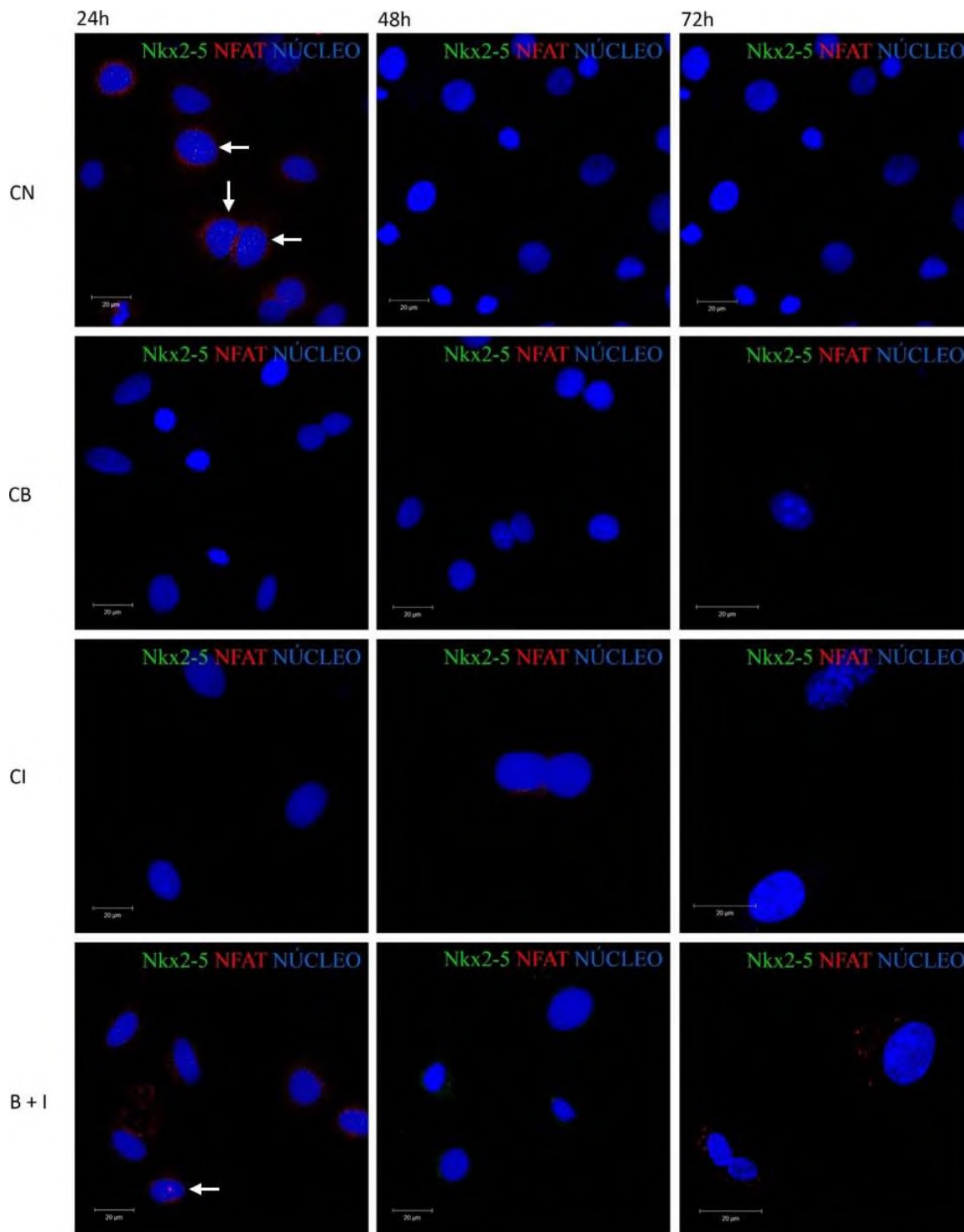


Figura 23. Análisis de la expresión de NKx2-5/NFAT por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

En la figura 24 se muestra el análisis de la expresión de Miogenina/CDK9 por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Note la presencia de Miogenina en todos los tratamientos y en todos los tiempos mientras que CDK9 es detectado en menor manera casi imperceptible en los tratamientos a las 24 h.

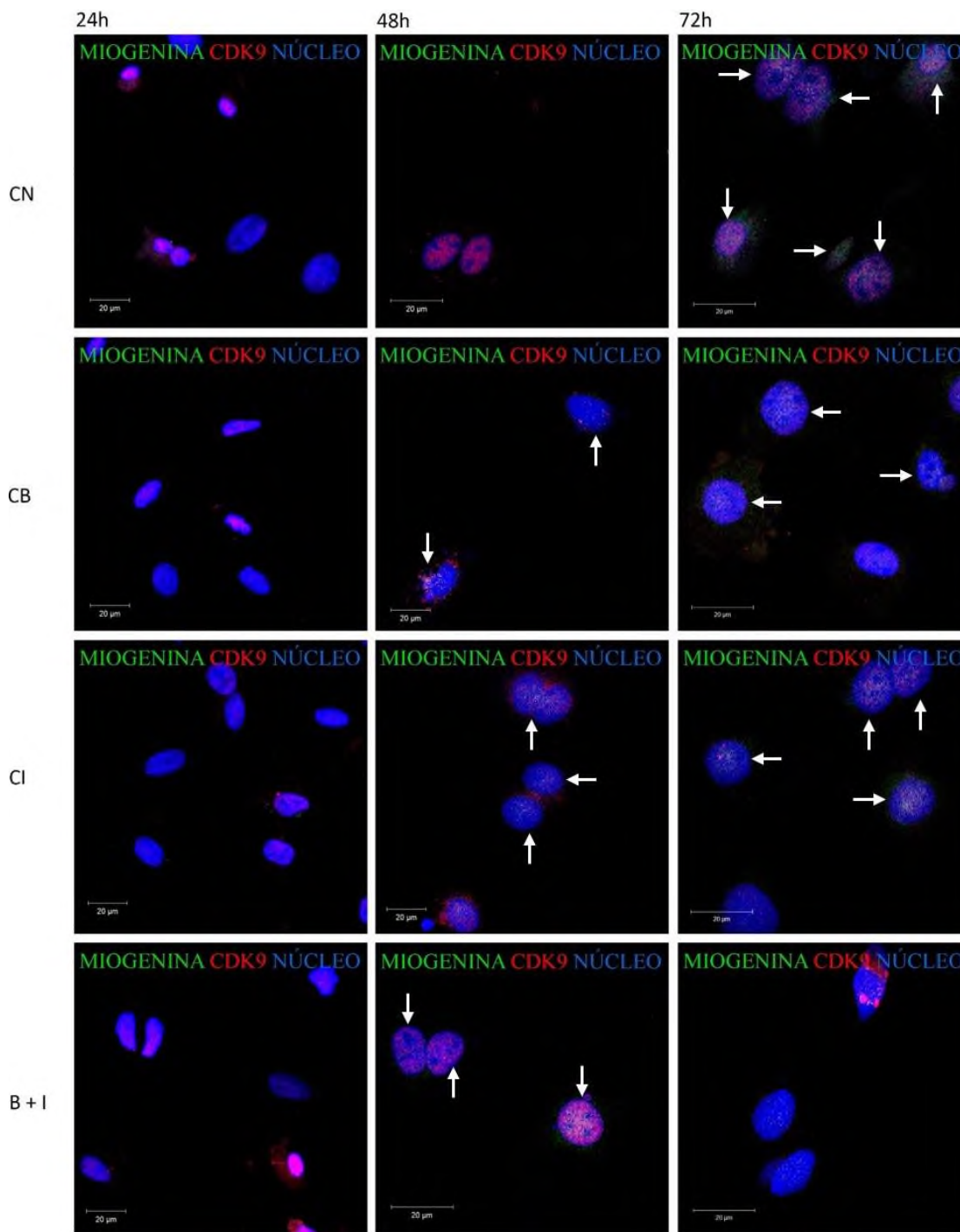


Figura 24. Análisis de la expresión de Miogenina/CDK9 por inmunofluorescencia en miocitos de ensayo competitivo. Las flechas blancas indica colocalización de señal de los anticuerpos secundarios empleados.

A la luz de los hallazgos obtenidos en el presente estudio, se sugiere que los alimentos suplementados de boro podrían proteger el tejido cardiaco contra el estímulo hipertrófico inducido por la estimulación de un β adrenoreceptor, sin embargo esto primero tendría que ser probado en diversos modelos animales de HC. Los presentes resultados también sugieren nuevas direcciones potenciales para estudios adicionales sobre los efectos biológicos de los compuestos de boro.

En este trabajo se usó el BX como fuente de boro pues se sabe que se absorbe en el organismo sin importar la fuente de origen (BA, BX, COL, UX) y presentan los mismos efectos fisiológicos [32], el boro en sí, no es un antioxidante, sin embargo, fortalece el sistema de defensa antioxidante del tejido, aunque se desconoce qué mecanismos estén involucrados en el proceso [34].

8. Conclusiones.

Los miocitos expuestos a 13 μM de BX, no presentaron diferencias morfológicas y moleculares con respecto al control. Mientras que los miocitos tratados con 26 y 39 μM presentaron alteraciones morfológicas.

La concentración adecuada de ISO para generar el estímulo hipertrófico y a su vez para generar HC *in-vitro* fue de 10 μM el cual incrementa en un >60% el tamaño celular poco después de las 24 h después del estímulo y este cambió se mantuvo estable a las 48 y 72 h.

Los miocitos al ser tratados con BX antes del ISO disminuyeron su crecimiento acelerado, su actividad mitótica fue favorecida y se redujo la apoptosis por lo que el BX ejerció un papel protector y benéfico ante el estímulo hipertrófico en el miocito.

La administración en paralelo de BX e ISO minimizó el daño hipertrófico en el miocito, evitó el crecimiento acelerado e inhibió la apoptosis, hubo una respuesta tardía en la expresión de *c-Myc* y *c-Jun*, que se correlaciona con la presencia tardía de los factores GATA4, MEf2c y Nkx2-5. Por lo que el BX ejerció un papel benéfico en el miocito al impedir el daño que pudiese ocasionar el ISO.

De acuerdo con los resultados del trabajo también se concluye que el tratamiento realizado en el ensayo de cardioprotección con el BX es mejor que el ensayo competitivo.

Por tanto se acepta la Hipótesis y se llega a la conclusión de que el bórax tiene un efecto cardioprotector en los miocitos de cultivo *in vitro* y evita el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por isoproterenol.

9. Perspectivas.

La siguiente etapa de este proyecto será evaluar el efecto *in-vivo*, comprobar si el BX tiene el mismo efecto cardioprotector en un modelo murino establecido, probar si el BX tiene un efecto competitivo en un modelo murino, probar si el BX revierte la HC en un modelo murino con HC inducida, probar si el BX tiene un efecto en ratones con HC congénita, lo cual ayudará a entender el papel de este elemento químico en el sistema de cardioprotección contra la hipertrofia.

10. Referencias.

1. Escudero, E.M., O.A. Pinilla, and I.L. Ennis, *Left ventricular remodeling: Concepts and usefulness of Echocardiography*. 2010. Rev Bras Ecocardiogr imagen cardiovasc 23(4):55-68
2. Liu, L., et al., *Suppression of calciumsensing receptor ameliorates cardiac hypertrophy through inhibition of autophagy*. Mol Med Rep, 2016. **14**(1): p. 111-20.
3. Lilly, L., *Cardiología. Bases Fisiopatológicas de Las Cardiopatías, 6e*. 2016: Wolters Kluwer Health.
4. OMS. *Información general sobre la HIPERTENSIÓN en el mundo*. 2013; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf?ua=1.
5. UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA, K.S.O.M. *Cardiothoracic surgery, Glossary of terms, Cardiac Hypertrophy*. 2017; Available from: <http://www.cts.usc.edu/zglossary-cardiachypertrophy.html>.
6. Carreño, J.E., et al., *Hipertrofia cardíaca: eventos moleculares y celulares*. Revista Española de Cardiología, 2006. **59**(05): p. 473-486.
7. De La Serna, F. and L. Lobo Marquez, *Insuficiencia cardíaca crónica*. Federación Argentina de Cardiología, 2010. *Sección Hipertensión arterial. Edición electrónica*. www.fac.org.ar/publicaciones.
8. Escudero, E.M. and E.I. L., *Hipertrofia cardíaca*, in *Tratado de Cardiología de la Federación Argentina de Cardiología. Sección Hipertensión arterial. Edición electrónica*. www.fac.org.ar/publicaciones. 2010.
9. Papait, R., et al., *Epigenetics: a new mechanism of regulation of heart failure* Basic Research in Cardiology, 2013. **108**(4): p. 361.
10. Fiedler, B., et al., *Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(17): p. 11363-11368.
11. Shimoyama, M., et al., *Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy*. Circulation, 1999. **100**(24): p. 2449-2454.
12. Komuro, I., et al., *Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(7): p. 3595-3598.
13. Chien, K.R., et al., *Transcriptional regulation during cardiac growth and development*. Annual Review of Physiology, 1993. **55**(1): p. 77-95.
14. Komuro, I., et al., *Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart*. Circulation Research, 1988. **62**(6): p. 1075-1079.
15. Cheng, T.-H., et al., *Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. **42**(10): p. 1845-1854.
16. Chang, S., et al., *Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(19): p. 8467-8476.

17. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(1): p. 32-42.
18. Zhang, C.L., et al., *Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy*. Cell, 2002. **110**(4): p. 479-488.
19. Zhang, T., et al., *CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(48): p. 35078-35087.
20. Ago, T., et al., *A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy*. Cell, 2008. **133**(6): p. 978-993.
21. Matsushima, S., et al., *Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy*. Circulation research, 2012: p. CIRCRESAHA. 112.279760.
22. Klingbeil, A.U., et al., *A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension*. The American journal of medicine, 2003. **115**(1): p. 41-46.
23. Stehlik, J., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report—2012*. The Journal of heart and lung transplantation, 2012. **31**(10): p. 1052-1064.
24. Martínez-González, M.A., et al., *Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: a Spanish cohort*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2011. **21**(4): p. 237-244.
25. Reuter, D. and J.B. Robinson, *Plant analysis: an interpretation manual*. 1997: CSIRO publishing.
26. Acuña, A.M. and P.E.C. Molina, *Desempeño funcional del boro en las plantas*. Revista Científica UDO Agrícola, 2007. **7**(1): p. 1-14.
27. Pawa, S. and S. Ali, *Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(2): p. 89-98.
28. Moseman, R.F., *Chemical disposition of boron in animals and humans*. Environmental Health Perspectives, 1994. **102**(Suppl 7): p. 113.
29. Devirian, T.A. and S.L. Volpe, *The physiological effects of dietary boron*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003. **43**(2): p. 219-31.
30. Hunt, C.D., *The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 7**: p. 35-43.
31. Ince, S., et al., *The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats*. J Trace Elem Med Biol, 2010. **24**(3): p. 161-4.
32. Turkez, H., et al., *Effects of some boron compounds on peripheral human blood*. Z Naturforsch C, 2007. **62**(11-12): p. 889-96.
33. Turkez, H., et al., *The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood*. Experimental and Toxicologic Pathology, 2012. **64**(1-2): p. 93-101.
34. Turkez, H., et al., *In vitro studies on chemoprotective effect of borax against aflatoxin B1-induced genetic damage in human lymphocytes*. Cytotechnology, 2012. **64**(6): p. 607-12.
35. Parameswaran, S., et al., *Cardiomyocyte culture — an update on the in vitro cardiovascular model and future challenges*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2013. **91**(12): p. 985-998.

36. Gross, D., *Animal models in cardiovascular research*. 2009: Springer Science & Business Media.
37. Diaz, R.J. and G.J. Wilson, *Studying ischemic preconditioning in isolated cardiomyocyte models*. *Cardiovascular research*, 2006. **70**(2): p. 286-296.
38. Ehler, E., T. Moore-Morris, and S. Lange, *Isolation and Culture of Neonatal Mouse Cardiomyocytes*. 2013(79): p. e50154.
39. Alejandra, C.R., *Participación de los factores de crecimiento FCF1, NRG y sus receptores en la regulación de la proliferación celular durante la morfogénesis de los tercios medio y apical del tabique interventricular en embrión de pollo*, in *División de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 2008, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa: Ciudad de México. p. 156.
40. Pluciennik, A., et al., *PCNA function in the activation and strand direction of MutLa endonuclease in mismatch repair*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(37): p. 16066-16071.
41. Matsumoto, K., et al., *Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin*. *The EMBO journal*, 1987. **6**(3): p. 637-642.
42. Lodish, H., *Biología celular y molecular*. 2005: Ed. Médica Panamericana.
43. Salazar, M.M., *Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud*. *Revista colombiana de biotecnología*, 2009. **11**(2): p. 152-166.
44. Akazawa, H. and I. Komuro, *Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy*. *Circulation research*, 2003. **92**(10): p. 1079-1088.
45. Morisco, C., et al., *Glycogen synthase kinase 3 β regulates GATA4 in cardiac myocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(30): p. 28586-28597.
46. Liang, Q., et al., *The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(32): p. 30245-30253.
47. Morin, S., et al., *GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters*. *The EMBO Journal*, 2000. **19**(9): p. 2046-2055.
48. Takimoto, E., et al., *Up-regulation of natriuretic peptides in the ventricle of Csx/Nkx2-5 transgenic mice*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2000. **270**(3): p. 1074-1079.
49. Carreño, J.E., et al., *Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares*. *Revista española de cardiología*, 2006. **59**(5): p. 473-486.

11. Anexos.

I. Soluciones:

I.I. PBS 1X.

Cloruro de sodio (NaCl)	11.94 g
Fosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄)	8.51 g
Fosfato de potasio (KH PO ₄)	3.48 g
Aforar con Agua destilada a	1000 mL
Esterilizar a 121 °C a 15 lb de presión.	
Almacenar a 4°C	

I.II. Paraformaldehído 4% en PBS 1X.

Paraformaldehído	4 g
PBS 1X pH 7.4	100 mL

Procedimiento:

Calentar el PBS a 60°C, agregar poco a poco el PFA, e ir agitando hasta que la disolución se transparente. Si se presenta turbidez agregar 1 mL de NaOH 1N.

I.III. Medio de cultivo (DME+SFB 10% + AB 1x).

DMEM	44.9 mL
Suero Fetal Bovino 100%	5 mL
Antibiótico 1000U/mL	500 µL

Procedimiento:

En tubo falcon de 50 mL, agregar 44.9 mL de medio de cultivo DMEM, agregar posteriormente el Suero fetal bovino estéril, y el antibiótico, cerrar el tubo falcon y mezclar por inversión suave hasta que se integren los reactivos. Almacenar a 4 °C hasta su uso, calentar a 37°C antes de su uso.

I.IV. Disolución de Bórax.

La disolución se preparó pesando 38.14 μg de BX y aforando a 10mL con H_2O desionizada lo que nos resultó en una solución de BX a 10 mM.

Se utilizó la fórmula de equilibrio de disoluciones ($C_1V_1=C_2V_1$) para preparar la disolución stock 1 mM de BX, para lo cual medimos 1000 μL de stock 10mM y aforamos a 10 mL (10,000 μL) con Medio de cultivo (Anexo 1 c) estéril.

Elaboramos disoluciones de BX de 13, 26 y 39 μM a partir de la Stock de 1 mM, se realizaron los despejes y cálculos correspondientes con la fórmula de equilibrio. Para cada concentración deseada obtuvimos la siguiente tabla.

Concentración deseada (C2)	Volumen final (V2)	Concentración Stock (C1)	Volumen de stock (V1)
13 μM	50 mL	1000 μM	0.65 mL
26 μM	50 mL	1000 μM	1.3 mL
39 μM	50 mL	1000 μM	1.95 mL

1. Añadir el volumen de sol stock de isoproterenol 1 mM de acuerdo a la concentración deseada.
2. Aforar con medio de cultivo (Anexo I. c.) a 50 mL
3. Almacenar a 4°C hasta su uso.
4. Calentar a 37 °C previo a usarlo.

I.V. Disolución de isoproterenol.

Elaboramos una solución Stock de ISO 10 mM utilizando la fórmula de equilibrio de disoluciones es como se realizó la disolución Stock.

Preparar la solución stock 10 mM con:

36.14 μL de Sol concentrada

Aforar a 10 mL (10,000 μL) con PBS 1X estéril.

Elaborar Solución stock de ISO 1mM.

A partir de la Stock de 10 mM realizar los despejes y cálculos correspondientes con la fórmula de equilibrio con un volumen final (V2 de 10 mL).

Preparar la solución stock 1 mM con:

1 mL de Sol. ISO 10 mM

Aforar a 10 mL con PBS 1X estéril.

Elaborar disoluciones de Isoproterenol 5, 10 y 15 μ M.

A partir de la Stock de 1 mM se realizaron los despejes y cálculos correspondientes con la fórmula de equilibrio. Para cada concentración deseada obtuvimos la siguiente tabla.

Concentración deseada (C2)	Volumen final (V2)	Concentración Stock (C1)	Volumen de stock (V1)
5 μ M	50 mL	1000 μ M	0.25 mL
10 μ M	50 mL	1000 μ M	0.5 mL
15 μ M	50 mL	1000 μ M	0.75 mL

Añadir el volumen de sol stock de ISO 1 mM de acuerdo con la concentración deseada.

Aforar con medio de cultivo (Anexo I. c.) a 50 mL

Almacenar a 4°C hasta su uso.

Calentar a 37 °C previo a usarlo.

I.VI. Disolución de Isoproterenol 10 μ M más Bórax 13 μ M (ensayo competitivo).

- a) A partir de las disoluciones stock de ISO 1 mM y BX 1 mM y utilizando la fórmula de equilibrio y despejando obtenemos que para preparar 50 mL de disolución de Isoproterenol 10 μ M más BX 13 μ M, se necesita:

0.5 mL de Sol. Stock ISO 1 mM

0.65 mL de Sol. Stock BX 1 mM

Aforar con medio de cultivo (Anexo I. c.) a 50 mL

Almacenar a 4°C hasta su uso.

Calentar a 37 °C previo a usarlo.

I.VII. Disoluciones para Hematoxilina - Eosina.

- a) Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina en Cristales	2.5 g
Etanol 96%	25 mL
Alumbre de amonio de potasio	50 g
Agua destilada	500 mL
Oxido rojo de mercurio	1.25 g

Procedimiento:

Disolver la hematoxilina en el etanol, calentando ligeramente y separando el recipiente. En 100 mL de agua destilada disolver el alumbre previamente calentado ligeramente. Mezclar ambas disoluciones y lavarlos con los 100 mL de agua restantes. Hervir la mezcla a 300°C, al iniciar el hervor, retirar el recipiente del calor, añadir el óxido rojo de mercurio, seguir calentando a 40°C, hasta que la disolución tome un color rojo púrpura. Enfriar la disolución rápidamente con agua. Filtrar 10 veces para eliminar sedimentos de amonio. Por cada 100 mL de hematoxilina añadir de 4 a 5 mL de ácido acético, la mitad al finalizar la preparación y el restante al usarla.

b) Eosina de Carnegie:

Eosina	4 g
Etanol 96%	100 mL
Agua destilada	300 mL

Procedimiento:

Disolver primero la eosina en agua y añadir posteriormente el etanol. Dejar madurar a la luz y en frasco claro durante tres semanas. Guardar en el mismo frasco. Si se usa eosina amarillenta, para lograr una tinción adecuada, añadir tres gotas de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante.

II. Técnicas

II.1 H-E Tinción de Hematoxilina Eosina.

La Técnica que se utilizó en esta tesis fue de acuerdo con la metodología estandarizada del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana.

1. Se retiró el medio de cultivo de la placa P35.
2. Se realizaron 4 lavados con PBS 1%.

3. Las células fueron fijadas con PFA 4% e incubadas por 24 h.
4. Se realizaron 4 lavados con PBS 1%.
5. Las células fueron post-fijadas con Etanol al 70% e incubadas por 24 h.
6. Se retiró todo el Etanol y las células fueron hidratadas con agua destilada por 5 minutos.
7. Se tiñeron los citoplasmas con Hematoxilina, por un periodo de 5 minutos.
8. Se realizaron 4 lavados con PBS 1%.
9. Se tiñeron los núcleos con Eosina, por un periodo de 1 minuto.
10. Se realizaron 4 lavados con PBS 1%.
11. Se agrego 25 μ L de solución de montaje (PBS/Glicerol 1:1).
12. Se colocó un cubreobjetos en la superficie.
13. Se procedió a visualizar en el microscopio.

II.2 Disgregación celular de la placa de cultivo.

La Técnica que se utilizó en esta tesis fue de acuerdo con la metodología estandarizada del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana.

1. Se retiró el medio de cultivo de la placa P35.
2. Se realizaron 4 lavados con PBS 1%.
3. Se agrego 400 μ L de tripsina al 0.05%.
4. La digestión enzimática fue incubada a 37°C durante 5 minutos.
5. Las enzimas fueron inactivadas con 1 mL de DMEM + SFB 10% + Antibiótico 1%.
6. Todo el sobrenadante fue colectado en un tubo eppendorf y centrifugado a 13000 rpm 5 minutos.
7. Se retiró todo el sobrenadante del tubo eppendorf
8. Se realizó un lavado de la placa de cultivo con 1mL de PBS 1% y el líquido fue colectado en el tubo eppendorf previamente centrifugado.
9. Se repitió el procedimiento 6-7.
10. Las células resultantes en el botón fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

II.3 Conteo de células con cámara de Neubauer.

1. Realizar el despegue celular descrito en el apéndice II. b. hasta el paso No 9.
2. Agregar 1 mL de medio de cultivo al tubo eppendorf y realizar diluciones 1:10, 1:100 utilizando PBS 1X.
3. Colocar el cubreobjetos a la cámara de Neubauer previamente limpiado con Etanol al 70%.
4. Colocar 20 μ L de la dilución a cada lado de la cámara.

5. Colocar la cámara de Neubauer en el microscopio óptico, enfocar en 10x.
6. Si hay exceso de células en la dilución 1:10 hacer el conteo en 1:100, en cambio si hay muy pocas células, realizar diluciones 1:2, 1:5.
7. Realizar el conteo de las células que haya en los cuadros grandes de las esquinas.
8. Realizar el cálculo de la concentración celular.

II.4 Ensayo de apoptosis por TUNEL.

1. Las células sembradas en cubreobjetos con cámara de cultivo de 8 pozos una vez finalizados sus tratamientos según su estudio, fueron fijados con PFA 4% y post-fijadas con Etanol 70%.
2. Las membranas celulares fueron permeabilizadas con PBS 1% - Tritón 0.05%.
3. Posteriormente las laminillas se trataron con solución de equilibrio (20 s).
4. Los núcleos fueron permeabilizados con proteinasa K por 30 minutos a 37 °C.
5. Se adicionó la solución de reacción con enzima TdT y se incubó por una h a 37°C.
6. La actividad enzimática fue detenida con solución de paro y se adicionó antidigoxigenina (α -DIG) acoplado a un fluoróforo por 1 h a temperatura ambiente.
7. Los núcleos fueron teñidos con Draq7 (BioStatus, United Kingdom) durante 20 min y se empleó PBS-Glicerol 1:1 como medio de montaje, los cubreobjetos fueron sellados, para facilitar la observación.

Las muestras fueron analizadas empleando un microscopio confocal y como programa de captura Zen 2009. 5 micrografías para cada anticuerpo fueron evaluadas.