



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Papel del factor de transcripción asociado a microftalmia en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica

María Luz Gunturiz Albarracín

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias
Doctorado en Biotecnología
Bogotá D.C, Colombia
2014**

Papel del factor de transcripción asociado a microftalmia en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica

María Luz Gunturiz Albarracín
Código 837020

Trabajo de grado presentado para optar al título de Doctor en Biotecnología

Director
Luis Alberto Gómez Grosso

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias
Doctorado en Biotecnología
Bogotá D.C, Colombia
2014

A la memoria de mis padres

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado y ayudado en mi trayectoria profesional, y más concretamente, en la culminación de la presente Tesis Doctoral. En particular, mis agradecimientos van dirigidos a las siguientes personas:

En primer lugar, a mi director de Tesis Doctoral, Doctor Luis Alberto Gómez Grosso, por el tiempo invertido, su enorme paciencia, su sensatez y pragmatismo con el que ha abordado las distintas etapas de la investigación. Sin su ayuda y el estímulo que me ha proporcionado, este trabajo no hubiese sido posible.

Quiero expresar mi agradecimiento al Instituto Nacional de Salud y al Programa de Doctorado en Biotecnología, por permitirme avanzar en mi trayectoria profesional y brindarme el apoyo académico.

Con todo mi afecto agradezco a la Doctora Elizabeth Castañeda, al Doctor Santiago Nicholls y a la Doctora Patricia Landazurí por su apoyo desde el inicio del Doctorado y por el voto de confianza que me brindaron a través de sus cartas de recomendación para el ingreso al programa.

Debo, asimismo, mostrar un agradecimiento más específico, a los doctores Oscar Oliveros, Patricia Landazurí y Daniel Uribe que formaron parte del panel de expertos y que han permitido con su inestimable colaboración que la investigación llegue a buen fin. A los evaluadores de la tesis, los doctores Juan José Yunis, Patricia Landazuri y Cecilia Hertig por sus aportes, observaciones y sugerencias.

Deseo también expresar mi agradecimiento a los compañeros con los que he compartido mi espacio de trabajo, por su apoyo, consideración y paciencia.

A Jorge Rivera, María Leonor Caldas y Marcela Neira, de los Grupos de Morfología Celular y Bioquímica y Biología Celular de la Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, por los cortes histológicos efectuados.

Expreso mi más profundo agradecimiento a mis amigos Jairo Méndez, Martha Gracia, Linda Molano, Belsy Tibaduiza, Fabio Quintero, Luis Ayala, Patricia Escandón, José Usme, Yibby Forero, Sofía Duque, Adriana Arévalo y Sandra Barrera, por infundirme ánimo, cariño y serenidad para poder llevar a cabo este otro proyecto de mi vida y brindarme momentos muy gratos.

A Rodolfo y su hermosa familia por su amor, entrega, compañía y por brindarme una nueva y maravillosa vida.

Resumen

El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) es una proteína de unión a DNA que regula la expresión de genes específicos. A nivel cardíaco no se conocen los cambios asociados con la disminución de su expresión en cobayo, por tanto, el objetivo del trabajo fue determinar la función de MITF en células cardíacas ventriculares adultas sometidas a condiciones de lesión y protección y evaluar cambios en la expresión de genes regulados por MITF como potenciales indicadores en estas condiciones fisiológicas. El análisis de expresión de MITF-H se determinó por PCR en tiempo real, qPCR, y *western blot*. La isoforma H de MITF se expresa en corazones y miocitos cardíacos aislados de cobayo. La disminución de su expresión asociada con los incrementos en el índice cardíaco y en el tamaño de las fibras cardíacas, así como con los cambios en la viabilidad celular sugieren que MITF-H podría estar involucrado en hipertrofia cardíaca, en la supervivencia de los cardiomiocitos y en la respuesta al estrés por isquemia.

Palabras clave: isquemia, pre-acondicionamiento isquémico, miocitos cardíacos, microftalmia, corazón, regulación de la expresión génica, hipertrofia

Abstract

The Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is a DNA binding protein that regulates the expression of specific genes. It is suggested that MITF plays a role in cardiac growth and hypertrophy. Therefore, the objective was to determine the role of MITF in under conditions of injury and protection adult ventricular cardiac cells and evaluate changes in expression are not known MITF-regulated genes as potential indicators in these physiological conditions. Analysis of expression of MITF-M was determined by real-time PCR, qPCR and Western blotting. MITF H isoform expressed in guinea pig hearts, isolated cardiac myocytes. Decreased expression associated with increases in the heart rate and on the size of cardiac fibers, as well as changes in cell viability suggest that MITF-H may be involved in cardiac hypertrophy, in the survival of cardiomyocytes and in response to stress by ischemia.

Keywords: ischemia, ischemic preconditioning, myocytes cardiac, microphthalmia, heart, gene expression regulation, hypertrophy.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVII
Introducción	1
1. El tejido miocárdico y la célula cardiaca	3
1.1 Enfermedades cardiovasculares:	4
1.2 Factor de transcripción asociado a Microftalmia:	6
1.3 MITF y enfermedades cardiovasculares:	12
1.4 Hipótesis:	13
1.5 Objetivos:.....	13
1.5.1 Objetivo General:.....	13
1.5.2 Objetivos Específicos:	13
1.6 Diseño Experimental	13
1.6.1 Tipo de estudio	13
1.6.2 Población de estudio	13
1.6.3 Criterios de Selección.....	14
1.6.3.1 Criterios de inclusión	14
1.6.3.2 Criterios de exclusión	14
1.7 Estrategia experimental	14
2. Identificación y expresión diferencial del factor de transcripción asociado a Microftalmia en corazón y cardiomiocitos aislados, posible papel en hipertrofia y en viabilidad celular	15
2.1 Materiales y métodos	15
2.1.1 Aislamiento de miocitos cardiacos	15
2.1.2 Disminución de la expresión de MITF inducida por shRNA.....	15
2.1.3 Extracción de ARN y síntesis de cADN	16
2.1.4 Identificación de la isoforma H de MITF	16
2.1.5 PCR en tiempo real (qPCR)	17
2.1.6 Ensayos de <i>Western blot</i>	18
2.2 Resultados	18
2.2.1 Identificación y análisis de secuencia del cDNA que codifica para MITF	18

2.2.2 Disminución del mRNA y de la proteína MITF inducida por RNAs pequeños de interferencia específicos para MITF (shRNA-MITF) y cambios morfológicos a nivel cardiaco	21
2.2.3 Niveles relativos de expresión de MITF en cardiomiocitos aislados sometidos a diferentes condiciones de supervivencia	25
2.3 Discusión	27
3. Caracterización de potenciales genes diana del Factor de transcripción asociado a Microftalmia (MITF)	31
3.1 Materiales y métodos	34
3.1.1 Aislamiento de células cardiacas	34
3.1.2 Extracción de ARN y síntesis de cADN	35
3.1.3 Análisis <i>in silico</i>	35
3.1.4 Amplificación de fragmentos de genes blanco	36
3.1.5 PCR en tiempo real (qPCR)	37
3.2 Resultados:	39
3.3 Discusión	45
3.4 Conclusiones:	47
4. Monitoreo de niveles de expresión relativos a MITF y de algunos de sus potenciales genes diana	49
4.1 Macroarreglos de cADN:	49
4.2 Resultados obtenidos por pcr en tiempo real	55
5. Conclusiones y recomendaciones	61
Anexos	63
6. Bibliografía	111

Lista de figuras

	Pág
Figura 1-1: Esquema de MITF en donde se señalan sus dominios funcionales y algunos sitios sugeridos para su modificación post-traducciona	6
Figura 1-2. Representación miembros de la Familia MIT ó MITF/TFE, mostrando las homologías y diferencias en su estructura	7
Figura 1-3. Vías de señalización en las que interviene MITF	10
Figura 2-1. Identificación y secuencia que codifica para MITF en corazón completo y cardiomiocitos aislados	19
Figura 2-2. Secuencia de aminoácidos obtenida de la traducción de secuencias de nucleótidos	20
Figura 2-3. Disminución de mRNA y proteína de MITF inducida por un RNA interferente	22
Figura 2-4. Análisis histopatológico, índice cardíaco, diámetro y número promedio de fibras musculares de los corazones asociados a la disminución de RNA	24
Figura 2-5. Cambios en los niveles relativos de la expresión de MITF-H en cardiomiocitos sometidos a lesión por isquemia simulada y a protección de la viabilidad por PCI	26
Figura 3-1. Esquema de la metodología empleada para los análisis <i>in silico</i>	36
Figura 3-2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Se muestran algunos productos de amplificación por PCR de fragmentos de genes blanco de MITF	40
Figura 3-3. Resultados de PCR en tiempo real para el gen HIF-1 α	40
Figura 3-4. Resultados de PCR en tiempo real para el gen PKC- β	41

Figura 3-5.	Resultados de PCR en tiempo real para el gen Kir6.2	42
Figura 3-6.	Resultados de PCR en tiempo real para el gen EDNR- β	42
Figura 3-7.	Resultados de PCR en tiempo real para el gen MLC4	43
Figura 3-8.	Resultados de PCR en tiempo real para el gen APE-1	44
Figura 3-9.	Resultados de PCR en tiempo real para el gen CDK2	45
Figura 4-1.	Esquema de la metodología para la construcción de macroarreglos de cADN	49
Figura 4-2.	Esquema de la metodología para el marcaje de sondas de cADN	50
Figura 4-3.	Macroarreglos de cADN empleando como sondas ADN complementario obtenidos de cardiomiocitos aislados sometidos a isquemia simulada, a PCI y normoxia	52
Figura 4-4.	Macroarreglos de cADN empleando como sondas ADN complementario obtenidos de cardiomiocitos aislados sometidos a isquemia simulada, a PCI, normoxia y corazón completo	53
Figura 4-5.	Distribución de genes blanco de MITF en macroarreglos de cADN	54
Figura 4-6.	Expresión relativa de algunos genes diana de MITF cuando este factor está expresado	57
Figura 4-7.	Expresión relativa de algunos genes diana de MITF cuando este factor está disminuido en su expresión	60

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Características de las isoformas de MITF	8
Tabla 3-1. Resumen estandarización de PCR y qPCR para los diferentes genes blanco de MITF	37
Tabla 4-1. Datos expresión del gen APE-1 normalizados con GAPDH	55
Tabla 4-2 Datos expresión del gen CDK2 normalizados con GAPDH	55
Tabla 4-3 Datos expresión del gen EDNR β normalizados con GAPDH	55
Tabla 4-4 Datos expresión del gen MLC4 normalizados con GAPDH	56
Tabla 4-5 Datos expresión del gen PKC- β normalizados con GAPDH	56
Tabla 4-6 Datos expresión del gen Kir 6,2 normalizados con GAPDH	56
Tabla 4.7 Resumen ensayos de expresión para los diferentes genes cuando MITF está expresado	56
Tabla 4.8 Datos expresión macroarreglos <i>shscramble/control</i> sin interferente normalizados con GAPDH	57
Tabla 4.9 Datos expresión macroarreglos <i>shMITF/ control</i> sin interferente normalizados con GAPDH	58
Tabla 4.10 Datos expresión macroarreglos <i>shMITF/shScramble</i> normalizados con GAPDH	58
Tabla 4.11 Resumen datos de expresión macroarreglos normalizados con GAPDH cuando MITF está disminuido en su expresión	59

Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Termino
ASP	Proteína de señalización <i>Agouti</i>
bHLH	Estructura básica hélice asa hélice
Bcl2	Linfoma de células B
cAMP	Adenosín monofosfato-3', 5' cíclico
c-KIT	Receptor de tirosina cinasas
dk2	Cinasa 2 dependiente de ciclina
CRE	Elemento de respuesta a cAMP
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
EDN	Endotelina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IGF-1	Factor de crecimiento semejante a insulina 1
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MITF	Factor de transcripción asociado a Microftalmia
p300/CBP	p300 (además conocido como EP300 ó proteína de unión a E1A p300) y CBP (además conocida como CREBBP ó proteína de unión a CREB) son proteínas que actúan como co-activadores transcripcionales
pRB	Proteína de retinoblastoma
PKC	Proteína cinasa C
Pmel17	Glicoproteína específica de melanocito. También conocida como gp100
PMSF	Fenil-metil sulfonil fluoruro
Rsk1	Cinasa ribosomal S6 de 90 kDa
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
TBST	Tris Buffer Salino- Tween 20%
TPA	Éster de forbol ,12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.
TRP1	Proteína relacionada a tirosinasa 1
TRP2	Proteína relacionada a tirosinasa 2
Wnt	Del inglés " <i>Wingless</i> "
Zip	Estructura de cremallera de leucina

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares, son entidades multifactoriales, resultado de la contribución de factores ambientales y genéticos, que afectan a personas de todas las edades y se presentan con una alta tasa de mortalidad en nuestro país, siendo actualmente problemas de salud pública, y además son muy costosas en términos de discapacidad, manejo médico y quirúrgico.

A pesar del amplio conocimiento de factores de riesgo modificables de estas enfermedades y de los avances tecnológicos en los procedimientos de detección temprana, de la amplia farmacoterapia y de los procedimientos para el manejo de la enfermedad cardíaca isquémica, esta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública en el mundo y en Colombia. Por lo tanto, se requiere de investigaciones encaminadas a la comprensión de su patogénesis, al desarrollo de estrategias para la predicción de factores de susceptibilidad, al mejoramiento del diagnóstico temprano y oportuno y de terapias, que no solamente disminuyan los síntomas, sino que también reduzcan la morbilidad, mejoren la supervivencia y promuevan mejor calidad de vida (Gómez LA, 2008). Por otra parte, la fisiología celular y molecular así como las tecnologías basadas en el ADN recombinante ha permitido avances importantes en el conocimiento de mecanismos patogénicos y, más recientemente, en el diagnóstico y en nuevas estrategias terapéuticas y de prevención de enfermedades complejas con un gran impacto en la salud humana en especial en países en vías de desarrollo como Colombia.

Por lo tanto, se requiere de investigaciones básicas y aplicadas para entender e intervenir en los mecanismos moleculares asociados con estas enfermedades. Entre las enfermedades cardiovasculares la de mayor impacto por la carga que genera es la enfermedad cardíaca isquémica, que es la responsable de más del 50% de la morbimortalidad de origen cardiovascular. Aunque en los últimos 20 años se ha avanzado en el conocimiento de la biología molecular de las células cardíacas y su potencial implicación en patologías como la cardiomiopatía dilatada, se conoce muy poco sobre la identidad y la función de moléculas cardíacas que regulen su estabilidad funcional en condiciones de estrés metabólico y físico. Este desconocimiento relativo se debe en gran parte a las dificultades para estudiar estas células, ya que no existe una línea celular de origen miocárdico que se pueda mantener en cultivo y la mayoría de los estudios se debe realizar a partir de órgano completo o con cultivos primarios. No obstante, se han identificado varios blancos moleculares que pueden estar jugando un papel importante en enfermedades cardiovasculares (Gómez *et al* 1997).

En algunas enfermedades cardiovasculares se ha sugerido que la desregulación de genes tanto estructurales como reguladores de la transcripción, tales como endotelina 1, angiotensina II, cardiotrofina 1 o factor de crecimiento insulínico tipo 1, cadena pesada de la miosina, actina, miosina, tropomiosina, complejo troponina y titina, entre otros, pueden

estar influyendo en la aparición, desarrollo y progresión de estas patologías. Sin embargo, poco se sabe sobre factores de transcripción implicados en la enfermedad cardíaca isquémica.

Entre los factores de transcripción implicados en enfermedad de tejido cardíaco recientemente se publicó un artículo en el que se muestra la expresión de MITF asociada con hipertrofia cardíaca, y se evidenció que se expresa en ratones silvestres y en ratones con mutación en el gen MITF observándose una respuesta hipertrófica disminuida bajo estimulación beta-adrenérgica, con función cardíaca disminuida y tendencia a muerte súbita; adicionalmente, estos investigadores propusieron que MITF puede jugar un papel importante en la hipertrofia cardíaca inducida por beta-adrenérgicos (Tshori et al 2006).

El factor de transcripción asociado a microftalmia codifica para una proteína de unión a ADN de la familia hélice-loop-hélice cremallera de leucina básica (bHLH-Zip) que regula la transcripción de genes por unión a elementos (cajas M y E) en las regiones flanqueantes 5' de sus genes blanco. Parecido a otros factores de transcripción, la activación transcripcional del MITF está influenciada de manera compleja por diferentes proteínas intracelulares; de esta manera, por ejemplo, *in vitro*, MITF puede formar heterodímeros con los miembros de su misma familia TFEB, TFEC, TFE3. MITF es regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional y es transcrito por varios promotores alternativos, generando varias isoformas con funciones biológicas potencialmente distintas (Steingrimsson E et al, 2004). De esta manera, el exón 1m es específico de melanocitos, el 1h es expresado en corazón (por sus siglas en inglés Heart), y otros exones como por ejemplo, el 1a son expresados en más de un tipo celular; cada uno de esos exones están ampliamente espaciados en el ADN genómico y son expresados a partir de diferentes promotores (M, H y A). La regulación de la expresión de MITF ha sido estudiada a fondo solamente en melanocitos y melanoma y se sabe muy poco de su expresión y regulación en otros modelos celulares ((Tshori et al 2007).

En el grupo de Fisiología Molecular del INS, se ha desarrollado un modelo experimental de células cardíacas aisladas que pueden ser sometidas a condiciones de lesión por isquemia simulada y a protección contra isquemia inducidas por la acción de la adenosina y por preconditionamiento isquémico (PCI) que consiste en la reducción en el tamaño de la necrosis miocárdica asociada al retraso en la muerte de los miocitos. El PCI es inducido por exposición previa del corazón a episodios breves de isquemia con periodos de reperfusión (Gómez et al 1996, 1997, 2001 y datos no publicados). En isquemia cardíaca se ha reportado que puede existir una sobre estimulación beta-adrenérgica que se asocia con cambios en la citoarquitectura, disfunción y pérdida de la viabilidad miocárdica. Sin embargo, el mecanismo molecular no se conoce y menos aun si MITF puede estar implicado durante un evento isquémico cardíaco.

Específicamente, no se conoce el nivel de expresión de MITF y su papel en célula cardíaca aislada normal y en condiciones de lesión por isquemia o cardioprotección inducida. Por tanto, esta propuesta de investigación se encamina a estudiar la función de MITF en células cardíacas ventriculares sometidas a condiciones de lesión y protección *in vitro* y a evaluar su posible papel como biomarcador de la patogénesis de la enfermedad cardíaca isquémica.

1.El tejido miocárdico y la célula cardiaca

El tejido miocárdico está constituido por células cardiacas (cardiomiocitos), fibroblastos, endotelio y células sanguíneas que constantemente están fluyendo en el lecho vascular del corazón. Los cardiomiocitos constituyen cerca del 75% del volumen total del miocardio y representan la tercera parte del número total de células cardiacas. Cerca de una tercera a una cuarta parte de la célula cardiaca está constituida por mitocondrias y aproximadamente la mitad de cada miocito ventricular está ocupado por proteínas contráctiles formando miofibrillas. Los cardiomiocitos tienen forma cilíndrica, y diámetro variable dependiendo de donde sean obtenidos; así, los cardiomiocitos auriculares tienen un diámetro menor de 10 μm y cerca de 20-60 μm de longitud, mientras que los miocitos ventriculares tienen un diámetro que oscila entre los 17-25 μm de diámetro y entre 60-140 μm de longitud (Lionel *et al*, 1999).

Cada célula está unida por un complejo de membrana celular, el sarcolema, que se invagina para formar una extensa red tubular intracelular (túbulos T). Anatómicamente, el retículo sarcoplásmico (RS) es una red dispersa en todo el miocito, demarcada por su bicapa lipídica, similar a la del sarcolema. Parte del RS está en aposición con los túbulos T, en donde forma unas estructuras dilatadas que lo rodean. Estas áreas se denominan cisternas subsarcolémicas o RS de unión. La función de las cisternas es liberar calcio a través del canal liberador de calcio para iniciar el ciclo contráctil (Liew C *et al*, 2004).

La segunda parte del RS está formada por túbulos ramificados y se encarga de la recaptura de calcio, lo cual inicia la relajación. Esta recaptura se logra por medio de una bomba de calcio dependiente de ATP, también denominada SERCA (del inglés, sarcoendoplasmic reticulum Ca^{++} -ATPase), que incrementa su actividad en respuesta a estímulo beta adrenérgico. El calcio recapturado de esta forma es almacenado a altas concentraciones en proteínas de depósito, entre las que se encuentran la calsecuestrina (Miyamoto MI *et al*, 2000). Las células cardíacas, como las de otros tejidos excitables de los mamíferos, tienen una composición iónica intracelular que difiere de la extracelular. La concentración de iones potasio K^+ en el interior de la célula es unas 30 veces mayor que concentración extracelular, mientras que el sodio Na^+ es unas 30 veces menor. Como la membrana de las células cardíacas es más permeable al potasio que al sodio, en condiciones de reposo, los iones de potasio pueden salir de la célula con más facilidad de lo que pueden entrar los iones de sodio y, en consecuencia existe una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula. Se dice que la membrana de la célula está polarizada, siendo la diferencia de potencial de -90 mV (esto quiere decir que hay más cargas negativas en el interior que el exterior). Cuando un estímulo llega a una de estas células, se alteran las propiedades fisicoquímicas de la membrana, aumentando su permeabilidad al sodio.

La muerte de cardiomiocitos adultos consecutiva a los accidentes isquémicos, provoca frecuentemente el desarrollo de una insuficiencia cardíaca congestiva.

Es generalmente admitido que los cardiomiocitos pueden reproducirse solamente durante el desarrollo embrionario y fetal y en los adultos, los cardiomiocitos conservan de manera muy limitada su capacidad proliferativa; por tanto, en los pacientes adultos, la desaparición o pérdida de una parte de la población de cardiomiocitos no es compensada por la multiplicación de cardiomiocitos restantes y en el lugar del tejido funcional, se desarrolla una cicatriz fibrosa aquinética. La sobrecarga de trabajo generada, la modificación de la geometría ventricular y la distensión de la cicatriz fibrosa producen la dilatación progresiva que evoluciona hacia la insuficiencia cardíaca terminal. Frente a esta situación, las opciones terapéuticas no son numerosas. A pesar de que el tratamiento médico mejora parcialmente la supervivencia del paciente, el pronóstico permanece sombrío, ya que alrededor del 60% de pacientes sobreviven al año y solamente 30% sobreviven a los 5 años. Los trasplantes cardíacos están limitados por la escasez de donantes, las complicaciones y el costo de la inmunosupresión, así como por los rechazos potenciales. La asistencia circulatoria mecánica es esencialmente empleada en pacientes que esperan el trasplante cardíaco (Chachques JC, 2004).

1.1 Enfermedades cardiovasculares:

Las enfermedades cardiovasculares son enfermedades del sistema circulatorio, de etiología y localización diversa clasificadas en cuatro tipos principales: enfermedad cardíaca isquémica, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades vasculares periféricas y otras enfermedades; dentro de ellas la enfermedad cardíaca isquémica y las enfermedades cerebrovasculares son las más importantes ya que representan entre el 60 y 70% de la mortalidad cardiovascular total. Estas dos enfermedades suelen presentarse como fenómenos agudos cuya principal causa es la obstrucción de los vasos sanguíneos, lo que impide que la sangre fluya hacia el corazón o al cerebro, finalmente ocasionando la muerte (Corella D *et al*, 2007).

Las enfermedades vasculares periféricas afectan a las arterias y venas que irrigan principalmente extremidades superiores e inferiores; disminuyen el flujo sanguíneo y provocan estrechamiento de los vasos, inflamación y dolor. Cuando afecta las venas se forman coágulos de sangre o trombos que conducen a oclusión y pueden desencadenar trombosis venosa y cuando hay desprendimiento de los trombos, ellos se transportan a los vasos de los pulmones ocasionando la muerte por embolia pulmonar. Por otro lado, dentro del grupo de “otras enfermedades cardiovasculares”, se encuentran las cardiomiopatías congénitas y la cardiopatía reumática, patologías que producen lesiones en el miocardio y en las válvulas del corazón debidas a causas desconocidas (cardiomiopatías idiopáticas) o como en la cardiopatía reumática a infecciones causadas por bacterias (Corella D *et al*, 2007).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud-OMS, las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en el mundo, y se estima que en los próximos años la mortalidad y morbilidad cardiovasculares se incrementarán a escala mundial (años 2015-2030); en el que morirán al menos 20 millones de personas por estas enfermedades (Lim SS *et al*, 2007; Abegunde DO *et al*, 2007).

En Latinoamérica se reportó que para 1990 ocurrían 169.000 muertes anuales a causa de

la enfermedad cardiaca isquémica y se espera un incremento de 144% en esta cifra para el año 2020 (Yusuf S *et al*, 2001). En Colombia, la enfermedad cardiovascular ha sido la principal causa de mortalidad, excluyendo las causas externas, en los últimos cinco años y entre éstas, la enfermedad cardiaca isquémica se encuentra ocupando el primer lugar con más de 20.000 muertes por año (DANE, 2001).

En Colombia, las enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, son la primera causa de muerte en nuestro país y dentro de ellas la enfermedad cardiaca isquémica es la responsable del mayor porcentaje de muertes. En un estudio publicado en el 2007, para 23 países con los mayores porcentajes de mortalidad por enfermedades crónicas, se muestra que Colombia presenta mayor porcentaje de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y que en la proyección al año 2030, la enfermedad cardiaca isquémica será la principal causa de muerte (Abegunde DO *et al*, 2007).

La enfermedad cardiaca isquémica, a pesar de la farmacoterapia convencional, es la enfermedad de mayor importancia en salud pública en Colombia y en el mundo. Las enfermedades y las lesiones en tejidos altamente diferenciados como el tejido cardíaco y neuronal, conducen a la destrucción y muerte, sin el subsiguiente reemplazo celular específico, a pesar de que conservan la maquinaria molecular para dar una respuesta proliferativa. A diferencia del tejido neuronal, el potencial regenerativo y citoprotector de la célula cardiaca no ha sido explotado, en parte, debido a que los mecanismos y los blancos moleculares reguladores del crecimiento, la viabilidad y la diferenciación del cardiomiocito todavía se desconocen (Gomez LA *et al*, 1997, Brady *et al*, 1996). Además es escaso el conocimiento de las vías y los genes expresados en estas células sometidas a condiciones fisiológicas como lesión por isquemia simulada y protección por pre-acondicionamiento isquémico PCI (Gómez LA *et al*, 1997).

El pre-acondicionamiento isquémico cardiaco se define como un fenómeno endógeno de protección contra el insuficiente aporte de oxígeno y nutrientes que conlleva a la reducción en el tamaño de la necrosis miocárdica debido al retraso en la muerte de los miocitos, inducida por exposición previa del corazón a episodios breves de isquemia con periodos de reperfusión, fenómeno estandarizado previamente en el Grupo de Fisiología Molecular. (Gómez LA *et al*, 1997).

Cuando las células cardiacas son expuestas a una lesión de tipo isquémico, se producen alteraciones tales como disrupción sarcolémica, hipercontractura y muerte celular. Estos fenómenos celulares son debidos a cambios en la expresión y funcionalidad de genes estructurales involucrados en la regulación de iones como el calcio, enzimas como fosfatasa y proteínas cinasas, y algunos involucrados en uniones intercelulares, canales iónicos y otras, así como de factores de transcripción implicados en vías de señalización necesarias para la sobrevivencia y mantenimiento de la viabilidad celular ((Alekseev *et al*, 1996, Gómez LA *et al*, 2002; Gutiérrez LD *et al*, 2004; Gómez LA *et al*, 2006, Gómez LA, 2008).

De acuerdo a este panorama, es importante el estudio de los mecanismos moleculares y celulares, además de la caracterización funcional y bioquímica de genes que podrían estar regulando esta enfermedad. Por esta razón, recientemente se ha venido incrementando el estudio de factores de transcripción, que como bien se conoce, participan en la regulación de muchos genes, mediante la activación o desregulación de vías de señalización e

interacción con muchos de los genes que están implicados en las patologías humanas. Dentro de estos factores de transcripción, el factor de Transcripción Asociado a Microftalmia, MITF, podría ser un buen candidato para el estudio de la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares.

1.2 Factor de transcripción asociado a Microftalmia:

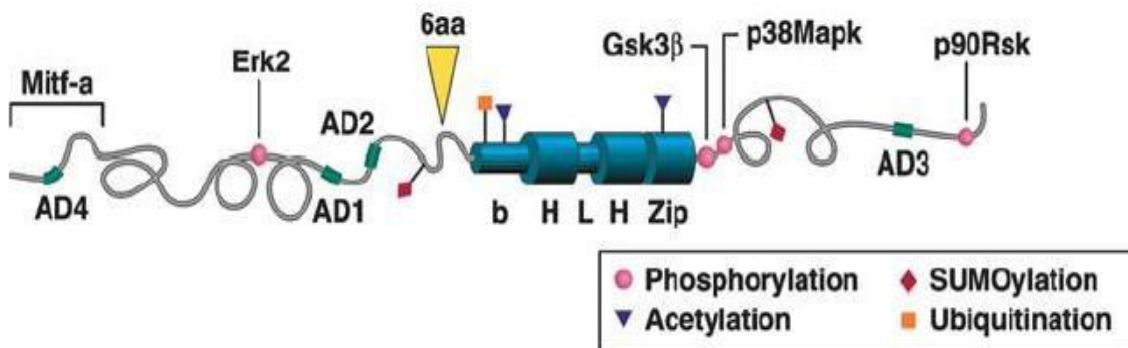
El factor de transcripción asociado a Microftalmia MITF estudiado desde la década de los 40's, pertenece a la superfamilia de factores de transcripción con una estructura hélice-*loop*-hélice básica, conformada por 24 familias.

Dentro de estas familias de factores de transcripción bHLH descritas, 6 contienen el dominio Zip (MYC, MAd, SREBP, AP-4, USF y MITF/TFE); dentro de la familia MITF/TFE o MiT se encuentran MITF, TFE3, TFEB y TFEC, que podrían tener un papel importante en la sobrevivencia y desarrollo normal de melanocitos y osteoclastos (Widlund *et al*, 2003).

El gen MITF ha sido mapeado en el cromosoma 6 en ratones y en el cromosoma 3p12.3-14.1 en humanos, el cual abarca 9 exones altamente conservados que codifican para el factor de transcripción de la familia bHLHZip

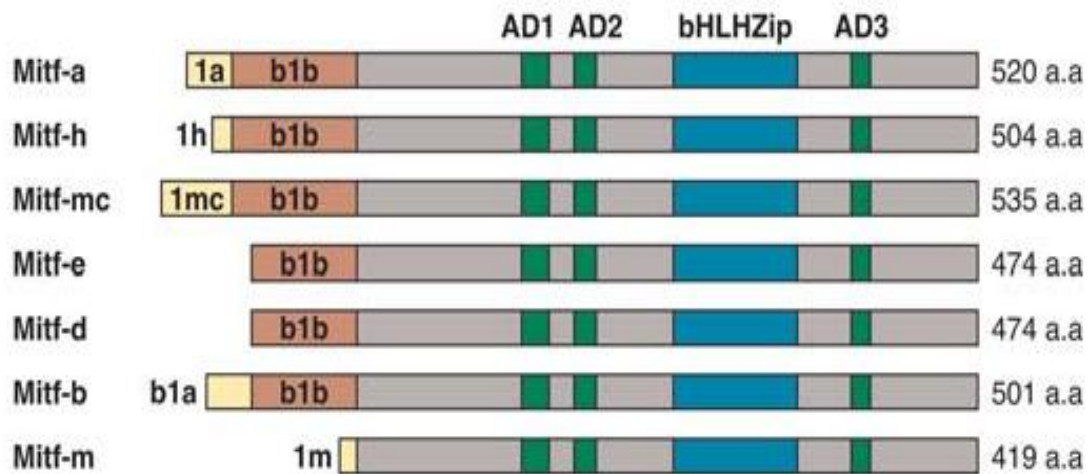
Actualmente MITF ha sido clonado en varias especies: humano, ratón, rata, hámster, pollo, pato, perro y pez cebra. En todas estas especies, MITF tiene alta homología en la estructura bHLHZip que es un dominio que permite el reconocimiento específico de los promotores de los genes que MITF regula, 2 dominios de activación y una secuencia blanco de proteína cinasa asociada a microtúbulos (MAPK). Además las secuencias blanco de la glicógeno sintasa 3B y Rsk1 (cinasa ribosomal S6 de 90 kDa) son conservadas en todas las especies excepto en pez cebra (Figura 1-1). Además, se ha demostrado que MITF puede ser regulado por fosforilación y por diferentes vías de señalización en al menos 3 sitios como son la Ser73, Ser298 y Ser409, que permiten la sobreexpresión, mantenimiento y degradación de MITF.

Figura1-1. Esquema de MITF en donde se señalan sus dominio funcionales y algunos sitios sugeridos para su modificación post-traducciona. Tomada de Steingrimsson E *et al* .Ann Rev Genet 2004, 38:365-411.



Análisis de la estructura del gen MITF humano revelaron al menos 8 isoformas MITF, denominadas MITF-A, B, C, D, E, J, H y M. Todas los genes que codifican para las diferentes isoformas tienen conservados los exones 2 al 8 excepto por un aceptor de *splicing* alternativo que adiciona o deletiona 6 aminoácidos (ACIFPT) antes del dominio básico, como se muestra en la figura 1-2.

Figura 1-2. Representación miembros de la Familia MiT ó MITF/TFE, mostrando las homologías y diferencias en su estructura. Tomada de Shibahara *et al.* Pigment Cell Res 2000, 13:98-102.



De las isoformas descritas, MITF-M ha sido la más estudiada y se cree que es la isoforma más pequeña; consiste de 419 aminoácidos con un dominio amino-terminal M (MLEMLEYNHY) que se expresa selectivamente y abundantemente en melanocitos derivados de la cresta neural y en células de melanoma (Watanabe *et al.*, 2002); mientras la isoforma más grande es MITF-A con 520 aminoácidos, un dominio amino-terminal A (MQSESGIVPDFEVGEEFHHEEPKTYEELKSQPLKSS) y un dominio B1b de 83 residuos de aminoácidos, compartido con las demás isoformas. La isoforma A se expresa en muchos tipos de células en cultivo, incluyendo epitelio retinal pigmentado.

MITF-C consiste de 519 aminoácidos, un dominio amino-terminal C de 34 residuos, un dominio B1b y se expresa en muchos tipos celulares, incluyendo epitelio retinal pigmentado (ERP), pero no es detectada en células del linaje melanocítico. (Tachibana M, 2000) y MITF-H esta constituida por 504 a.a, un dominio amino-terminal H (MEALRVQMFMPSCFESLYL) y un dominio B1b igual al de MITF-A. Algunos autores sugieren que se co-expresa con MITF-A en células en cultivo, aunque se expresa preferencialmente en corazón, como se muestra en la tabla 1-1.

Tabla 1-1. Algunas características de las isoformas más importantes de MITF.

ISOFO	TAMAÑO	DOMINIO N-TERMINAL	DOMINIO B1b	TEJIDOS
MITF-A	520 a.a	Dominio A MQSESGIVPDFEVGEEFHPEPK TYVELKSQPLKSS 35 RESIDUOS	83 a.a NO ACIFPT	Células cultivadas y RPE
MITF-C	519 a.a	Dominio C 34 RESIDUOS	83 a.a	RPE y NO melanocitos
MITF-H	504 a.a	Dominio H MEALRVQMFMPCSFESLYL 19 RESIDUOS	83 a.a	Células cultivadas RPE, corazón, se puede coexpresar con MITF-A
MITF-M	419 a.a	Dominio M MLEMLEYNHY 11 RESIDUOS	83 a.a ACIFPT	Melanocitos derivados de la cresta neural. Células melanoma y RPE

La expresión de cada isoforma es dirigida por un promotor diferente, sugiriendo la diversidad funcional de esas isoformas en una variedad de tejidos.

La mayoría de estudios de MITF, se han realizado en cáncer, especialmente melanoma así como en desórdenes de la pigmentación. Dentro de las muchas funciones en las que se ha implicado a MITF, se ha sugerido que este puede tener algún papel en el desarrollo y sobrevivencia de los melanocitos, ya que regula la expresión de la mayoría de las proteínas que participan en el proceso de síntesis de melanina, como por ejemplo, la proteína tirosinasa, las proteínas relacionadas a tirosinasa 1 y 2 (TRP1 y TRP2) y Pmel17 (ó gp100 glicoproteína específica de melanocito) entre otras; los genes que codifican para estas proteínas se caracterizan por contener en sus promotores, una secuencia consenso llamada caja E (CACGTG) y una caja M (GTCATGTGCT) que es reconocida específicamente por MITF a través de su dominio bHLHZip (Yasumoto *et al*, 1994, Bertolotto *et al*, 1996, 1998a y 1998 b, Widlund *et al*, 2003). Por otro lado, el gen MITF podría tener un aumento de su transcripción vía cAMP, de una manera melanocito específica, de este modo estableciéndose una interacción entre las señales extracelulares que regulan la expresión de MITF y la regulación transcripcional de la melanogénesis (Bertolotto *et al*, 1998^a, Widlund *et al*, 2003, Tachibana M, 2000).

La importancia de MITF en el desarrollo de los melanocitos es manifestada por la fuerte naturaleza de respuesta a señales del enhancer/promotor restringido a melanocitos de este factor de transcripción. Análisis funcionales del promotor de MITF han sugerido que este es modulado por varios reguladores transcripcionales involucrados en la decisión del destino celular de las células de la cresta neural, como por ejemplo la vía de señalización Wnt (del inglés “wingless”), que ha sido muy estudiada en desarrollo y cáncer. Las señales Wnt (funcionan durante la especificación y expansión de la población celular de la cresta neural; en pez cebra, Wtn promueve la diferenciación de melanocitos con MITF como efector corriente abajo de Wtn (Tachibana M, 2000, Widlund *et al*, 2003, Seidensticker *et al*, 2000, Takeda *et al*, 2000, Dorsky *et al*, 2000).

Estas observaciones han sido complementadas en vertebrados, incluyendo células de la cresta neural de ratón y en gallinas, en donde Wnt-1 vía β -catenina promueve la diferenciación de los melanocitos así como su expansión celular (Dorsky *et al* 1998, Widlund *et al*, 2003).

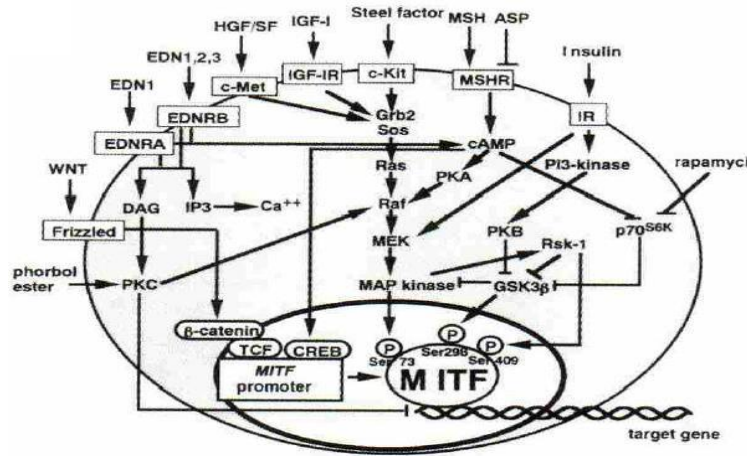
Por otro lado, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/ el factor *scatter* (SF), un ligando de la tirosina cinasa MET, fosforila MAP cinasa, promueve la proliferación y mantenimiento de la alta actividad melanogénica en los melanocitos a través de la activación de MITF (Halaban *et al*, 1992, Takayama *et al*, 1996, Kos *et al*, 1999, Widlund *et al*, 2003). Por otro lado, la proteína de la señal *Agouti* (ASP) disminuye la síntesis de eumelanina (melanina oscura de café oscuro a negro) pero promueve la síntesis de feomelanina (pigmento amarillo a rojo parduzco) en melanocitos, debido a la inhibición de la actividad tirosinasa y la pérdida de expresión de TRP1 y TRP2, vía fosforilación de MITF. Se ha demostrado que ASP inhibe la diferenciación de los melanoblastos y promueve la actividad de MITF en melanocitos, sugiriendo un papel importante de este factor de transcripción en la diferenciación de los melanoblastos y en melanogénesis (Kobayashi *et al*, 1995, Furumura *et al* 1996, Sakai *et al* 1997, Aberdam *et al* 1998, Widlund *et al*, 2003).

Adicionalmente, se ha descrito que mutaciones en los genes para endotelina 3 (EDN) y el receptor β de EDN (EDNR β) (Los receptores de endotelina pertenecen al grupo beta de los receptores de rodopsina y se clasifican en receptor de endotelina tipo A, ó tipo B (EDNRA ó EDNRB), llevan a deficiencias en melanocitos derivados de la cresta neural y en neuronas en ratones y humanos. Todas la EDNs (EDN1, 2 y 3) estimulan la generación de melanoblastos en cultivos de cresta neural, a través de la interacción con EDNR β . La señalización de EDN3 es necesaria para el desarrollo de la cresta neural en ratones durante un periodo restringido a los días 10 y 12.5, mientras que la vía EDN1 no es requerida. Sin embargo, EDN1 incrementa el calcio intracelular y activa la síntesis de melanina y la acumulación de cAMP; que a su vez transloca PKC (proteína cinasa C) citosólico a una forma unida a membrana celular que activa la cascada de señalización MAPK, por tanto, podría estar de alguna manera regulando la función de MITF por fosforilación en la Serina 73, conduciendo a una regulación de la melanogenesis (Shin *et al* 1999, Reid *et al* 1996, Imokawa G *et al* 1996, Lahav *et al* 1999, Shibahara *et al* 2000, Widlund *et al*, 2003). El factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1) incrementa el crecimiento del melanocito cuando interacciona con la hormona del crecimiento. La insulina regula negativamente a la tirosinasa e inhibe su actividad en células de melanoma; al parecer esta desregulación de la tirosinasa es mediada por MITF que al ser fosforilada en la Ser298 por la GSK3B disminuye su expresión, conduciendo a la inhibición de la síntesis de melanina (Edmoson *et al* 1999, Shibahara *et al* 2000, Widlund *et al*, 2003).

Otra vía de señalización en la que podría estar interviniendo MITF, es la vía c- KIT (receptor de tirosina cinasas), descrita como esencial para el desarrollo normal del melanocito. Cuando se estimula esta vía con TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), se activa la cáscada MAPK y esta a su vez fosforila a MITF en la Ser 73, ocasionando el secuestro del coactivador CBP/p300. Se ha demostrado que la vía c-Kit además desencadena la fosforilación de MITF en la Ser409 a través de Rsk-1, un miembro de la familia de proteínas cinasas S6 reguladas durante el ciclo celular. De este modo, la señalización c-Kit ocasiona fosforilación dual de MITF, lo que podría conducir a su activación y degradación, regulando de esta manera la melanogénesis y el

desarrollo del melanocito (Hemesath *et al* 1998, Price *et al* 1998, .Shibahara *et al* 2000). Todas estas vías de señalización se muestran en la figura 1-3.

Figura 1-3. Vías de señalización en las que interviene el gen MITF y su producto en melanocitos. Tomado de Tachibana M. *Pigment Cell Res* 2000, 13:230-40



Dentro de las funciones en las que se cree que MITF pueda tener algún papel, esta la de regular la detención del ciclo celular mediante la activación transcripcional del inhibidor del ciclo y supresor tumoral INK4a, que se encuentra mutado frecuentemente en melanomas. En estos estudios y empleando células de melanoma humano Mel202, se sugirió que MITF se une al promotor de INK4a y activa la expresión del mRNA y proteína de p16, induciendo la hipofosforilación de la proteína del retinoblastoma y por tanto, la detención del ciclo celular. Adicionalmente, se propuso que INK4a era necesario para la diferenciación eficiente del melanocito y que MITF era indispensable para mantener la expresión de INK4a en melanocitos maduros, creando una presión selectiva para escapar de la inhibición de crecimiento por inactivación de este inhibidor. De estos estudios se infirió que MITF puede mediar los procesos de diferenciación celular y salida del ciclo celular, y potencialmente, explicar la tendencia específica de tejido de las mutaciones de INK4a, que ocurren en melanoma (Loercher *et al*, 2005).

MITF también ha sido asociado con la diferenciación del melanoma; Lekmine *et al* en el 2007, realizaron un estudio para evaluar la participación de MITF en la diferenciación de melanoma, utilizando células de melanoma humano muy agresivas, UISO-Mel-6 transfectadas con la isoforma M del gen MITF específica de melanocitos y se indica que las células transfectadas sobreexpresando MITF, tienen un fenotipo menos agresivo, además, se sugiere que MITF influencia el fenotipo de células UISO-Mel-6Mitf+ disminuyendo la proliferación celular e induciendo el crecimiento de las células en clusters; además, sugieren que MITF favorece la expresión de marcadores de diferenciación de melanoma como Tirosinasa y TRP1 y que afecta la distribución del ciclo celular por arresto de las células en fase G2/G1 e induce la expresión de p21.

Por último, concluyen que MITF inhibe el crecimiento de tumores *in vivo* y disminuye la expresión de Ki67, un marcador de proliferación de células

neoplásicas, a su vez que podría retrasar la aparición de metástasis en hígado de ratones producidas por las células UISO-Mel-6. En este estudio se confirma la sobreexpresión de Bcl2 inducida por MITF, y que había sido reportada por McGill G *et al* en el 2002. En esos estudios se sugiere, por inmunoprecipitación de cromatina, que MITF podría regular a Bcl2 en melanocitos primarios humanos y células de melanoma 501mel, además en estudios *in vivo* con ratones portando las mutaciones para MITF, Bcl2 y ambos, que el fenotipo despigmentado típico de mutaciones en MITF se agudiza cuando mutaciones de ambos genes están presentes. También se señala mediante estudios de RT-PCR, una disminución en la expresión del ARN de BCL2, cuando las células de melanoma 501mel y melanocitos primarios humanos son transfectados con el mutante de MITF.

Actualmente, se tiene como base de estudio, que MITF reconoce las cajas M en los promotores de genes que intervienen en procesos celulares como apoptosis (Bcl2), proliferación celular, ciclo celular (p16, Rb, p21, CDk2), diferenciación (Tirosinasa, TRP1, TRP2), etc, poniendo de manifiesto que este factor de transcripción puede tener una función dual dependiendo del contexto de los estudios propuestos y de los modelos experimentales empleados.

A nivel clínico, se ha demostrado que mutaciones en la línea germinal de MITF ocasionan dos tipos de desórdenes de la pigmentación: el síndrome de Tietz y el síndrome Waardenburg tipo 2 y recientemente su expresión ha sido asociada con hipertrofia cardiaca.

El síndrome de Tietz fue descrito en 1963 por Walter Tietz, como una enfermedad autosómica dominante, caracterizada por una profunda sordera neurosensorial congénita unilateral o bilateral e hipopigmentación generalizada y más severa que en WS2.

La proteína mutante predicha por este síndrome presenta una delección en el aminoácido 271 (DelR271), con un efecto dominante negativo y desarreglo de la localización nuclear. Análisis de heteroduplex mostraron mutaciones en los exones 5 y 6 de MITF; en el exón 5 y secuencia intrón adyacente, se detectó una mutación de C a G, en la región consenso de *splicing*; en el exón 6, se encontró una mutación de G a C en el nt 600, que a nivel de proteína produce la substitución de Lys por Asp (Asn210Lys).

El Síndrome de Waardenburg tipo 2 (WS2) descrito desde 1951, como una enfermedad hereditaria autosómica dominante, es caracterizada por sordera neurosensorial congénita unilateral o bilateral (debida a la ausencia del órgano de Corti y estría vascularis, además de atrofia del ganglio espiral y nervio auditivo con ausencia de melanocitos en el área) y albinismo parcial; poliosis (aparición prematura de cabellos grises), desplazamiento lateral del canto interno de los ojos y del conducto lagrimal inferior, raíz nasal ancha y amplia, heterocromía del iris, sinofris (unión de las cejas en la línea media), hipertriosis del tercio medio de las pestañas, a nivel mandibular se encuentra leve prognatismo con una distancia bigonial incrementada, paladar hendido y labio leporino en un 3% de los casos con el labio superior en forma de arco de cupido y se han descrito malformaciones cardíacas asociadas con este síndrome (Tachibana *et al* 1996).

Las mutaciones de MITF asociadas con este síndrome han sido estudiadas por diversos

autores (Tassabehji *et al* en 1994, Nobukuni *et al* en 1996, Morell *et al* en 1997, Lalwani *et al* 1998, Takeda *et al* en el 2000 y Fumiko *et al*, 2008) y se ha podido establecer que la mayor o menor severidad del enfermedad está relacionada con la ubicación de las mutaciones en este gen.

1.3 MITF y enfermedades cardiovasculares:

Como se había mencionado anteriormente, en el año 2006 se sugirió una relación entre MITF e hipertrofia cardiaca, que constituye una de las principales formas de respuesta del cardiomiocito a estímulos mecánicos y neurohormonales y permite al miocito generar mayor trabajo, con aumento de la función de la bomba cardiaca. Esta acción compensadora, sin embargo, se ve en algún momento sobrepasada por el estrés biomecánico, lo que da lugar al cuadro de insuficiencia cardiaca, que causa una gran morbilidad y mortalidad.

En este estudio, se evaluó el posible papel de MITF en esta enfermedad, en ratones tipo silvestre y con mutaciones en este gen; sugiriendo que hay expresión de MITF a nivel de corazón y que ratones con mutación en el gen MITF muestran una respuesta hipertrófica disminuida bajo estimulación beta-adrenérgica, con función cardiaca disminuida y tendencia a muerte súbita; adicionalmente, se indicó que MITF puede jugar un papel importante en la hipertrofia cardiaca inducida por beta-adrenérgicos y que ratones de mediana edad mutantes para MITF, tienen una masa cardiaca menor y función cardiaca fuertemente disminuida (Tshori *et al* 2006). Sin embargo, en este trabajo no se estudió el papel de MITF en el estrés metabólico-mecánico asociado a la hipertrofia cardiaca.

La evidencia experimental sugiere que las vías beta-adrenérgicas se acoplan diferencialmente y participan en la señalización que regula la función cardiaca, la remodelación cardiaca, la viabilidad de cardiomiocitos y pueden tener un efecto cardioprotector contra la isquemia o contra el efecto cardiotoxico por acción de antraciclinas que pueden generar daño a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Muntz KH *et al*, 1994; Cooke L *et al*, 1994; Singal PK *et al*, 1998), Estas vías han sido implicadas en la protección e inducción de muerte de las células cardiacas a través de la activación de las vías PKC, p38 y MAPKs (Shizukuda Y *et al*, 2002; Bernstein D *et al*, 2005) aunque continua siendo controversial el contexto celular en el que estas vías pueden ser pro- o antiapoptóticas (Devic E *et al*, 2001; Shizukuda Y *et al*, 2002).

A nivel molecular no se conocen los factores de transcripción ni los genes relevantes en la respuesta de las células cardiacas aisladas sometidas a diferentes condiciones de lesión isquémica o protección contra esta que permitan el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica bajo diferentes condiciones fisiológicas.

Con este panorama, y debido a que los estudios realizados muestran evidencias insuficientes que sugieren un papel de MITF en la regulación de la respuesta beta-adrenérgica y la fisiología cardiaca y a que no se conoce su función en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica, es necesario realizar investigaciones encaminadas a esclarecer la función de este factor de transcripción en un modelo

experimental bien definido y controlado de células cardiacas aisladas y con herramientas metodológicas basadas en la biotecnología moderna.

1.4 Hipótesis:

El factor de transcripción asociado a Microftalmia, *MITF*, modula la expresión de genes tejido específicos relacionados con la viabilidad de la célula cardiaca que pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica.

1.5 Objetivos:

1.5.1 Objetivo General:

Determinar la función de *MITF* en células cardiacas ventriculares adultas aisladas sometidas a condiciones de lesión y protección y evaluar cambios en la expresión de genes regulados por *MITF* como potenciales indicadores de lesión o protección cardiaca

1.5.2 Objetivos Específicos:

1. Caracterizar la expresión del gen *MITF* en cardiomiocitos ventriculares y evaluar los cambios en viabilidad celular asociados a la disminución o aumento de su expresión
2. Estudiar el efecto del silenciamiento de *MITF* en células cardiacas ventriculares adultas sometidas a condiciones de lesión por isquemia simulada y cardioprotección inducida (PCI) y analizar cambios en sus perfiles de expresión.
3. Identificar *in silico* genes cardiacos que contengan elementos de respuesta a *MITF* y que puedan estar implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica
4. Diseñar y construir un macroarreglo de cADN para monitorear los niveles de expresión relativos de *MITF* y de algunos de sus genes blanco

1.6 Diseño Experimental

1.6.1 Tipo de estudio

El proyecto es de tipo experimental básico.

1.6.2 Población de estudio

Para este estudio se utilizaron cardiomiocitos aislados de ventrículos de cobayos adultos

hembra (*Cavia porcellus*) entre 250 y 300 g. Los cobayos fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Salud, bajo el consentimiento del comité de ética. Como controles se emplearon células de melanoma proliferantes.

1.6.3 Criterios de Selección

1.6.3.1 Criterios de inclusión

- Células cardíacas de aislamientos con viabilidad mayor o igual al 70%.
- Células cardíacas no contaminadas durante el tiempo que se requiera para cada experimento, para asegurar que los resultados obtenidos corresponden a células cardíacas puras.

1.6.3.2 Criterios de exclusión

- Aislamientos con células contaminantes tales como fibroblastos, glóbulos rojos u otras células sanguíneas
- Cardiomiocitos obtenidos de aislamientos en los que haya sucedido paro cardíaco.
- Cardiomiocitos obtenidos de corazones en los que se haya observado signos de isquemia durante el aislamiento (zonas necróticas en pared ventricular o arritmias)

1.7 Estrategia experimental

Para la ejecución de la propuesta, se empleo el modelo experimental de estudio previamente establecido en el Grupo de Fisiología Molecular (Gómez LA *et al*, 1996, 1997) que consiste en células cardíacas ventriculares aisladas, que permite observar efectos directos sin el potencial enmascaramiento del tejido sanguíneo, nervioso y conectivo, entre otros, como ocurre en estudios donde se emplea el corazón completo.

Los grupos experimentales que se emplearon fueron:

1. Cardiomiocitos en condiciones de normoxia (21% O₂), mantenidos en medio fisiológico tirode pH 7,4, en cámara húmeda y a temperatura ambiente
2. Cardiomiocitos en condiciones de isquemia simulada: células con hipoxia 30 minutos a temperatura ambiente e isquemia a 37°C durante 1 hora.
3. Cardiomiocitos en condiciones de protección por acción del PCI: Células a las que se les realizó el siguiente esquema de PCI 10:1:10:9 (Isquemia:reperfusión) y lesión a 37°C durante 1 hora.

Como grupos control se incluyeron muestras de corazón completo y de aurículas de cobayos, los cuales sirvieron como parámetro de referencia comparada con los grupos experimentales; (células en normoxia Vs células en isquemia; células lesionadas vs células protegidas contra la isquemia o PCI).

2. Identificación y expresión diferencial del factor de transcripción asociado a Microftalmia en corazón y cardiomiocitos aislados, posible papel en hipertrofia y en viabilidad celular

Identificación y expresión diferencial del factor de transcripción asociado a Microftalmia en corazón y cardiomiocitos aislados, posible papel en hipertrofia y en viabilidad celular

Para cumplir con los objetivos específicos:

1. Caracterizar la expresión del gen MITF en cardiomiocitos ventriculares y evaluar los cambios en viabilidad celular asociados a la disminución o aumento de su expresión.
2. Estudiar el efecto del silenciamiento de MITF en células cardiacas ventriculares adultas sometidas a condiciones de lesión por isquemia simulada y cardioprotección inducida (PCI) y analizar cambios en sus perfiles de expresión.

Se realizaron los siguientes ensayos:

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Aislamiento de miocitos cardiacos

Se realizó el aislamiento de células ventriculares a partir de corazones de cobayos Hartley *Cavia porcellus* hembras adultos de 250-300 g, empleando un sistema de perfusión retrograda tipo Langendorff y disociación enzimática con colagenasa, pronasa (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos) y proteinasa K (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), descrito por Gómez *et al* (1997 y 2006). Después de aislados los cardiomiocitos se realizó el recuento celular mediante el ensayo de exclusión de azul tripán. Luego las células se separaron en tres grupos experimentales (entre 100.000 a 250.000 células cardiacas ventriculares adultas/ por grupo experimental para extracción de ARNs) y las células se sometieron a lesión y protección por preacondicionamiento isquémico (PCI) (Gómez LA *et al*, 2006; Gómez LA, 2013), de acuerdo con el protocolo mostrado en la figura 2-1.

2.1.2 Disminución de la expresión de MITF inducida por shRNA

Se realizó interferencia génica empleando RNA de interferencia pequeños para una

secuencia diferente al gen MITF (shScramble) y para el gen MITF (shMITF). En breve, con el método hidrodinámico (Liu F *et al*, 1999) los cobayos hembra de 250 a 300 gramos, fueron inyectados vía intraperitoneal, con 3 ml de solución salina libre de pirógenos, 2 µl de las respectivas partículas virales, 1 µl de polibreno 10 mg/ml (sc-134220, Santa cruz Biotechnology Inc, Delaware, CA. Estados Unidos) y 2 µl de partículas lentivirales diseñados para expresar el interferente específico de MITF, shMITF (sc-35934-V, Santa cruz Biotechnology Inc, Estados Unidos), o un interferente no específico, shScramble (sc-108080, Santa cruz Biotechnology Inc, Delaware, CA. Estados Unidos) y copGFP (sc-108084, Santa cruz Biotechnology Inc, Delaware, CA. Estados Unidos). Como control adicional se inyectó un cobayo con 3 ml de solución salina, sin vector de expresión. La adaptación y estandarización de las metodologías para el uso de la tecnología de ARN pequeños descrita por Gómez LA (2013; (Liu F *et al*, 1999; Gómez LA, 2006; Gómez LA, 2011).

Los animales se mantuvieron durante 30 días, individualmente en jaulas de policarbonato, proporcionándoles alimento (Rodentina) y agua a voluntad. Diariamente, se realizó el monitoreo de los animales, incluyendo medición de la temperatura, frecuencia cardiaca y observación de potenciales efectos de toxicidad, cambios fenotípicos y de comportamiento. A los 30 días post-transfección, los animales se anestesiaron con pentobarbital (anestesia profunda), a una dosis de 70 mg/Kg por vía intraperitoneal, se realizó la toracotomía y cardiectomía; se tomaron registros fotográficos de los corazones aislados y se obtuvo el peso de cada uno de ellos. Se estableció la relación peso corazón vs peso corporal y cada corazón fue fragmentado para la extracción de ARN, ADN, proteínas, histopatología, análisis de fluorescencia (GFP) y microscopía electrónica. La verificación de la transfección y la evaluación de los niveles de expresión relativa a nivel de mRNA y proteínas se realizó mediante qPCR y Western blot, respectivamente. El protocolo para el manejo de los animales fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud.

2.1.3 Extracción de ARN y síntesis de cADN

Para la extracción de ARN se empleó el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi en 1987 y el reactivo trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). La calidad e integridad del ARN obtenido fue verificado mediante espectrofotometría a 260 nm (Relación 260/280) y electroforesis en gel de agarosa 1,5 % denaturante. La síntesis de cADN se llevo a cabo a partir de 1-3 µg de ARN total, utilizando oligo-dT y transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). La calidad e integridad del cADN obtenido se verifico mediante la amplificación del gen de expresión constitutiva GAPDH.

Los productos de amplificación fueron fraccionados en electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizados mediante tinción con nitrato de plata.

2.1.4 Identificación de la isoforma H de MITF

Se realizó la caracterización de la isoforma H de MITF, a partir de la amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para dicha isoforma, en tejido cardiaco. Además se amplificó la región carboxilo terminal (MITF 9-10e) del gen que es común en varios tipos celulares como control adicional (datos no mostrados). El fragmento de amplificación obtenido fue clonado en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y secuenciado empleando el método de Sanger, el sistema Big Dye Terminator V 3.1 (Applied Biosystems Foster City, California, Estados Unidos) y electroforesis capilar empleando el analizador genético ABI Prism

310 (Perkin Elmer, Estados Unidos). Para verificar la identidad de la isoforma, las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos de dominio público (GenBank, EMBL) con la plataforma BLAST (Altschul SF *et al*, 1997).

2.1.5 PCR en tiempo real (qPCR)

Se realizaron análisis de expresión a nivel de mRNA en células cardíacas sometidas a lesión por isquemia simulada, a protección por pre-acondicionamiento isquémico, así como en células en normoxia. Como control de expresión positiva se emplearon cADNs obtenidos de aurícula y de corazón completo de cobayo. En corazones completos sometidos o no a interferencia génica se realizó la evaluación de la expresión de mRNA mediante qPCR.

Se utilizaron plásmidos recombinantes que contienen el cDNA de MITF, previamente caracterizados mediante clonación y secuenciación de ácidos nucleicos, como estándar en al menos seis diluciones y los cADNs obtenidos a partir de células cardíacas sometidas a lesión y protección *In vitro*. Para cada ensayo se establecieron los estándares más adecuados y se incluyeron controles positivos y negativos. Los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando el estuche DyNAmo HS SYBR Green (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos) y el equipo Chromo 4 (BioRad Laboratories Inc, Irvine, California, Estados Unidos). Como controles positivos se emplearon plásmidos que contenían el cADN de MITF y como control de reacción de PCR se empleó agua libre de nucleasas en lugar de ácido nucleico.

Para la normalización de los datos y para determinar la expresión relativa de MITF, se empleó la expresión del gen de expresión constitutiva GAPDH, una vez demostrado que la expresión no cambiaba de manera significativa en las diferentes condiciones experimentales.

Para el análisis de la qPCR se construyó una curva de calibración a partir de cantidades conocidas y crecientes de cDNA de MITF (0,39-50 ng), que permitió interpolar los resultados obtenidos en las reacciones de amplificación de cada una de las muestras y controles que también incluyeron diferentes cantidades de templado (10-100 ng). En todos los casos la fluorescencia se graficó en unidades arbitrarias y se estableció la línea base (0,02 unidades de fluorescencia). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C/15 min, seguido de 39 ciclos de 96°C/ 10 seg, 57,2°C /30 seg , 72°C/30 seg, y extensión final de 72°C/10 min y curva de melting de 65 a 95°C con lecturas cada 0,2°C por 1 segundo.

Los análisis se realizaron con el software Opticon 3 (BioRad Laboratories Inc, Irvine, California, Estados Unidos), y la metodología descrita por Schefe *et al* (2006). En breve, la curva de calibración permitió interpolar los resultados obtenidos en las reacciones de amplificación para cada una de las muestras y controles que también incluyeron diferentes cantidades de templado (50-200 ng). Para cada muestra el software calculó el número de ciclo en el que el lector empezó a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empezó a detectar el aumento de fluorescencia fue el punto de corte (C_p, de crossing point) o ciclo umbral (C_t, de threshold cycle) y por la cinética de amplificación se espera que sea inversamente proporcional a la concentración inicial del cDNA presente en la muestra. A fin de evaluar la expresión relativa de cADN fue preciso comparar los valores obtenidos después de normalizarlos y habiendo controlado el efecto causado por cambios en las eficiencias de las reacciones de amplificación. Las muestras de cADN de concentraciones iniciales decrecientes (un orden de magnitud cada vez) fueron amplificadas mediante PCR en un mismo experimento. Cada cinética permitió determinar un C_t para cada uno (es decir, un número en referencia a un

ciclo en concreto). Se representaron las concentraciones de cADN como número de copias de cADN por tubo. La fluorescencia se graficó en unidades arbitrarias y el ruido de fondo se sustrajo. La recta de calibración para los valores medios de los Ct se definió en una regresión lineal con un coeficiente de correlación (r^2) que, para ser considerado de calidad, fue de un valor de 0,998. No obstante, los errores se representaron, según el rango de valores obtenidos para un punto ($n=3$). Los cálculos de la expresión relativa de los cDNAs se determinaron utilizando el método del cálculo de las diferencias en los Ct. Calculando el Log_2 (Ct tratamiento / Ct referencia). Para la comparación indirecta, los valores fueron generados así:

Log_2 (tratamiento / referencia) - Log_2 (normoxia / referencia) = \log_2 (tratamiento / ref). $n=3$, barras D.E., * diferencia estadísticamente significativa, $p \leq 0,05$).

2.1.6 Ensayos de Western blot

Células cardiacas aisladas sometidas a isquemia experimental y fragmentos de corazón sometidos a interferencia génica fueron lavados con solución tioride pH 7,4; homogenizados en buffer de lisis que contenía PBS 1X, Nonidet P-40 1%; deoxicolato de sodio 0,5%; SDS 1%; leupeptina 2 ug/ml; pestatina 2 ug/ml y 1 mM de fenil-metil sulfonil fluoruro (PMFS) (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos); se centrifugó a 13000 g /15 min/4°C. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método del ácido bicinonínico (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos), empleando BSA en diferentes concentraciones para la curva de calibración. De cada grupo experimental se fraccionaron 100 μg de proteína en SDS-PAGE 10-12% y se realizó la transferencia capilar a membranas de PVDF (Inmobilon-P IPVH00010, Millipore, Sedford, Massachusetts, Estados Unidos). Para el bloqueo de sitios inespecíficos se empleó leche descremada al 5%, 1% albúmina sérica bovina fracción V, 0.05% Tween 20 (TBST) (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) en TBS. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios diluidos en TBST y albúmina 1% por 1 hora o durante la noche, a temperatura ambiente y en agitación y con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa diluidos igualmente en TBST más albúmina 1% durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación. Para la detección de MITF se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-MITF (N-15), (sc-10999, Santa cruz Biotechnology Inc, Estados Unidos) cuyo epítotope de reconocimiento es la región amino de la proteína MITF humana. Para la detección de lámina β , se empleó el anticuerpo policlonal anti-Lamin β (M-20), (sc-6217, Santa cruz Biotechnology Inc, Estados Unidos) y como anticuerpo secundario se empleó un Anti-IgG Goat-HRP (PI-9500, Vector Laboratories Inc, Burlingame, California, Estados Unidos). La detección se realizó con un substrato quimioluminiscente (ECL + plus Western blotting detection system RPN 2132, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) y los análisis densitométricos se realizaron con el Programa Kodak 1D 3.5 (Eastman, Kodak, Inglaterra).

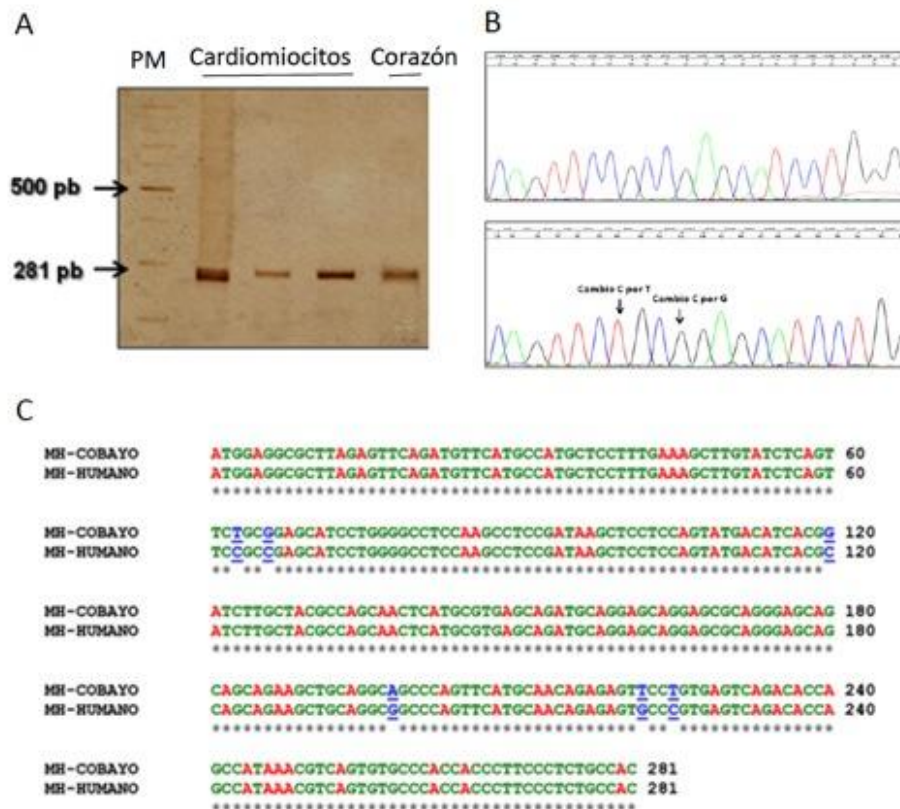
2.2 Resultados

2.2.1 Identificación y análisis de secuencia del cDNA que codifica para MITF

A partir de miocitos cardiacos aislados y de corazón completo de guinea pigs se realizó la extracción de ARN y la síntesis del DNA complementario, cADN. Se estandarizó la PCR para la amplificación de un fragmento de 281 pb de la isoforma H del gen MITF que fue clonado y

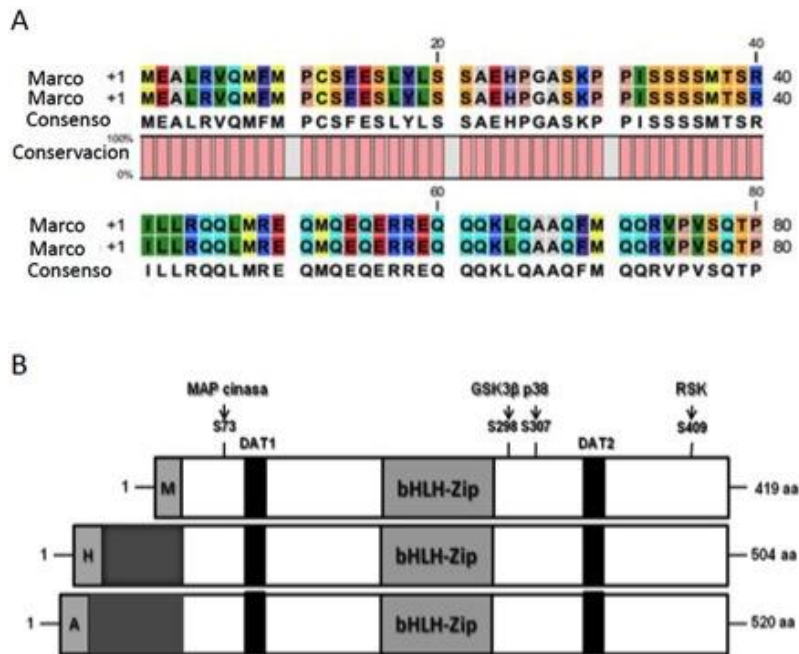
secuenciado (Figura 2-1A). A partir del análisis de la secuencia de los fragmentos de cDNA obtenidos se observó que la isoforma H de cobayo (Número de acceso al GenBank JF_309109.1) fue diferente a las secuencias reportadas para los genes descritos en humano (Número de acceso al Gen Bank NP_937820.1), rata (Número de acceso al GenBank XM_001065584) y ratón (Número de acceso al GenBank NM_001113198), con 6/281 cambios a nivel de nucleótidos como se muestra en las Figuras 2-1B y 2-1C.

Figura 2-1. Identificación y secuencia del cDNA que codifica para MITF en corazón completo y en cardiomiocitos aislados. **(A)** Fotografía de gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata, después de la electroforesis de los productos amplificados, utilizando oligonucleótidos específicos para MITF, a partir de ADN complementario de células cardiacas ventriculares aisladas en normoxia y de corazón completo en donde se muestra un producto de amplificación de 281 pb. **(B)** Electroferograma de la secuencia obtenida de la isoforma MITF-H. Con las flechas se señalan dos de los cambios de nucleótidos encontrados para la secuencia de cobayo comparada con la secuencia del cDNA de humano. **(C)** Análisis de la secuencia obtenida de la isoforma MITF-H. Se muestra el alineamiento de dos secuencias de nucleótidos de la isoforma MITF-H obtenidas a partir de cADN de un corazón de humano y de un cADN obtenido de células cardiacas ventriculares aisladas en normoxia. En azul y subrayado se muestran los cambios en nucleótidos encontrados. Para este alineamiento se empleó el programa de acceso libre ClustalW.. (C) Alineamiento de dos secuencias de nucleótidos de la isoforma MITF-H del exón 1 obtenido de corazón humano y de un cADN obtenido de células cardiacas ventriculares aisladas en normoxia. En azul y subrayado se señalan los cambios encontrados. Se empleó el programa de acceso libre ClustalW.



Estos cambios no implicaron diferencias en la secuencia de aminoácidos, lo cual sugiere una alta conservación de la secuencia de la proteína entre estas especies (Figura 2-2A). Realizamos una comparación de la topología de dominios de MITF entre las isoformas M, H y A, y como se muestra en el esquema (Figura 2-2B) la principal diferencia se encontró en el exón 1 para las isoformas mencionadas, identificada por cajas grises. La isoforma M es más pequeña (419 aa) que la isoforma H (504 aa) y que la isoforma A (519 aa). Como ha sido reportado anteriormente se conservaron los dominios bHLH-Zip de unión a ADN, dos dominios de activación transcripcional (DAT1 y DAT2) (Figura 2-2B, cajas negras). También se conservaron los sitios de fosforilación más frecuentes por las proteínas cinasas que fosforilan los aminoácidos indicados (MAP-p38: Proteína cinasa activada por mitógenos, p38; GSK: glicógeno sintasa cinasa) (Figura 2-2B, parte superior del esquema e indicado con líneas verticales).

Figura 2-2. Secuencia de aminoácidos obtenida de la traducción de las secuencias de nucleótidos del exón 1 de los fragmentos de MITF-H amplificadas de corazón completo y de cardiomiocitos aislados **(A)** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos obtenidas de la traducción de las secuencias de nucleótidos del exón 1 de la isoforma MITF-H obtenidas a partir de cADN de un corazón de humano y de un cADN obtenido de células cardiacas ventriculares aisladas en normoxia. **(B)** Esquema comparativo de la topología de MITF para las isoformas M, H y A. Las cajas grises señalan el exón 1 para las isoformas M, H y A y el dominio bHLH-Zip de unión a ADN. Nótese que la isoforma M es más pequeña (419 aa) que la isoforma H (504 aa) y que la isoforma A (519 aa). Las cajas negras muestran dos dominios de activación transcripcional (DAT1 y DAT2) y en la parte superior del esquema e indicado con líneas se muestran los sitios de fosforilación más frecuentes y las proteínas cinasas que fosforilan los aminoácidos indicados (MAP-p38: Proteína cinasa activada por mitógenos, p38; GSK: glicogeno sintasa cinasa).



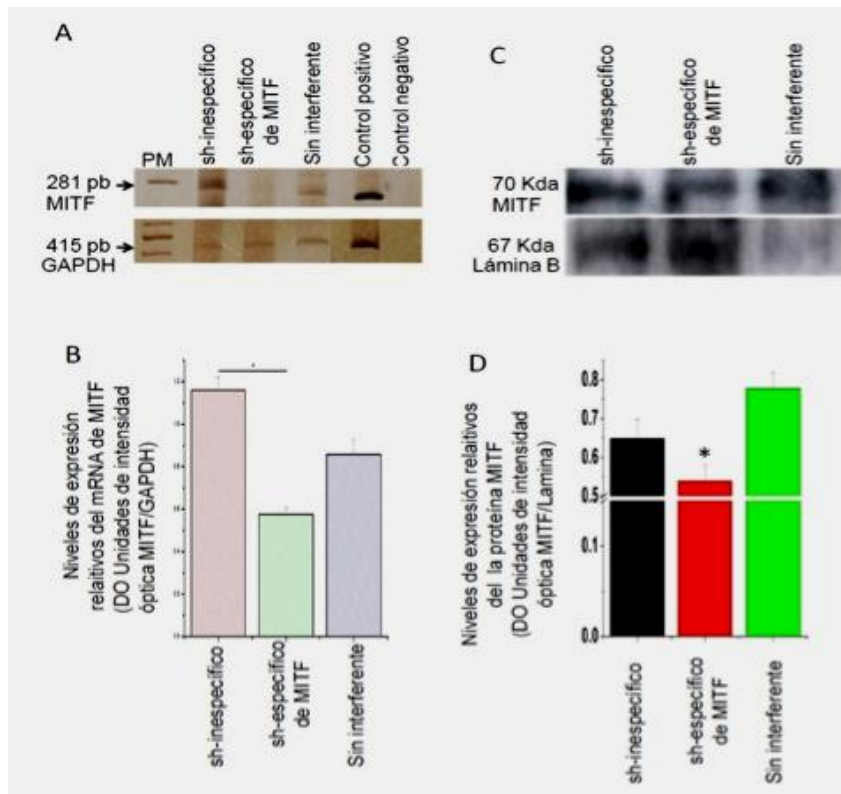
2.2.2 Disminución del mRNA y de la proteína MITF inducida por RNAs pequeños de interferencia específicos para MITF (shRNA-MITF) y cambios morfológicos a nivel cardiaco

Una vez identificada la expresión de la isoforma MITF-H en corazón y cardiomiocitos aislados fue de interés examinar los efectos de la disminución de la expresión de MITF inducida a nivel cardiaco utilizando la transducción de lentivirus que expresan el shRNA específico para MITF y como controles se utilizaron un sh-RNA inespecífico (shRNA-Scramble) y solución salina sin RNA de interferencia. El efecto de la transducción con el shRNA específico de MITF en la disminución de la expresión de MITF se determinó examinando los niveles de expresión relativos del mRNA de MITF, con respecto a los niveles de expresión de mRNA de GAPDH, por qRT-PCR y de la proteína nuclear lámina B, por Western blot, respectivamente .

Los ensayos de qRT-PCR realizados mostraron la amplificación diferencial de un producto de 281 pb para MITF-H (Figura 2-3A, arriba) y de 415 pb para GAPDH (Figura 2-3A, abajo). El control positivo correspondió a la amplificación de MITF-H y GAPDH clonados en el plásmido pGEM-T y los controles negativos correspondieron a la misma mezcla de reacción pero sin templado. A partir del promedio de intensidades para cada banda amplificada (Unidades de intensidad óptica, DO) el nivel de expresión relativo del mRNA de MITF normalizado con la expresión de GAPDH (MITF/GAPDH) resultó en unos niveles de expresión relativos de $1,6 \pm 0,06$ en el tejido transducido con un shRNA interferente inespecífico; $0,57 \pm 0,03$ en el tejido transducido con un shRNA interferente específico para MITF y $0,86 \pm 0,07$ en el tejido sin interferente. Estos resultados indicaron una reducción relativa de la expresión del transcrito de MITF de aproximadamente 2 y 1,5 veces en la expresión del transcrito de MITF-H en corazón transducido con el shRNA específico de MITF, con respecto al control sin interferencia y al transducido con el RNA interferente no específico (shScramble), respectivamente (Figura 2-3B). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($n=3$, $p \leq 0,05$).

Los ensayos de Western blot con un anticuerpo específico para la proteína Mitf y detectados por quimioluminiscencia, mostraron la presencia de una banda de aproximadamente 70 KDa (Figura 6C arriba), mientras que con los ensayos de Western blot con un anticuerpo específico para la proteína Lámina β , mostraron la presencia de una banda de aproximadamente 66 KDa (Figura 2-3C abajo). De manera similar a los cambios detectados para los transcritos, el ensayo resultó en unos niveles de expresión relativos de la proteína Mitf de $0,65 \pm 0,05$ en el tejido transducido con un shRNA interferente inespecífico; $0,54 \pm 0,04$ en el tejido transducido con un shRNA interferente específico para MITF y $0,78 \pm 0,04$ en el tejido sin interferente. Estos resultados indicaron una reducción relativa de la expresión de la proteína Mitf de aproximadamente 17% y 31% en la expresión del transcrito de MITF-H en corazón transducido con el shRNA específico de MITF, con respecto al control sin interferencia y al transducido con el RNA interferente no específico (shScramble), respectivamente (Figuras 2-3C y 2-3D). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($n=3$, $p \leq 0,05$). Estos resultados fueron validados con la expresión de las proteínas α -tubulina, β -actina y α -actina sarcomérica como controles de normalización (datos no mostrados).

Figura 2-3. Disminución del mRNA y de la proteína MITF inducida por un RNA interferente pequeño específico (shRNA) de MITF utilizando un sistema de transducción hemodinámico como se describió en materiales y métodos. **(A)** Fotografía de un gel de poliacrilamida teñido con plata después del fraccionamiento de productos de RT-PCR correspondientes a los transcritos de la isoforma MITF-H (arriba) y GAPDH (abajo). El control positivo corresponde a la amplificación de MITF-H y GAPDH clonados en el plásmido pGEM-T. Los controles negativos de la RT-PCR corresponden a la misma mezcla de reacción pero sin cADN. **(B)** Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de MITF-H en corazones transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (*sh específico de MITF*) y con solución salina (Sin interferente,) como un control de simulación de la transducción (n=3, barras D.E., * diferencia estadísticamente significativa, $p \leq 0,05$). **(C)** *Western blot* para la proteína MITF (arriba) y lámina β (abajo) después del fraccionamiento de 100 microgramos de proteínas totales con un anticuerpo policlonal específico de MITF-H (arriba) y específico para la proteína del núcleo lámina β (abajo). **(D)** Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de la proteína MITF-H calculados por densitometría en corazones transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (*sh-específico de MITF*) y con solución salina, sin interferente, como un control de simulación de la transducción (Sin interferente). Se grafica el promedio de la relación de intensidades de las bandas que representan las proteínas MITF y Lámina β . n=3, barras D.E., * diferencia estadísticamente significativa, $p \leq 0,05$).



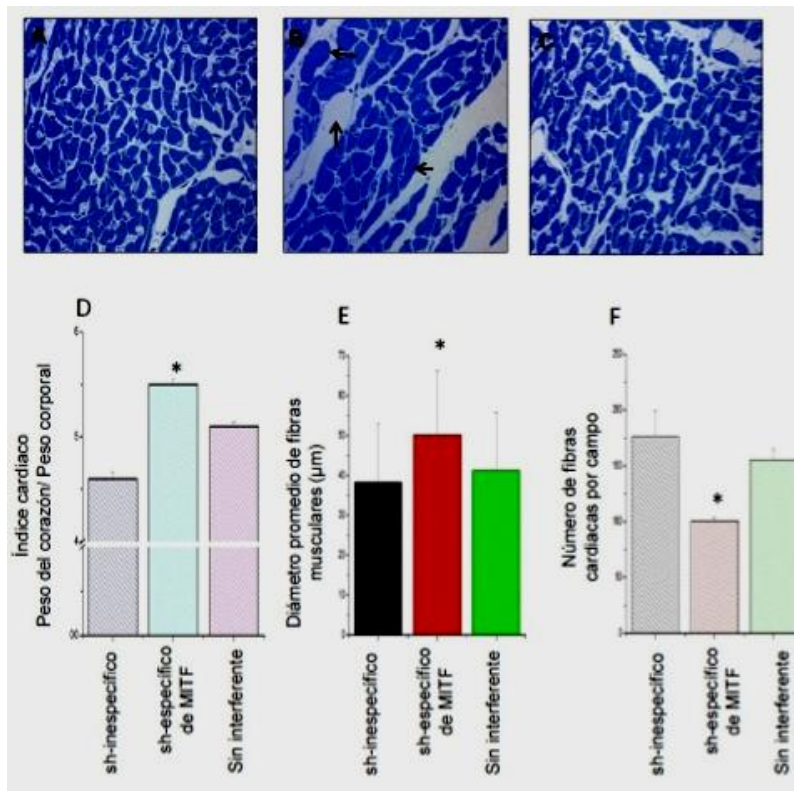
Para observar los efectos asociados a la disminución de la expresión de MITF en el corazón, se realizó un análisis histopatológico y se calcularon los índices cardiacos. Además, se cuantificó el diámetro y el número promedio de las fibras musculares de los corazones a los que se les indujo o no la disminución del mRNA y de la proteína MITF (knockdown) por la tecnología de interferencia del RNA. En el panel superior de la Figura 2-4 se presentan tres microfotografías representativas de los cortes transversales de corazones de cobayo teñidos con azul de toluidina después haber sido transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico (Figura 2-4A), transducidos con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh-específico de MITF, (Figura 2-4B), e inoculados con solución salina, sin interferente, como un control de simulación de la transducción (Figura 2-4C). Se observó que las fibras musculares que fueron interferidas para MITF eran de mayor tamaño y con mayores espacios intercelulares (Figura 4B, indicado con flechas) que las observadas en los otros dos cortes (Figura 2-4A y C).

Macroscópicamente, se observó que el corazón transducido con el interferente específico para MITF, era de mayor tamaño y peso aparentes que los otros dos corazones ($2,2\pm 0,02$ g vs $2,0\pm 0,01$ g). Consistente con estos incrementos, en la figura 2-4D, se presentan gráficamente, los índices cardiacos relativos calculados como el cociente entre el peso del corazón y el peso corporal en cobayos transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), transducidos con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh específico de MITF) y con solución salina (Sin interferente) como un control de simulación de la transducción. Se observó un mayor índice cardíaco en los cobayos tratados con el (sh-RNA específico de MITF ($5,46\times 10^{-3}$), comparado con el índice cardíaco de los corazones que fueron transducidos con el RNA interferente no específico ($4,6\times 10^{-3}$) y con el control sin interferencia ($5,06\times 10^{-3}$). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($n=3$, $p\leq 0,05$) (Figura 2-4C y 2-4D).

Para confirmar el efecto aparente en el crecimiento del corazón asociado con la disminución de la expresión de MITF realizamos la medición del diámetro y del número de fibras cardiacas de los corazones en las diferentes condiciones experimentales. En la Figura 2-4E, se muestra la representación gráfica del diámetro promedio de las fibras miocárdicas de corazones de cobayos transducidos con el RNA pequeño no específico (sh-inespecífico) ($38,7\pm 14,7$ μm), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh específico de MITF) ($50,2\pm 16,1$ μm) y con solución salina (Sin interferente) como un control de simulación de la transducción ($41,6\pm 12,8$ μm). La comparación de los diámetros máximos y mínimos de algunas fibras cardiacas también resultó en un aumento relativo en las fibras musculares tratadas con el interferente específico de MITF (shMITF) comparado con los máximos y mínimos de las fibras tratadas con el interferente inespecífico y sin interferente (mínimos: $22,9\pm 3,5$ vs $18,5\pm 4,1$ vs. $20,9\pm 3,2$ μm y máximos $101,6\pm 11,8$ vs $88,77\pm 13,7$ Vs $85,9\pm 13,8$ μm , respectivamente). Estos resultados sugirieron que hubo un incremento estadísticamente significativo ($n=150$ fibras analizadas, $p\leq 0,05$) en el diámetro de los miocitos que tenían menor expresión de MITF.

Interesantemente, cuando se cuantificó el número de fibras miocárdicas de los cortes histológicos de los corazones de cobayos transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh específico de MITF) y con solución salina (Sin interferente) como un control de simulación de la transducción se observó que habían 178 ± 16 , 102 ± 4 , 156 ± 4 fibras por campo microscópico, respectivamente ($n=3$ cortes analizados, $p\leq 0,05$). Este resultado sugirió cambios en el número de células asociado con los diferentes niveles de expresión de MITF.

Figura 2-4. Análisis histopatológico, índice cardiaco, diámetro y número promedio de las fibras musculares de los corazones asociados con la disminución del mRNA y de la proteína MITF en corazón completo por la tecnología de interferencia del RNA. En el panel superior se observan tres microfotografías de cortes transversales de corazones de cobayo teñidos con azul de toluidina después haber sido **(A)** transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), **(B)** transducidos con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh-específico de MITF) y **(C)** inoculados con solución salina, sin interferente, como un control de simulación de la transducción (Sin interferente). Las flechas indican la presencia de tejido fibroso y algunas fibras miocárdicas de mayor tamaño que las observadas en los otros dos cortes. **(D)** Representación gráfica de los índices cardiacos relativos calculados como el cociente entre el peso del corazón y el peso corporal) en cobayos transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh específico de MITF) y con solución salina (Sin interferente) como un control de simulación de la transducción (n=3, barras ES., * diferencia estadísticamente significativa, $p \leq 0,05$). **(E)** Representación gráfica del diámetro promedio de las fibras miocárdicas de corazones de cobayos transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh específico de MITF) y con solución salina (Sin interferente) como un control de simulación de la transducción (n=50, barras ES., * diferencia estadísticamente significativa, $p \leq 0,05$). **(F)** Representación gráfica del número de fibras miocárdicas por campo de corazones de cobayos transducidos con un RNA pequeño no específico (sh-inespecífico), con un RNA pequeño interferente específico de MITF (sh específico de MITF) y con solución salina (Sin interferente) como un control de simulación de la transducción (n=3, barras ES., *diferencia estadísticamente significativa, $p \leq 0,05$).



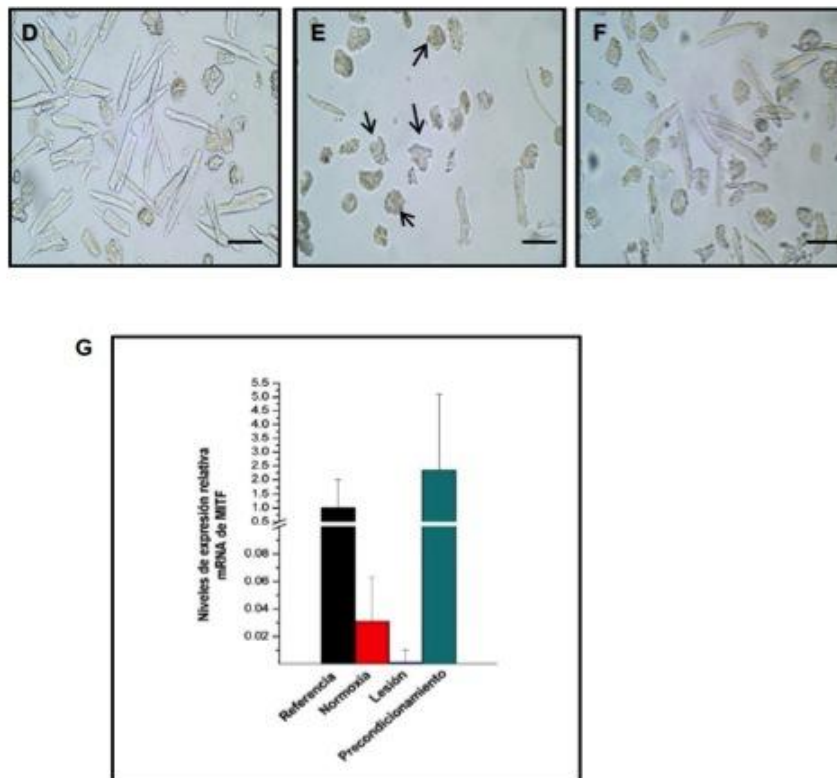
2.2.3 Niveles relativos de expresión de MITF en cardiomiocitos aislados sometidos a diferentes condiciones de supervivencia

Para establecer una posible asociación entre la expresión de MITF con la supervivencia de las células cardiacas, examinamos la expresión de MITF en cardiomiocitos ventriculares adultos aislados que fueron sometidos a condiciones de pérdida y protección de la viabilidad por isquemia y precondicionamiento isquémico, respectivamente, según el protocolo presentado en las figuras 2-5A, B y C (49,50). Las células cardiacas aisladas en condiciones de normoxia (21% de oxígeno) (Figura 2-5A y D), presentaron morfología de bastón con la presencia de sarcómeras morfológicamente bien definidas (en más del 90% de las células), que son características propias de cardiomiocitos viables. En contraste, en los cardiomiocitos sometidos a lesión por isquemia simulada (1% de oxígeno) (Figura 2-5B y E), se observó un acortamiento (hipercontractura) en el tamaño de las células, las membranas celulares eran irregulares, con pérdida de la integridad de las sarcómeras y disminución de la viabilidad celular entre 30 y 50% comparado con el grupo en condiciones de normoxia. Estas características indicaron que la exposición de las células cardiacas aisladas a estas condiciones de isquemia simulada (Figura 2-5B) resultó en lesión celular (Figura 2-5E, flechas). Para el grupo de células cardiacas sometidas a protección por precondicionamiento isquémico (Figura 2-5C y F), se observó que la gran mayoría de células (entre 65-75%) tenían características morfológicas similares a las de las células en condiciones de normoxia (Figura 2-5F), lo que confirmó que el protocolo empleado para inducir lesión y protección evaluado por las características de supervivencia celular en respuesta a la isquemia experimental fueron efectivos y reproducibles (Gómez LA *et al*, 1997; Gómez LA *et al*, 2006).

De cada grupo celular experimental descrito arriba, se realizó la extracción de ARN y síntesis de cDNA y mediante PCR en tiempo real se evaluó el nivel de expresión del mRNA para MITF-H en los grupos experimentales mencionados, empleando GAPDH como gen de normalización. El análisis se realizó por PCR en tiempo real a partir de los cDNA y para la comparación de los niveles relativos de expresión se tomaron los valores Ct medidos en función de la cantidad de cDNA inicial de todas las réplicas por cada grupo experimental, amplificadas mediante qPCR en un mismo experimento y considerando las diferencias en las eficiencias de amplificación (Scheffe JH *et al*, 2006). Los cálculos se realizaron empleando una curva de calibración estándar con (R2 mayor de 0,998 para todos los experimentos) y mediante el análisis $\Delta\Delta C(t)$ utilizando como valor de referencia el nivel de expresión de MITF-H de cDNA obtenido del corazón completo ($1,0\pm 0,5$) (Figura 2-5G), de manera similar a como se obtuvieron los resultados graficados en las figuras 2-3A y 2-3B. Mediante estos ensayos se evidenció una expresión diferencial de la isoforma H de MITF en cardiomiocitos ventriculares aislados en condiciones de isquemia experimental (lesión por isquemia simulada) ($0,01\pm 0,001$), normoxia ($0,03\pm 0,006$) y precondicionamiento isquémico ($2,3\pm 0,9$) (Figura 2-5G). Este resultado sugirió que los niveles relativos de expresión de MITF se incrementan de manera significativa (entre 2 a 100 veces, $n=3$, $p\leq 0,05$) en cardiomiocitos aislados, sometidos a condiciones de protección contra la isquemia por precondicionamiento inducido por periodos breves de isquemia-reoxigenación de acuerdo con el protocolo de la Figura 2-5C (Gómez LA *et al*, 1997; Gómez LA *et al*, 2006; Gómez LA, 2013).

Figura 2-5. Cambios en los niveles relativos de la expresión de MITF-H en cardiomiocitos sometidos a lesión por isquemia y a protección de la viabilidad por pre-acondicionamiento isquémico. En el panel superior se muestra el esquema del protocolo empleado para la obtención de cardiomiocitos en condiciones de viabilidad. (A) Cardiomiocitos en normoxia (21% O₂), en el cual a las células se les permitió el intercambio de oxígeno o reperfusión durante 90 minutos. (B) Cardiomiocitos en condiciones de lesión por isquemia simulada, en el cual a las células se les impidió el intercambio de oxígeno durante 30 minutos por precipitación celular y disminución del intercambio gaseoso (1% O₂) a temperatura ambiente y durante 1 hora a 37°C. (C) Cardiomiocitos en condiciones de preacondicionamiento isquémico, PCI, en donde a las células se les sometió a breves periodos de isquemia (1% O₂) y reperfusión (21% O₂) en un tiempo total de 30 minutos y a isquemia térmica durante 1 hora a 37°C. RS=reperfusión; IS=isquemia simulada; IST, isquemia simulada térmica. En el panel intermedio se muestran microfotografías representativas (n=10) de los cardiomiocitos en las tres condiciones descritas en A, B y C, respectivamente. (D). Células cardiacas en normoxia. Nótese la forma en bastón de los cardiomiocitos viables. (E) Cardiomiocitos sometidos a lesión por isquemia simulada, en donde se observa un acortamiento relativo en el tamaño de las células, membranas celulares irregulares y pérdida de la integridad sarcoplásmica, que se indica con las flechas). (F) Células cardiacas sometidas a protección por pre-acondicionamiento isquémico, obsérvese que la gran mayoría de células tienen características morfológicas similares a las de células en normoxia. Aumento 10X, la barra corresponde a 50 μm. (G). Análisis de los niveles de expresión relativa del mRNA de la isoforma MITF-H en normoxia, sometidas a lesión por isquemia simulada y a pre-acondicionamiento isquémico. El análisis se realizó por PCR en tiempo real a partir de los cADN y los cálculos se realizaron mediante el análisis $\Delta\Delta C(t)$ utilizando como nivel de referencia los niveles de expresión de MITF-H obtenidas de corazón completos en condiciones de normoxia, como se describió en materiales y métodos. n=3, barras D.E., * diferencia estadísticamente significativa, p≤0,05).





2.3 Discusión

El factor de transcripción MITF juega un papel esencial en el desarrollo y en la función de varios tipos de células, incluyendo melanocitos, mastocitos, osteoclastos, entre otros. Varias isoformas de MITF han sido descritas, pero la relevancia de esta diversidad y sus funciones biológicas aún no han sido completamente elucidadas. Además, muy poco se sabe sobre su expresión y su función en corazón y en especial en las células cardíacas (Steingrimsson E, 2008; Shibahara S *et al*, 2001; Kuiper RP *et al*, 2004).

En este trabajo se logró amplificar e identificar el exón 1 de la isoforma de MITF-H en corazón y cardiomiocitos aislados de cobayo. Se describen algunos cambios morfológicos cardíacos asociados con el knockdown inducido por RNA interferente específico de MITF y se analiza la expresión de MITF-H en cardiomiocitos sometidos a condiciones de lesión y precondicionamiento isquémico. La amplificación específica y el análisis de la secuencia de nucleótidos obtenida demostró que la isoforma H de MITF de corazón y células cardíacas aisladas de cobayo es diferente a las reportadas para humano, rata y ratón, siendo en el momento del envío al GenBank la primera secuencia parcial para este gen reportada para Guinea pig (Número de acceso al GenBank: JF_309109.1) (Figuras 2-1 y 2-2). Por lo tanto, la identificación y expresión de MITF-H en corazón completo y en los cardiomiocitos aislados, que son una preparación libre de otros tipos de células (Gómez LA *et al*, 1997; Gómez LA *et al*, 2006; Gómez LA, 2013), permiten deducir que la isoforma H de MITF se expresa de manera específica en estas

células cardíacas.

Poco se sabe de la función de MITF en tejido cardíaco. En este trabajo, encontramos evidencia experimental que muestra que la disminución relativa de la expresión de MITF inducida por un RNA interferente específico en el corazón de cobayos durante un periodo de 30 días, se asoció con una diferencia aparente en los niveles de expresión relativa del transcrito de MITF y de su proteína (Figura 2-3). Esto puede sugerir que en corazón, la regulación de MITF es mayor a nivel post-transcripcional que post-traducciona. Además, estos cambios se asociaron con incremento en el peso, en el diámetro de las fibras cardíacas y en una reducción relativa del número de fibras cardíacas (Figura 2-4), lo que sugiere que MITF podría estar involucrado en la regulación del crecimiento cardíaco y especialmente en hipertrofia cardíaca. Estos resultados son consistentes con los resultados del trabajo publicado por Tshori *et al* en el año 2006, quienes describieron que ratones con mutación en el gen MITF muestran una respuesta hipertrófica disminuida ante la estimulación beta-adrenérgica, con una función cardíaca disminuida y una tendencia a la muerte súbita; concluyendo que MITF puede tener un papel importante en la hipertrofia cardíaca inducida por beta-adrenérgicos (Tshori *et al*, 2006). La evidencia experimental disponible en conjunto, sugiere que MITF-H está involucrado directa o indirectamente en la regulación del crecimiento en tamaño de las células cardíacas.

El crecimiento hipertrófico se acompaña de muchas alteraciones cardíacas, incluyendo la enfermedad isquémica, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca y la enfermedad valvular, entre otras (Gómez LA, 2011; Komuro I, 2001). A nivel celular, la hipertrofia de los cardiomiocitos es caracterizada por un incremento en el tamaño de la célula, aumento de la síntesis de proteínas y reorganización de las sarcómeras y a nivel molecular, estos cambios en el fenotipo celular se acompañan de alteración en la expresión de genes estructurales y factores de transcripción que regulan vías de señalización encargadas de la supervivencia y viabilidad de las células cardíacas (Shizukuda Y *et al*, 2002; Bernstein D *et al*, 2005; Gómez LA *et al*, 1997; Gómez LA *et al*, 2006; Gómez LA, 2013). Sin embargo, y a pesar de que existe evidencia clínica robusta, el conocimiento sobre los eventos moleculares que desencadenan la hipertrofia cardíaca, aun son muy incipientes. Por lo tanto, es importante estudiar los mecanismos moleculares por los cuales MITF podría estar regulando el crecimiento y la viabilidad del tejido cardíaco.

Aunque el mecanismo celular y molecular del control de crecimiento y de la hipertrofia cardíaca asociado a la mutación de MITF en corazones de ratón (Tshori *et al*, 2006) y a la disminución de su expresión en corazones de cobayo (este trabajo) no se conoce, es posible que el mecanismo sea diferente según el tipo de modelo experimental. Los análisis de expresión de MITF-H empleando los cDNA obtenidos de células sometidas a lesión por isquemia simulada, muestran que la expresión del mRNA de MITF-H disminuye con respecto al grupo de células sometidas a protección por pre-acondicionamiento isquémico (Figura 8), indicando que MITF puede estar implicado en la regulación de la viabilidad en respuesta a la isquemia inducida experimentalmente. Este resultado, permite especular que en el caso del modelo presentado en este trabajo, la hipertrofia se pudiera presentar y asociar a una respuesta adaptativa alterada como consecuencia de la pérdida del número de cardiomiocitos y de la masa contráctil del miocardio, mientras que en el caso de la hipertrofia cardíaca en el modelo ratón (Tshori *et al*, 2006) ésta podría estar asociada a una respuesta adaptativa alterada a la presión arterial inducida.

Considerando que la regulación funcional de la transcripción es fundamental para el desarrollo y función del corazón, el avance en el conocimiento del mecanismo de regulación y de los genes blanco del factor de transcripción MITF en tejido cardíaco es necesario para avanzar en el conocimiento de la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares más frecuentes que se asocian a hipertrofia cardíaca como la hipertensión arterial, la falla cardíaca, el infarto agudo del miocardio, entre otras. Consistente con esta propuesta derivada de los resultados experimentales es la evidencia existente de cambios en perfiles de expresión génica en los ventrículos derecho e izquierdo de corazones normales y con falla cardíaca, que muestran que en el ventrículo izquierdo de corazones con falla cardíaca están regulados negativamente genes implicados en la producción de energía, en contracción cardíaca incluyendo la regulación de la longitud de filamentos de actina y en la modulación del acoplamiento de excitación-contracción. Adicionalmente, en corazones con falla cardíaca, se encuentra que los factores de transcripción fetales como MEF2 y el factor de respuesta al estrés ATF4 presentan diferencias de expresión interventricular (Gao Z *et al*, 2006). Es importante resaltar que en nuestro estudio, las células cardíacas aisladas fueron obtenidas de cardiomiocitos ventriculares.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio, permiten sugerir que la isoforma H de MITF se expresa en cardiomiocitos aislados de cobayo y en corazón completo. Además, la expresión diferencial de MITF-H a nivel de mRNA y de proteína en cardiomiocitos sometidos a condiciones de lesión y protección sugieren que de manera directa o indirecta MITF podría regular la expresión de genes relacionados con crecimiento y viabilidad de las células cardíacas. Como consecuencia, la expresión y actividad de esta isoforma puede ser importante en la regulación de la supervivencia de las células cardíacas, en la respuesta al estrés por isquemia y a condiciones asociadas con hipertrofia cardíaca, ya sea por regulación específica de la isoforma H o por la regulación de genes blancos de MITF-H involucrados en estas alteraciones cardiovasculares. Finalmente, se requieren investigaciones adicionales para esclarecer el papel desempeñado por MITF-H en la fisiología y patología del corazón y de la célula cardíaca.

3. Caracterización de potenciales genes diana del Factor de transcripción asociado a Microftalmia (MITF)

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de patologías multifactoriales, con alto grado de complejidad en las que se desconocen la gran mayoría de los posibles genes blanco y muchos de los mecanismos celulares y moleculares implicados en su patogénesis. Los factores de transcripción y los genes regulados por estos, son imprescindibles en la supervivencia de la célula cardiaca, sin embargo, su función, aún es incierta. Entre estos genes se encuentran el Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF-H) y algunos de sus genes blanco como la cadena liviana de la miosina (MLC), la endonucleasa APE, la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2), el gen antiapoptótico BCL2, el factor inducible de hipoxia 1 alfa, el canal de cloruro CLCN7, la endonucleasa APE, el receptor de la endotelina EDNRB-1 y la subunidad Kir6,2 del canal de potasio sensible al ATP, entre otros.

El factor de transcripción asociado a microftalmia codifica para una proteína de unión a ADN de la familia hélice-loop-hélice cremallera de leucina básica (bHLH-Zip) que regula la transcripción de genes por unión a elementos en los promotores de sus genes blanco, conocidos como cajas M y E. A nivel cardiaco, este gen ha sido asociado con hipertrofia cardiaca, pero no se conoce su nivel de expresión y su papel en célula cardiaca aislada, ni cuáles de sus genes blancos podrían estar implicados en la enfermedad cardiaca isquémica.

Al clasificar los genes como potenciales blancos de MITF, encontramos que estos participan en diferentes procesos celulares como apoptosis (BCL2); angiogénesis e hipoxia (HIF-1 α); estrés oxidativo y procesos de reparación al daño del ADN (endonucleasa APE); diferenciación celular (canal de cloruro Clcn7), proliferación celular y vasoconstricción (CDK2, Receptor de endotelina tipo B); homeostasis y sobrevivencia celular (KIR 6,2, MLC4), entre otros.

La función de algunos de los genes mencionados, mediada a través de MITF ha sido documentada en años recientes en melanoma u otros tipo de cáncer y diferentes tipos celulares, pero a nivel cardiaco la evidencia científica sobre la regulación de MITF y sus potenciales genes blanco es muy insipiente.

Está bien documentado que la apoptosis es una forma importante y definitiva de muerte celular que tiene estrecha relación con las enfermedades cardiovasculares. En los últimos 10 años se han publicado hallazgos que sugieren que la regulación de la apoptosis puede estar alterada en diversas enfermedades del corazón y de los

vasos sanguíneos, entre las cuales se encuentran las cardiomiopatías isquémica e hipertrófica, arteriopatía hipertensiva, aterosclerosis y angiopatía diabética, entre otras (Wang Y *et al*, 1998; Nanda J *et al*, 2000; Jutta Schaper *et al*, 1999; Saraste A *et al*, 1997). Durante el desarrollo prenatal del corazón la desaparición de células por apoptosis desempeña un papel importante en su configuración morfológica definitiva. Se ha comprobado que el índice apoptótico de los corazones neonato es mucho mayor en el ventrículo derecho (VD) que en el izquierdo, esta diferencia es la responsable de la diferenciación de la masa contráctil de ambos ventrículos. Una cantidad importante de células de ese ventrículo mueren de manera programada después del nacimiento. Esto puede durar unos días pero en ciertas condiciones se prolonga indefinidamente y ocurre la denominada miocardiopatía de Uhl, caracterizada por una dilatación extrema del ventrículo derecho, con la consecutiva insuficiencia ventricular derecha (James TN, 1994). Dentro de los muchos reguladores de la apoptosis el gen antiapoptótico BCL2, promueve la supervivencia celular por la formación de heterodímeros con proteínas BAX. La expresión de Bcl-2 en insuficiencia cardíaca, en ausencia de cambios en la cantidad de los niveles de BAX sugiere, que mecanismos compensatorios se han activado en el miocardio sobrecargado a fin de mantener la supervivencia celular (Ing DJ *et al*, 1999). Bcl-2 es una familia de proteínas formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. Su nombre deriva de la proteína fundadora, el protooncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), segundo miembro de un grupo de proteínas inicialmente descrito en estudios de la translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18 observada en linfomas foliculares. A diferencia de otros oncogenes estudiados hasta la fecha, Bcl-2 no estaba implicado en el control de la proliferación celular sino en el bloqueo de la muerte celular, más específicamente de los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear, desorganización de la membrana plasmática y ruptura endonucleolítica del ADN. Es un blanco de MITF descrito por McGill GG y colaboradores desde el 2002, y a pesar de que se ha reportado que la sobreexpresión de BCL2 mejora la tolerancia miocárdica a la isquemia-reperusión evitando fragmentación del ADN (Sawa Y *et al*, 1995), no se ha descrito si MITF regula a BCL2 en este proceso biológico o si es un blanco directo de este gen en corazón.

APE1 (apurinic/ apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1, APEX1/Ref1) es una endonucleasa multifuncional que participa en la ruta de reparación por escisión de bases hidrolizando el enlace fosfodiéster en 5' inmediato a un sitioapurínico/apirimidínico (AP). Los sitios AP se generan como consecuencia de la hidrólisis espontánea del enlace N-glucosídico entre el residuo de desoxirribosa y la base nitrogenada, y también son producidos por agentes exógenos, daño oxidativo o por las ADN glucosilasas y dichos sitios constituyen la forma más común de daño en el ADN y su persistencia da lugar a bloqueo en la replicación, mutaciones citotóxicas e inestabilidad genética. En ciertas circunstancias, APE1 parece ser uno de los pasos limitantes de la velocidad en la reparación por escisión de bases y aunque recientemente se reportó que esta enzima es un blanco potencial de MITF, su papel en miocitos y tejido cardíaco aún no ha sido explorado, sin embargo, es factible que APE1 a nivel cardíaco sea una proteína multifuncional responsable no sólo de la reparación de los sitios AP sino también de otras funciones como factor redox, manteniendo los factores de transcripción en estado activo reducido (Yamauchi A *et al*, 2013).

Por su parte, el Factor inducible de hipoxia 1 α (HIF1 α) puede ser activado a nivel transcripcional mediante la unión directa de MITF a la región promotora de HIF1 α actuando como un factor antiapoptótico en células de melanoma. A nivel cardíaco, en experimentos en ratón, se ha observado que episodios breves de hipoxia intermitente bastan para inducir la producción de EPO, que a su vez protege al corazón del daño apoptótico por isquemia-reperusión (Liu Y *et al*, 2014); En la insuficiencia cardíaca (IC), existe aumento de ET-1, que si bien tiene un efecto inotrópico positivo, en el largo plazo favorece la hipertrofia miocárdica y la mala adaptación y en el preacondicionamiento cardíaco ante la isquemia, en el que tiene un papel relevante la síntesis de nuevas proteínas en las primeras 24 h que siguen a un episodio agudo, con particular referencia a la NOS2 en miocardiocitos y células endoteliales, HIF-1 es esencial en esta inducción. Tampoco es clara la regulación entre MITF y HIF-1 α en miocitos aislados.

Por otro lado, el sistema endotelina está involucrado esencialmente con la hipertensión arterial sistémica, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, reestenosis coronaria, falla cardíaca, cardiomiopatías e insuficiencia cardíaca; específicamente, los receptores de endotelina A están localizados principalmente en el músculo liso vascular y son responsables de inducir la proliferación celular y vasoconstricción, mientras que los receptores de endotelina tipo B están presentes en las células endoteliales y son mediadores de la relajación vascular por activación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina, e intervienen en la depuración de la ET-1 (Hua LL *et al*, 2014; Welsh IC *et al*, 2000). La función de estos receptores mediada por MITF aún no se conoce totalmente.

En el proceso de diferenciación de osteocitos, el canal de cloruro CLCN7 juega un papel muy importante y se conoce que en ratones mutaciones en dicho gen conducen a ostopetrosis. Aunque en este modelo se reportó la regulación de CLCN7 por MITF, en corazón y en células cardíacas aisladas su papel aun es incierto. (Kornak U *et al*, 2001)

La cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) además, conocida como proteína cinasa 2 de la división celular, es una serina- treonina cinasa cuya actividad regulada por fosforilación, está restringida a la fase G1/S del ciclo celular siendo esencial en la transición de G1 a S, en donde se asocia con ciclinas E y A para cumplir su función (Liem DA *et al*, 2008; Tane S *et al*, 2014). En melanoma, ha sido descrito que CDK2 es un blanco de MITF, sin embargo, a nivel de miocitos cardíacos la literatura sobre la asociación CDK2/MITF aún es desconocida.

Los canales de potasio sensibles a ATP, fueron descritos hace más de dos décadas en parches de membrana plasmática de cardiomiocitos ventriculares y más tarde encontrados en otros tejidos incluyendo el cerebro, el músculo liso y esquelético, el endotelio y el páncreas, órgano en donde se les ha relacionado con la secreción de la insulina. Debido a que estos canales se activan al disminuir la concentración de ATP intracelular y acoplan el metabolismo miocárdico con la actividad eléctrica, se propuso que durante la hipoxia estos canales podrían servir como un mecanismo endógeno de cardioprotección, al acortar la duración del potencial de acción y limitar la entrada de calcio a las células cardíacas (Chen ZC *et al*, 2012; Alekseev AE *et al*, 1997). Hasta 1994 se asumía que éste era el mecanismo de acción del preacondicionamiento isquémico (PCI) y que el efecto protector de los agonistas de los

canales de KATP contra el daño por reperfusión se debía a su acción sobre dichos canales. Sin embargo, a partir del trabajo de Yao y Gross se acumularon evidencias de que el efecto protector no siempre correlacionaba con la reducción del potencial de acción, situación que implicaba la existencia de sitios adicionales, posiblemente intracelulares, para explicar el efecto protector de estos agonistas (Gross GJ *et al*, 1996 y 2000). Estos canales están formados por dos dominios transmembranales, en donde Kir6.2 un canal iónico rectificador de potasio (inward-rectifier potassium ion channel) es la subunidad mayor del canal (Chen ZC *et al*, 2012; Alekseev AE *et al*, 1997). El gen que codifica para el canal es KCNJ11 y sus mutaciones están asociadas con hiperinsulinismo congénito. Como en los genes mencionados anteriormente, no existe literatura científica que reporte la interacción y regulación de dicho canal por MITF. Análisis bioinformático realizado por nosotros, permitió establecer que en el promotor del gen que codifica para el canal, se encuentran cajas M y E, permitiendo sugerir que MITF puede de alguna forma regulando su función en miocitos cardiacos.

La proteína cinasa C (PKC) pertenece a una familia de enzimas que mediante fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serinas y treoninas controlan la función de otras muchas proteínas, jugando un papel importante en varias cascadas de transducción de señales. El mecanismo de activación de la PKC ha sido bien establecido para el precondicionamiento isquémico e involucra la activación de un receptor de membrana (A1), y la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (Liu X *et al*, 2014). Específicamente, el IP3 provoca liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y el DAG activa a la proteína quinasa c la cual produce un precondicionamiento de los canales de K⁺, interviene en la contractilidad y pone en marcha factores de crecimiento celular que podrían estar relacionados con la hipertrofia cardíaca en aquellos pacientes con sobre estimulación adrenérgica (Mackay K *et al*, 1999; Fan HC *et al*, 2014). Sin embargo, y a pesar del conocimiento existente en la actualidad acerca del mecanismo del precondicionamiento, no ha sido estudiado en detalle si la activación de las PKC durante la isquemia reperfusión, y sus potenciales efectos protectores podría estar mediados por MITF.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, el objetivo específico 3 fue “Identificar *in silico* genes cardiacos que contengan elementos de respuesta a MITF y que puedan estar implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica”.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Aislamiento de células cardiacas

El aislamiento de células ventriculares se realizó a partir de corazones de cobayos Hartley Cavia porcellus hembras adultos de 250-300 g, empleando un sistema de perfusión retrograda tipo Langendorff y disociación enzimática con colagenasa, proteinasa K y pronasa, descrito por Gómez *et al*, 1997. Después de aislados los miocitos cardiacos se realizó el recuento celular mediante el ensayo de exclusión de azul tripán y de 100.000 a 250.000 células se separaron en tres grupos experimentales. Adicionalmente, se obtuvieron corazones completos de cobayo para realizar la extracción de ácidos nucleicos y proteínas.

Células cardíacas ventriculares aisladas de cobayo fueron transfectadas o no con siRNA-MITF y sometidas a lesión por isquemia simulada y a protección por pre-acondicionamiento isquémico fueron empleadas para realizar análisis de expresión a nivel de mRNA.

3.1.2 Extracción de ARN y síntesis de cADN

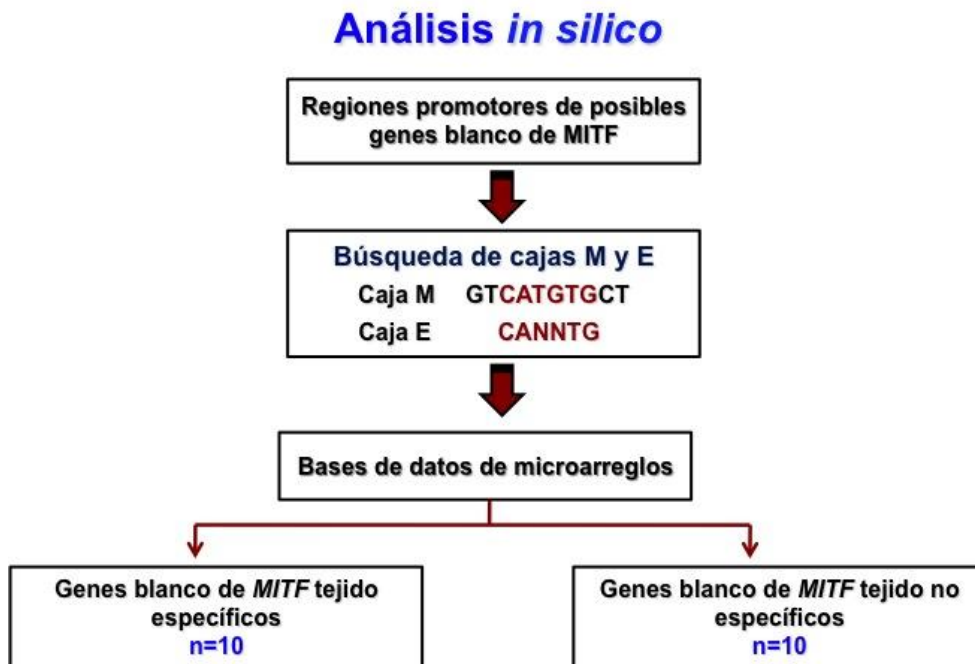
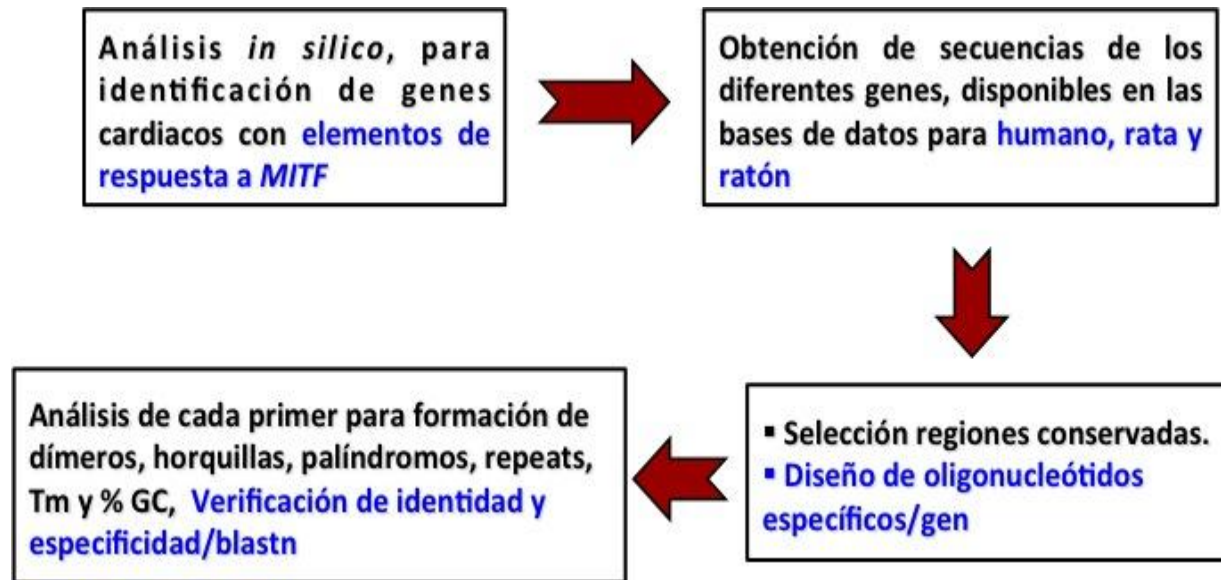
Para la extracción de ARN se empleó el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (74) y el reactivo trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). La calidad e integridad del ARN obtenido fue verificado mediante espectrofotometría a 260 nm (Relación 260/280) y electroforesis en gel de agarosa 1,5 % denaturante. La síntesis de cADN se llevo a cabo a partir de 1-3 µg de ARN total, utilizando oligo-dT y transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). La calidad e integridad del cADN obtenido se verifico mediante la amplificación del gen de expresión constitutiva GAPDH.

Los productos de amplificación fueron fraccionados en electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizados mediante tinción con nitrato de plata.

3.1.3 Análisis *in silico*

Con el fin de identificar genes cardíacos con elementos de respuesta a MITF, se realizaron análisis *in silico*; con base en las secuencias disponibles en las bases de datos para humano, rata y ratón. El análisis se enfocó hacia la búsqueda de las secuencias de las cajas M (GTCATGTGCT) y E (CANNTG) en las regiones promotoras de posibles genes blanco de MITF, y se eligieron al menos 10 genes blanco de MITF tejido específicos y 10 no específicos, pero que por reportes en la literatura pudiesen tener alguna implicación funcional cuando las células son sometidas a condiciones de estrés, hipoxia, etc. Una vez se seleccionaron los potenciales genes, se realizó la búsqueda de las secuencias para cada uno de ellos en la base de RefSeq disponibles para humano, rata y ratón, y mediante el programa clustalW, se obtuvieron los alineamientos de dichas secuencias. Para cada gen se eligieron regiones conservadas, se diseñaron varios oligonucleótidos específicos para estos genes y mediante análisis de complementariedad, formación de dímeros, porcentaje de GC, y temperatura de anillaje, entre otros, se selecciono una pareja de primers por gen para la amplificación por PCR, una vez se verificó su identidad y especificidad empleando la herramienta blastn del NCBI (Altschul SF *et al*, 1997). Estos genes o fragmentos de ellos fueron amplificados, clonados, secuenciados y caracterizados. La metodología empleada se muestra en las figura 3-1.

Figura 3-1. Esquema de la metodología empleada para los análisis *in silico*.



3.1.4 Amplificación de fragmentos de genes blanco

Para la amplificación de cada uno de los genes se estandarizaron las condiciones de PCR, se realizó la clonación con el sistema pGEM-T y verificación de la identidad de los fragmentos mediante secuenciación de ácidos nucleicos. En la tabla 1 se incluyen las condiciones de amplificación para cada gen y los tamaños de los fragmentos esperados.

3.1.5 PCR en tiempo real (qPCR)

Se realizaron análisis de expresión a nivel de mRNA en células cardiacas sometidas a lesión por isquemia simulada, a protección por preacondicionamiento isquémico, así como en células en normoxia. Como control de expresión positiva se emplearon cADNs obtenidos de aurícula y de corazón completo de cobayo.

Se utilizaron plásmidos que contienen el cDNA de cada uno de los genes blanco, previamente caracterizados mediante clonación y secuenciación de ácidos nucleicos, como estándar en al menos seis diluciones y los cADNs obtenidos a partir de células cardiacas sometidas a lesión y protección *In vitro*. Para cada ensayo se establecieron los estándares más adecuados, como controles positivos se emplearon plásmidos que contenían el cADN de cada gen y como control de reacción de PCR se empleó agua libre de nucleasas en lugar de ácido nucleico. Los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando el estuche DyNAmo HS SYBR Green (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos) y el equipo Chromo 4 (BioRad Laboratories Inc, Irvine, California, Estados Unidos). Los análisis se realizaron con el software Opticon 3 (BioRad Laboratories Inc, Irvine, California, Estados Unidos), y la metodología descrita por Schefe *et al* en 2006.

Para la normalización de los datos y para determinar la expresión relativa, se empleó la expresión del gen constitutivo GAPDH, una vez demostrado que la expresión constitutiva no varío en las diferentes condiciones experimentales.

Para el análisis de la qPCR se empleó la curva de calibración a partir de cantidades conocidas y crecientes de cDNA de cada gen, que permitió interpolar los resultados obtenidos en las reacciones de amplificación de cada una de las muestras y controles que también incluyeron diferentes cantidades de templado. En todos los casos la fluorescencia se graficó en unidades arbitrarias y se estableció la línea base (0,02). Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas para cada uno de los genes, como se indica en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Resumen estandarización de PCR y qPCR para los diferentes genes blanco de MITF.

Nombre fragmento gen	Tamaño del fragmento	Condiciones de PCR	Condiciones de qPCR	Curva de calibración	Número de cambios /secuencia de nucleótidos	Número acceso Genbank
MITF-H	281 pb	57,2°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 57.2°C/30 seg; 72°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	100 ng de ADN plasmídico (Clon CMH-5).	6	JF309109.1 GI:326418083
CDK2	306 pb	55°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 55.2°C/30 seg; 72°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg	100 ng del ADN plasmídico (clon PCI-5/CDK2)	24	JN172925.1 GI:356467136

			10°C/10 min			
EDNRβ	300 pb	54°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/30 seg; 72°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	50 ng del ADN plasmídico del (clon Control/EDNRB-1)	27	JQ773418.1 GI: 390432198
CLCN7	261 pb	54°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/40 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	ng del ADN plasmídico del (clon CTRL4/CLCN7)	29	JF894321.1 GI:335345648
HIF1A	296 pb	51°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/30 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	100 ng del ADN plasmídico del (clon CTRL2/HIF1A)	2	JQ824085.1 GI:394987312
BCL2	287 pb	54°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/30 seg; 53°C/30 seg 75°C/1 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	ng del ADN plasmídico del (clon PCI-1/BCL2)	12	JN165776.1 GI:356484675
PKC-β	333 pb	61,1°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 56,2°C/30 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	100 ng del ADN plasmídico del (clon PCI-2/PKC-β)	30	JQ773419.1 GI:390432200
APE-1	252 pb	52°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/30 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	25 ng del ADN plasmídico del (clon CC-2/APE)	12	Pendiente
Kir6.2	366 pb	59,1°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 55,9°C/40 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	50 ng del ADN plasmídico del (clon PCI-1/kir)	32	JQ773417.1 GI:390432196
MLC4	193 pb	53°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/30 seg;	25 ng del ADN plasmídico del (clon PCI-2/MLC4)	26	Pendiente

			53°C/30 seg 80°C/1 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min			
DICER	258 pb	51,6°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 52°C/30 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	50 ng del ADN plasmídico del (clon CC1/DICER)	6	Pendiente
p16	246 pb	51°C	95°C/15 min 39 ciclos: 96°C/ 10 seg; 54°C/30 seg; 53°C/30 seg 72°C/10 min Curva de melting de 65°C a 95°C/lecturas cada 0,2 °C y 1 seg 10°C/10 min	100 ng del ADN plasmídico del (clon CABZ/h P16-5)		Pendiente

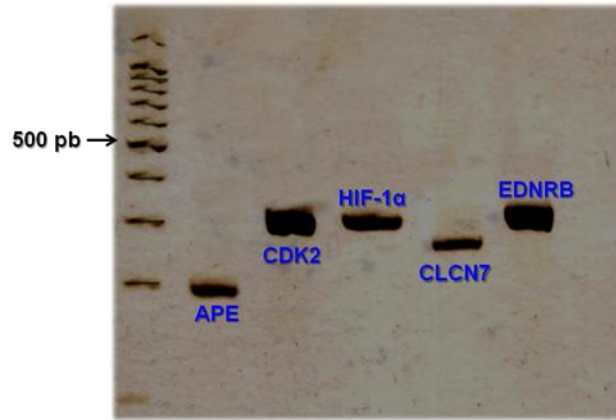
3.2 Resultados:

Mediante herramientas bioinformáticas se identificaron potenciales blancos de MITF en tejido cardiaco, se realizó la amplificación por PCR, clonación y secuenciación de los mismos, así como evaluación de la expresión relativa mediante PCR en tiempo real.

La búsqueda de secuencias reconocidas por MITF permitió identificar genes relevantes en la fisiología cardiaca como PKC-B, el canal de potasio Kir 6.2, MLC4, CLCN7, EDNRB-1 y CDK2 así como genes implicados en procesos celulares como apoptosis, control del ciclo celular, repuesta al estrés e hipoxia (APE, BCL2, CDK2, HIF-1, p21, p16).

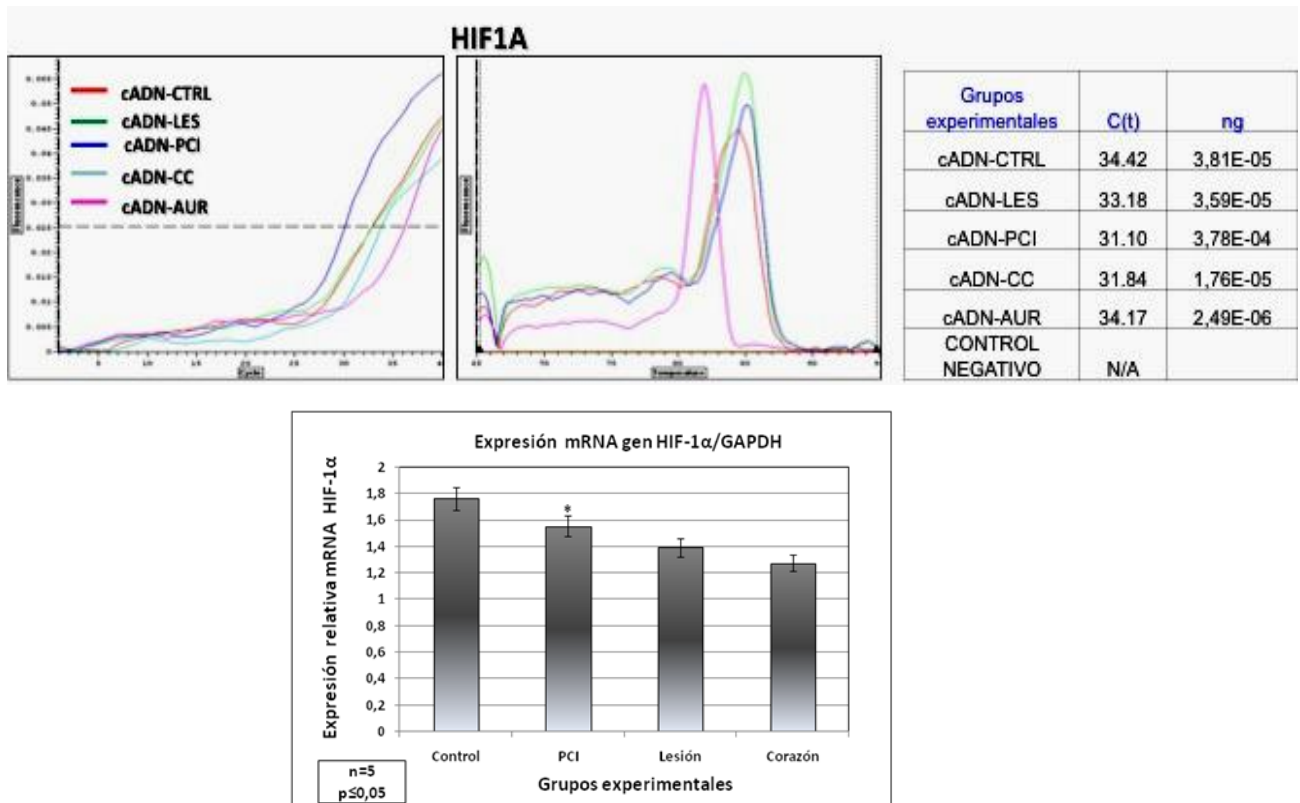
El análisis de qPCR permitió observar la expresión diferencial de MITF-H como de algunos de estos genes en células cardiacas en condiciones de isquemia y protección inducidas. Se logró la amplificación, clonación y verificación de la identidad de cada uno de los fragmentos de los genes, como se observa en la Figura 3-2 y Anexo 1.

Figura 3-2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Se muestran los productos de amplificación de algunos de los genes diana de MITF.



Mediante PCR se obtuvo un fragmento de 296 pb cuya identidad para HIF-1α fue confirmada mediante secuenciación. El nivel de expresión del transcrito fue mayor en cardiomiocitos isquémicos que en las células normóxicas y sometidas a cardioprotección. Cuando se alteró la expresión de MITF mediante siARN-MITF, se observó disminución de la expresión de HIF-1α (Figura 3-3).

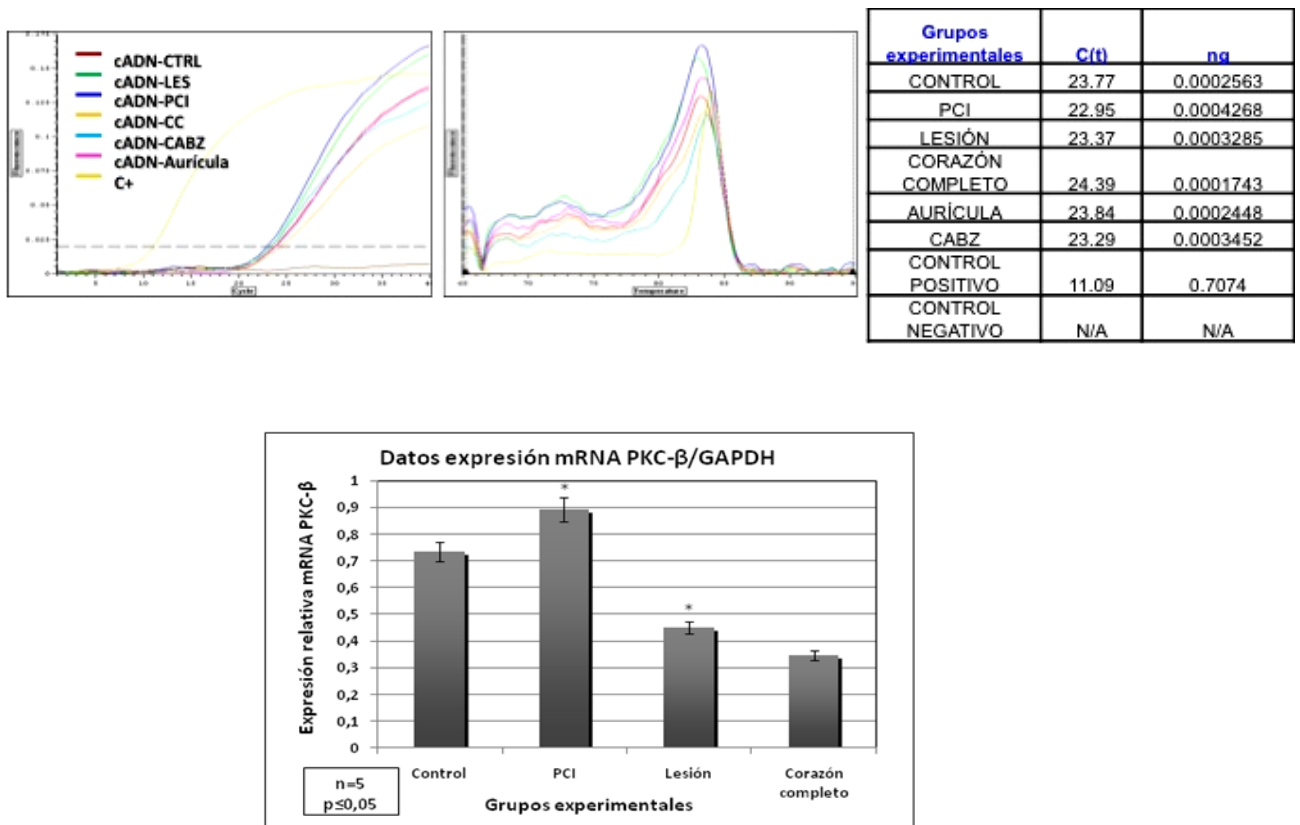
Figura 3-3. Resultados de PCR en tiempo real para el gen HIF-1α.



Se amplificó y clonó un fragmento de 333 pb de PKC-β, cuya secuencia mostró 30 cambios a nivel de nucleótidos, con respecto a las reportadas para humano, rata y ratón. Se observó un nivel de expresión mayor en células cardiacas en condiciones de cardioprotección, que en las sometidas a lesión por isquemia, cuando MITF no fue interferido. La expresión de PKC-β disminuyó cuando la expresión de MITF fue alterada mediante un siRNA-MITF específico (Figura 3-4).

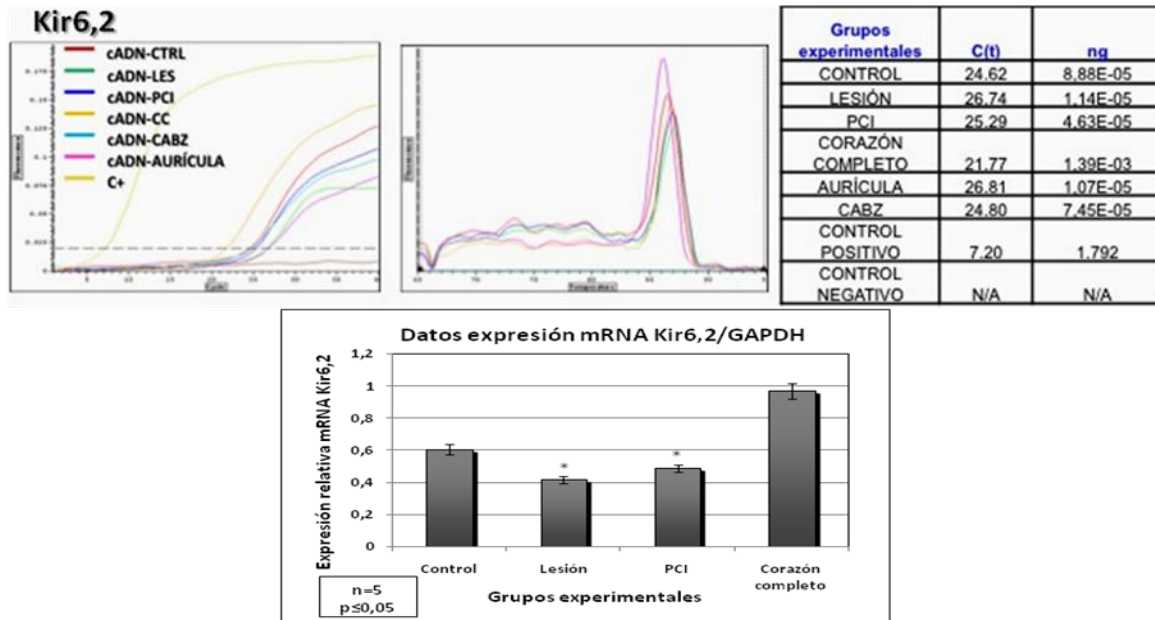
Figura 3-4. Resultados de PCR en tiempo real para el gen PKC-β.

PKC-β



Mediante amplificación por PCR se obtuvo un fragmento de Kir6.2 de 366 pb. El análisis de las secuencias obtenidas mostró 32 cambios a nivel de nucleótidos, con respecto humano, rata y ratón y un cambio con respecto a las secuencias reportadas para cobayo. En la estandarización de la qPCR para este transcrito se definió la temperatura óptima de amplificación, mediante ensayos de gradiente y curvas de calibración entre otros parámetros. Ensayos de expresión preliminares mostraron que Kir6.2 presenta un nivel mayor en células cardiacas sometidas a protección por preconditionamiento isquémico que en células lesionadas (Figura 3-5).

Figura 3-5. Resultados de PCR en tiempo real para el gen Kir6.2.



Se clonó un fragmento de 300 pb de EDNR-B, cuya secuencia mostró 31 cambios a nivel de nucleótidos y 5 cambios a nivel de aminoácidos, con respecto a las reportadas para humano, rata y ratón. En células cardíacas en condiciones de cardioprotección, se observó mayor expresión de EDNR-B que en las células sometidas a lesión por isquemia (Figura 3-6).

Figura 3-6. Resultados de PCR en tiempo real para el gen EDNRβ.

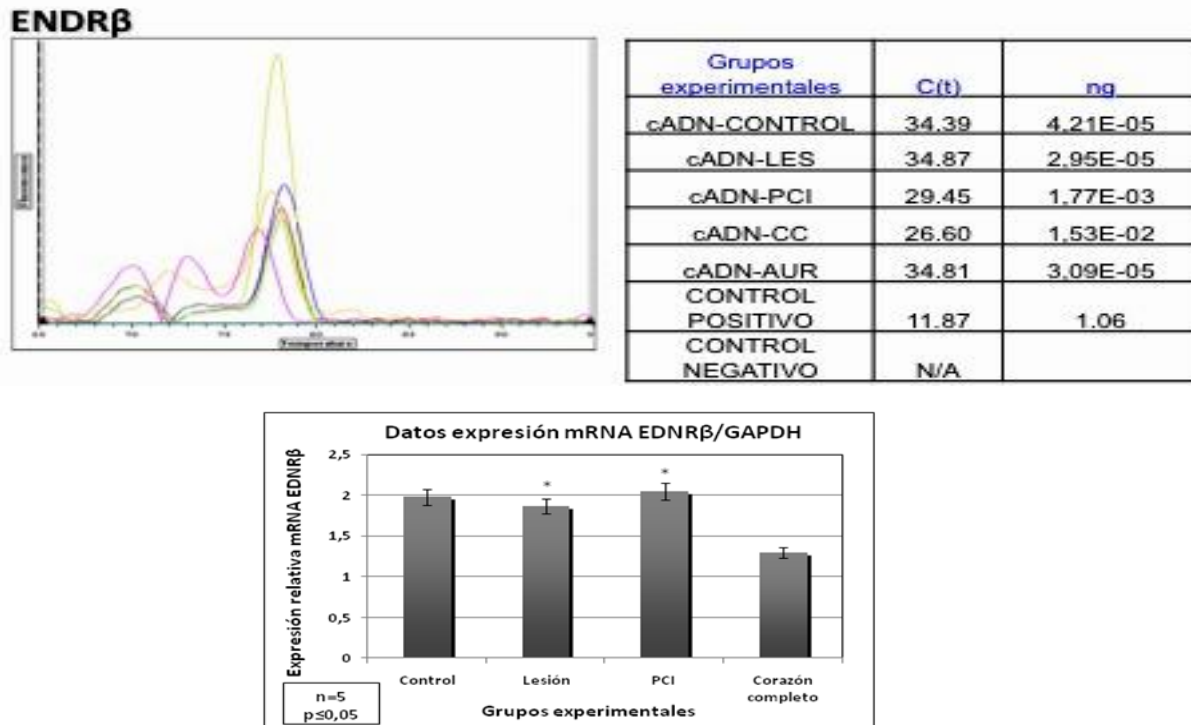
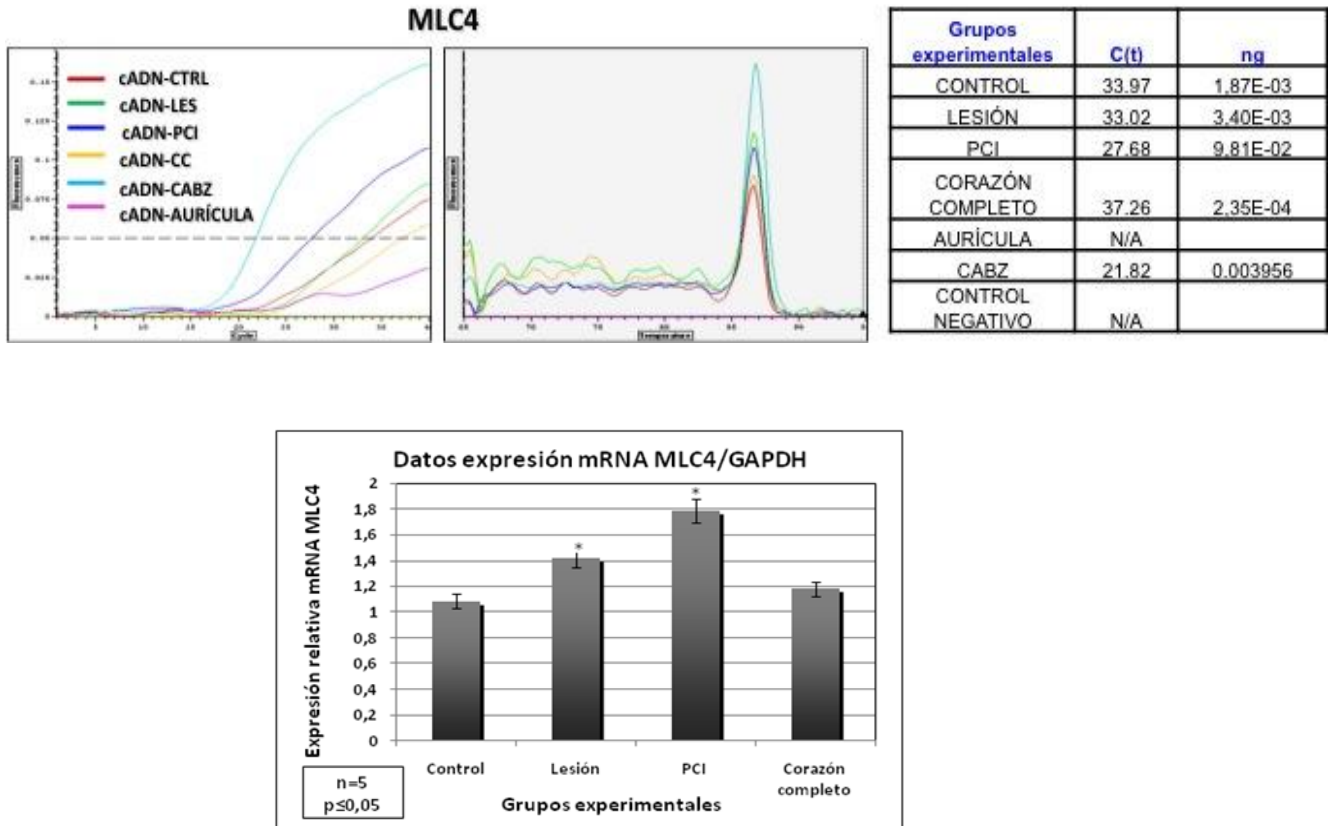
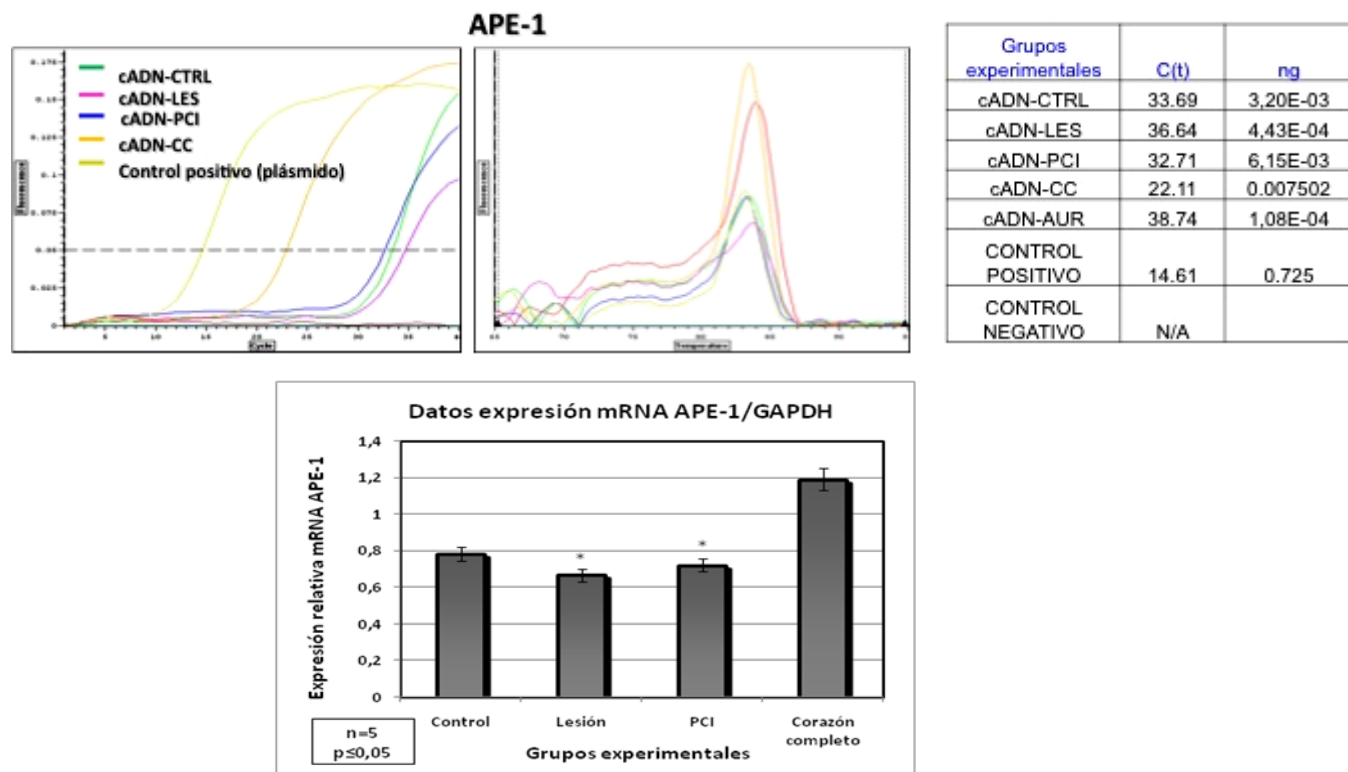


Figura 3-7. Resultados de PCR en tiempo real para el gen MLC4.



Se clonó un fragmento de 193 pb de MLC4 y de 252 pb de APE-1, cuya secuencia mostró 26 y 12 cambios a nivel de nucleótidos, respectivamente, con respecto a las reportadas para humano, rata y ratón. El análisis de expresión y de las secuencias mostró que APE y MLC presentan un nivel de expresión mayor en células en condiciones de cardioprotección, que en las sometidas a lesión por isquemia. Además, se observaron cambios a nivel de nucleótidos y aminoácidos, con respecto a las secuencias reportadas para humano, rata y ratón. (Figuras 3-7 y 3-8 y Anexo 1).

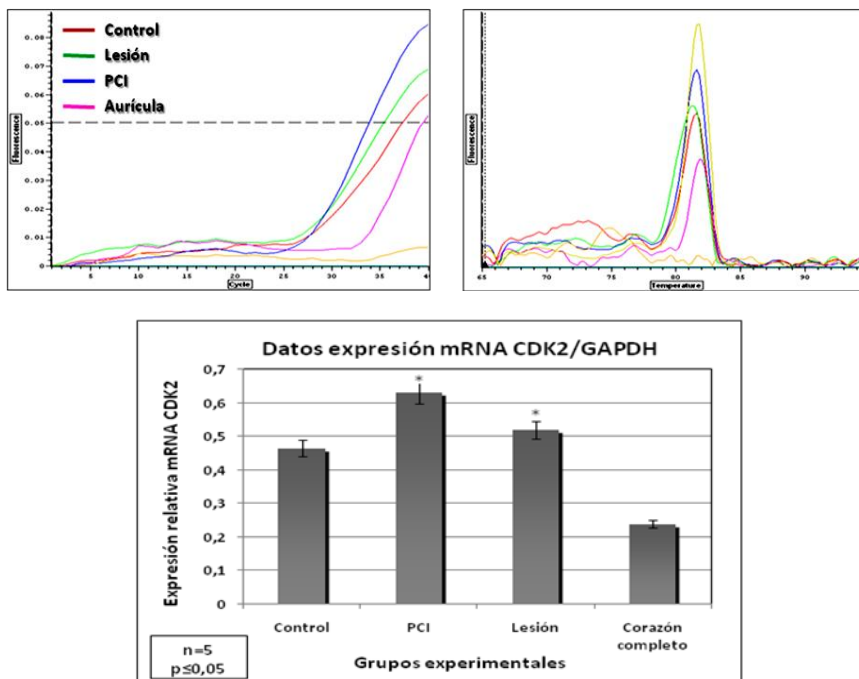
Figura 3-8. Resultados de PCR en tiempo real para el gen APE-1



La expresión diferencial de los genes MLC4 y APE-1 en cardiomiocitos aislados de cobayo sugiere un papel cardioprotector, que podría estar asociado con la regulación de genes implicados en la supervivencia celular.

Se clonó un fragmento de 306 pb de CDK2, cuya secuencia mostró 24 cambios a nivel de nucleótidos, con respecto a las reportadas para humano, rata y ratón, así como dos cambios en la secuencia de aminoácidos. El análisis de expresión a nivel mostró que CDK2 presenta un nivel de expresión mayor en células en condiciones de cardioprotección inducida por PCI, que en las sometidas a lesión por isquemia simulada, como se observa en la figura 3-9.

Figura 3-9. Resultados de PCR en tiempo real para el gen CDK2



3.3 Discusión

Las células cardiacas adultas, se caracterizan por un estado de diferenciación terminal que limita la proliferación de miocitos y la respuesta a la isquemia y reperfusión (I/R) que en el corazón son acompañadas por cambios en la expresión y modificación postraduccional de proteínas involucradas en el control del ciclo celular. La cinasa dependiente de ciclina, CDK2, podría regular vías de señalización apoptóticas inducidas por hipoxia, en cardiomiocitos neonatales *in vitro* (Liem DA *et al*, 2008; Tane S *et al*, 2014). Sin embargo, el papel de este gen no es claro en células cardiacas adultas expuestas a isquemia experimental. El gen CDK2 se expresa diferencialmente en cardiomiocitos aislados de cobayo sugiriendo un papel cardioprotector que podría estar asociado con la regulación de otros genes del ciclo celular como p21 y p16

La respuesta a la hipoxia y el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno, a nivel celular, es regulada por el Factor de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) (Liu Y *et al*, 2014). A pesar de que se ha descrito su importancia en vascularización embriónica, angiogénesis y en la patofisiología de la enfermedad isquémica, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual HIF-1 α aumenta la liberación de oxígeno y proporciona la adaptación metabólica en condiciones de disponibilidad reducida de oxígeno y como el Factor de transcripción asociado a Microftalmia (MITF-H) puede alterar su función. La expresión de los factores de transcripción HIF-1 α y MITF podría sugerir un mecanismo de co-regulación para adaptación metabólica y protección en cardiomiocitos.

La proteína cinasa C (PKC) beta es una serina-treonina cinasa que fosforila proteínas implicadas en la regulación de diversas funciones cardiovasculares, que incluyen entre otras, la contractilidad, la proliferación celular y la permeabilidad vascular (Mackay K *et al*, 1999; Fan HC *et al*, 2014). El gen PKC- β es un blanco potencial del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) que es un gen importante en la sobrevivencia celular, pero no es claro su papel en células cardíacas. La expresión diferencial de PKC- β y de MITF en cardiomiocitos aislados de cobayo podría sugerir un papel en cardioprotección

En cardioprotección es relevante el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en isquemia/reperfusión, así como la búsqueda de genes que puedan estar regulando estos procesos. Entre dichos genes los canales de potasio sensibles a ATP (KATP) parecen tener un papel importante en la protección desencadenada por el preconditionamiento isquémico, actuando como uno de los efectores finales de la cascada de eventos que producen el efecto protector. Los KATP son un miembro de la superfamilia de los canales rectificadores internos del K⁺ (Kir), constituidos por la fusión de 4 subunidades Kir específicas, llamadas Kir6.x y 4 receptores de sulfonilurea (SUR), de los que se desconoce su nivel de regulación bajo diferentes condiciones de regulación cardíaca (Chen ZC *et al*, 2012; Alekseev AE *et al*, 1997; Gross GJ *et al*, 1996 y 2000). El gen Kir6.2 de los canales de potasio sensibles al ATP (KATP) es uno de los potenciales blancos del factor de transcripción asociado a microftalmia en cardiomiocitos y los cambios en expresión de KATP pueden mediar el preconditionamiento isquémico cardíaco.

El sistema de reparación por excisión de bases es un proceso esencial para el mantenimiento de la integridad del DNA y de su reparación cuando es dañado por agentes alquilantes. La Endonucleasa apurínica/apirimidinica (APE) es una proteína esencial en el procesamiento de sitios abásicos citotóxicos que son intermediarios obligatorios en el proceso de reparación por excisión (Yamauchi A *et al*, 2013). De acuerdo con esto, se ha postulado que APE puede ser una potencial droga antitumoral. A nivel cardíaco su papel no ha sido esclarecido.

Por su parte, la cadena liviana de la miosina, es una proteína fibrosa, cuyos filamentos tienen una longitud de 1,5 μ m y un diámetro de 15 nm, y está implicada en la contracción muscular, por interacción con la actina. Es la proteína más abundante del músculo esquelético, representando entre el 60% y 70% de las proteínas totales y el mayor constituyente de los filamentos gruesos. Su desregulación ha sido asociada a hipertrofia cardíaca. La expresión diferencial de los genes MITF-H, MLC y APE en cardiomiocitos aislados de cobayo sugiere un papel cardioprotector, que podría estar asociado con la regulación de genes implicados en la supervivencia celular.

A nivel cardíaco la expresión de endotelinas (ET) y la activación de sus receptores específicos tienen efecto vasoconstrictor además de acciones antinatriuréticas y mitogénicas. Los receptores tipo B (EDNR-B) que tienen afinidad para las ET-1 y ET-3, se encuentran principalmente en células endoteliales y en menor proporción en células del músculo liso y su estimulación produce tanto vasoconstricción como vasodilatación, mediada por el incremento de la producción de ON y prostaciclina (Hua LL *et al*, 2014; Welsh IC *et al*, 2000). A pesar del amplio conocimiento sobre la expresión y función de los EDNR-B a nivel tisular, aún hay desconocimiento sobre su expresión en células cardíacas aisladas sometidas a diferentes condiciones fisiológicas. La expresión diferencial de EDNR-B en cardiomiocitos aislados de cobayo podría sugerir un papel en

cardioprotección, aunque dependiendo de la estimulación hipóxica podría tener un papel en enfermedad cardiaca isquémica

3.4 Conclusiones:

1. La búsqueda de potenciales genes blanco de MITF en tejido cardiaco permitió establecer que MITF regula genes relevantes en cardioprotección como PKC-B, el canal de potasio Kir 6.2, MLC4, CLCN7, EDNRB-1 y CDK2 así como genes implicados en procesos celulares como apoptosis, control del ciclo celular, repuesta al estrés e hipoxia (APE, BCL2, CDK2, HIF-1, p21, p16) cuya expresión podría modular la respuesta de la célula cardiaca e inducir procesos de isquemia cardiaca y muerte. El análisis de qPCR ha permitido observar expresión diferencial tanto de MITF-H como de dichos genes en células cardiacas en condiciones de isquemia y protección inducida.
2. MITF, modula la expresión de genes tejido específicos relacionados con la viabilidad de la célula cardiaca, que pueden estar implicados en la enfermedad cardiaca isquémica.
3. El análisis bioinformático y de la secuencias obtenidas de cobayos *Cavia porcellus* de cada uno de los genes caracterizados nos permite concluir que dichas secuencias son mas parecidas a humano que a rata y a ratón. (Anexos A y B).
3. En tejido cardiaco MITF-H regula potenciales genes blanco con funciones celulares diversas que podrían modular la viabilidad de la célula cardiaca y contribuir con la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica de manera dual.
4. La expresión diferencial de los genes HIF-1 α , BCL2, CLCN7, APE y EDNRB-1, Kir 6.2, CLCN7, CDK2, MLC4, y PKC- β en cardiomiocitos aislados de cobayo cuando MITF está expresado, sugiere un papel cardioprotector y permite inferir que MITF-H tiene un papel muy importante en la supervivencia celular en este tipo celular.

4. Monitoreo de niveles de expresión relativos a MITF y de algunos de sus potenciales genes diana

Para corroborar los resultados obtenidos mediante clonación, secuenciación, PCR y qPCR, nos propusimos como objetivo específico número 4 “Diseñar y construir un macroarreglo de cADN para monitorear los niveles de expresión relativos de MITF y de algunos de sus genes diana”

4.1 Macroarreglos de cADN:

Para estudiar la expresión diferencial de genes se utilizó la tecnología de macroarreglos de cADN desarrollada en el Grupo de Fisiología Molecular.

Para la selección de genes que se incluyeron en los macroarreglos, se realizó un análisis *in silico*, enfocado hacia la búsqueda de las secuencias de las cajas M (GTCATGTGCT) y E (CANNTG) en las regiones promotoras de posibles genes blanco de MITF, y se eligieron al menos 10 genes blanco de MITF tejido específicos y 10 no específicos, pero que por reportes en la literatura pudieran tener alguna implicación funcional cuando las células fueran sometidas a condiciones de estrés, hipoxia, etc. Estos genes o fragmentos de ellos fueron amplificados, clonados, secuenciados y caracterizados como se mostro en el capítulo 3, antes de incluirlos en los macroarreglos.

La metodología para el diseño de los macroarreglos se muestra en la Figura 4-1.

Figura 4-1. Metodología para la construcción de macroarreglos de cADN.

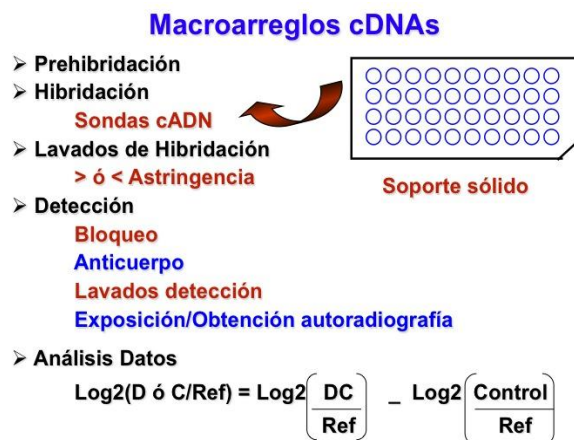
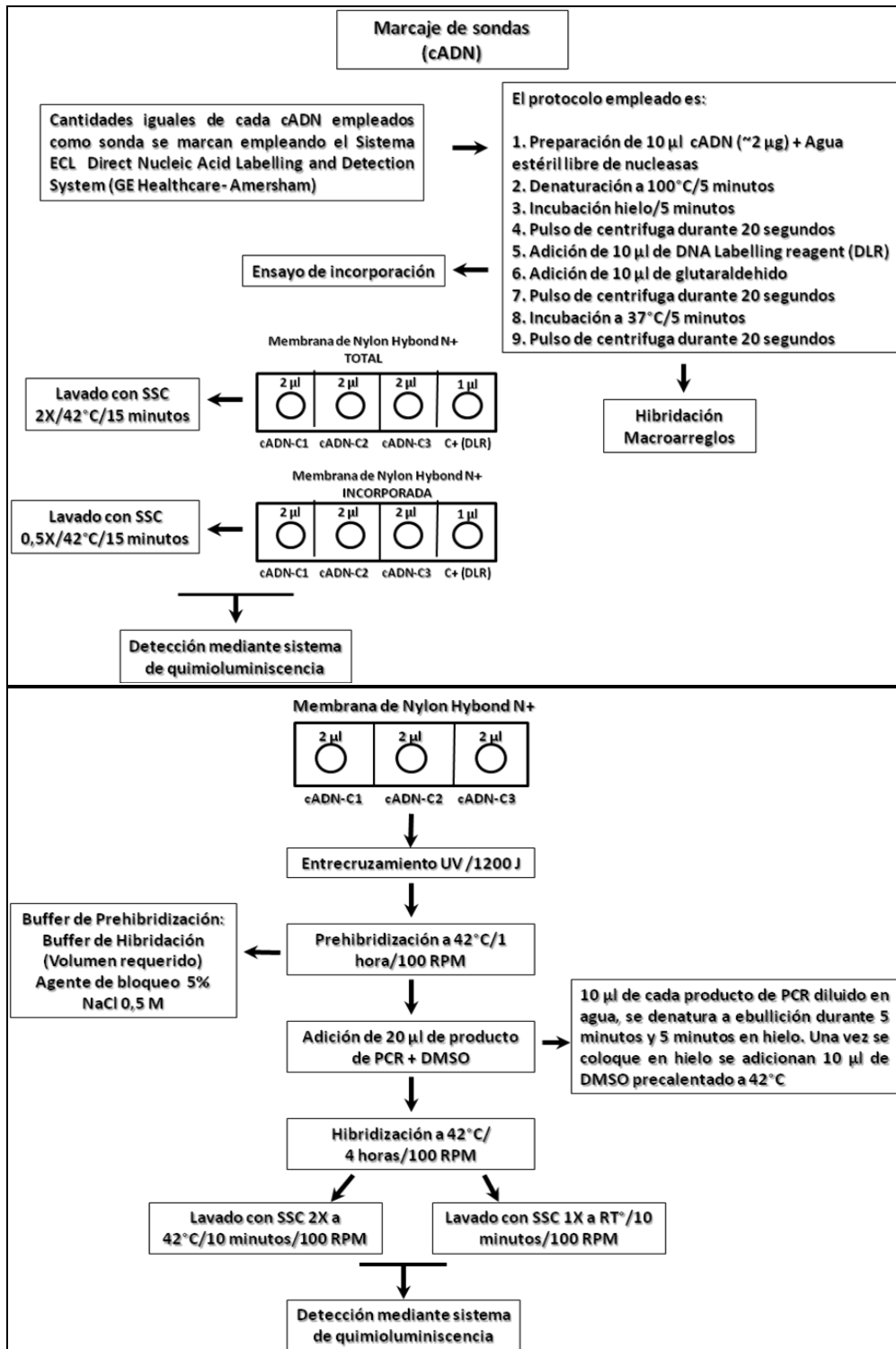


Figura 4-2. Metodología para el marcaje de sondas de cADN



Para la construcción de los macroarreglos empleamos como soporte membranas de Nylon N+, estandarizamos los buffers, soluciones, condiciones de hibridación y detección. El protocolo estandarizado es:

PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA:

1. Se realizó dilución a 80 ng y 160 ng de cada clon en agua libre de nucleasas (2 µl)
2. Se denaturó a 100 °C durante 5 minutos y 2 minutos en hielo
3. Se realizó la siembra por duplicado en una membrana de Nylon Hybond N+
4. La membrana se secó a 100°C durante 30 minutos
5. Se entrecruzó a 1200 J/cm²

PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN:

1. La membrana se prehibrido a 60°C durante 1 hora, empleando 10 ml de Buffer: SSC 5X, dextrán sulfato 5%, esperma de salmón 50 µg/ml.
2. Se descartó la solución y se adicionaron 10 ml del mismo buffer precalentado a 60°C.
3. La sonda se denaturó a 100°C durante 5 minutos y 2 minutos en hielo, se adicionaron 50 µl de DMSO y se adicionó al tubo con el Br de hibridación sin tocar la membrana.
4. Se hibrido a 60°C durante toda la noche.
5. Se realizaron 3 lavados con 20 ml de SSC (SSC 20X diluído 1:10) a 70°C, durante 5 minutos cada uno.
6. Se adicionaron 10 ml de solución de bloqueo: NaCl 125 mM, Fosfato de sodio dihidratado 25 mM pH 7,2. Se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 10 minutos.
7. Se descartó la solución y se adicionaron 6 ml de Estreptavidina-HRP diluida 1:1500 en solución de bloqueo (NaCl 125 mM, Fosfato de sodio dihidratado 25 mM pH 7,2). Se incubó durante 7 minutos, a temperatura ambiente y en agitación.
8. Se recuperó la solución y se almacenó a 4°C.
9. Se realizaron dos lavados con 20 ml de solución de bloqueo diluída 1/10, durante 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente y en agitación.
10. Se descartó la solución y se realizaron dos lavados con PBS pH 7.0 (NaCl 10 mM; KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8.09 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM), durante 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente y en agitación.
11. Se realizó la detección con 1 ml de reactivos (500 µl Reactivo A+500 µl Reactivo B, Amersham ECL).

Se dejó exponiendo durante 1 hora y O/N. En las figuras 4-2 y 4-3 se muestran algunos resultados obtenidos durante la estandarización de la metodología.

Figura 4-3. Macroarreglos de cADN empleando como sondas ADN complementario obtenido de cardiomiocitos aislados sometidos a isquemia simulada, a preconditionamiento isquémico y en condiciones de normoxia. En las graficas se muestra la expresión diferencial de los genes incluidos en los macroarreglos, normalizados con respecto a GAPDH y a las células control o en normoxia.

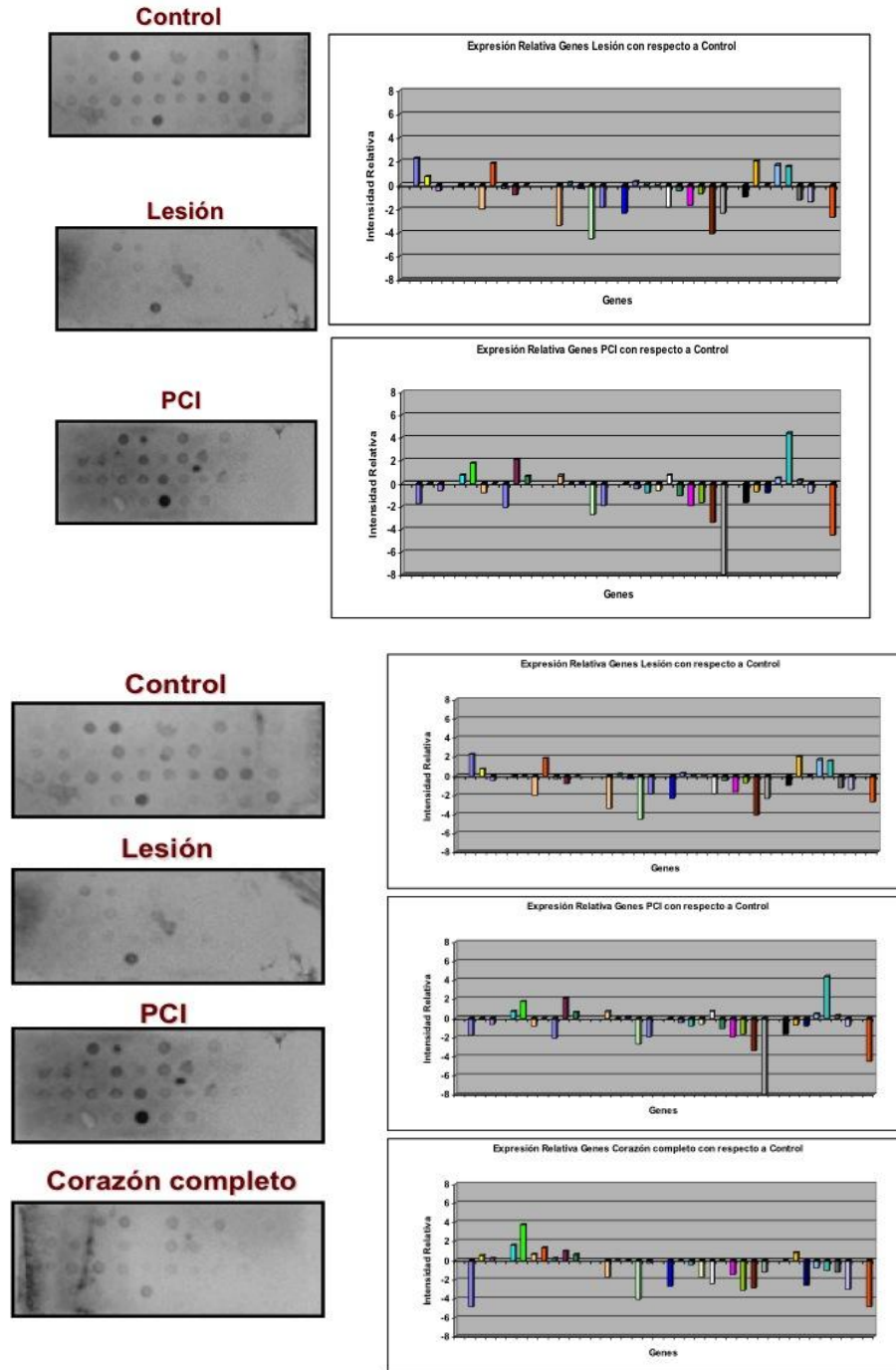
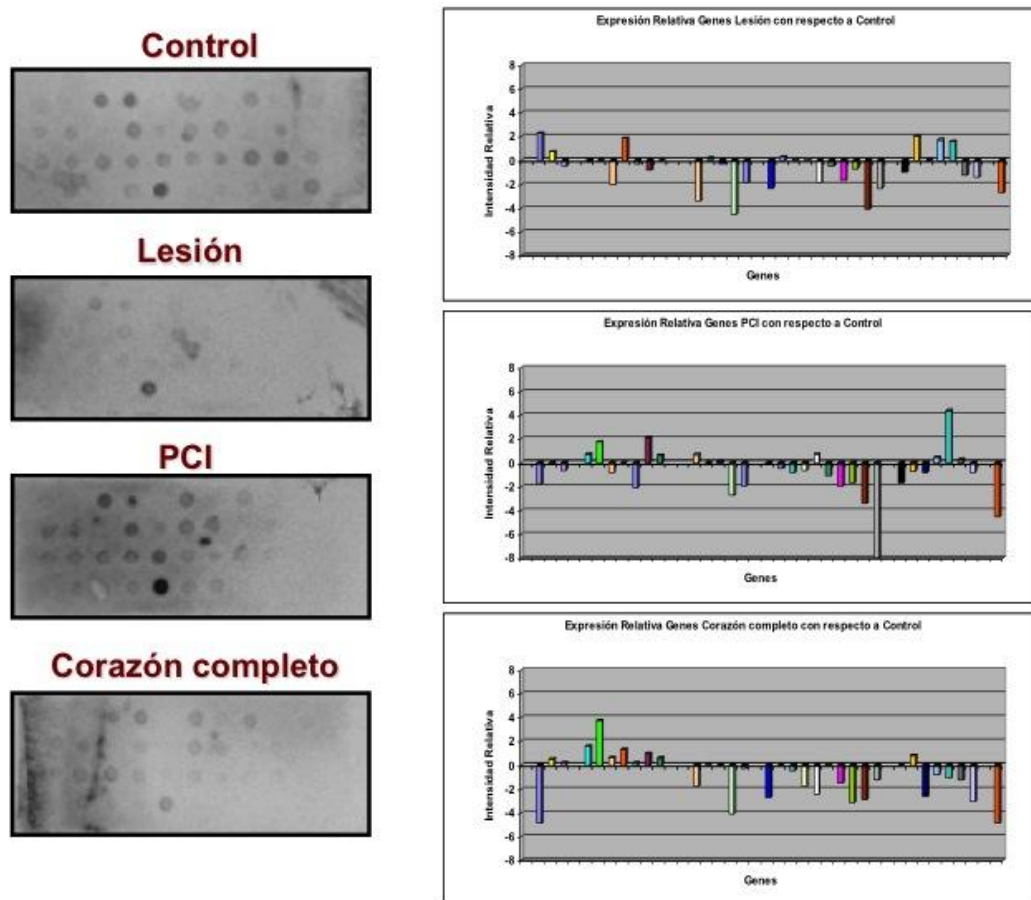
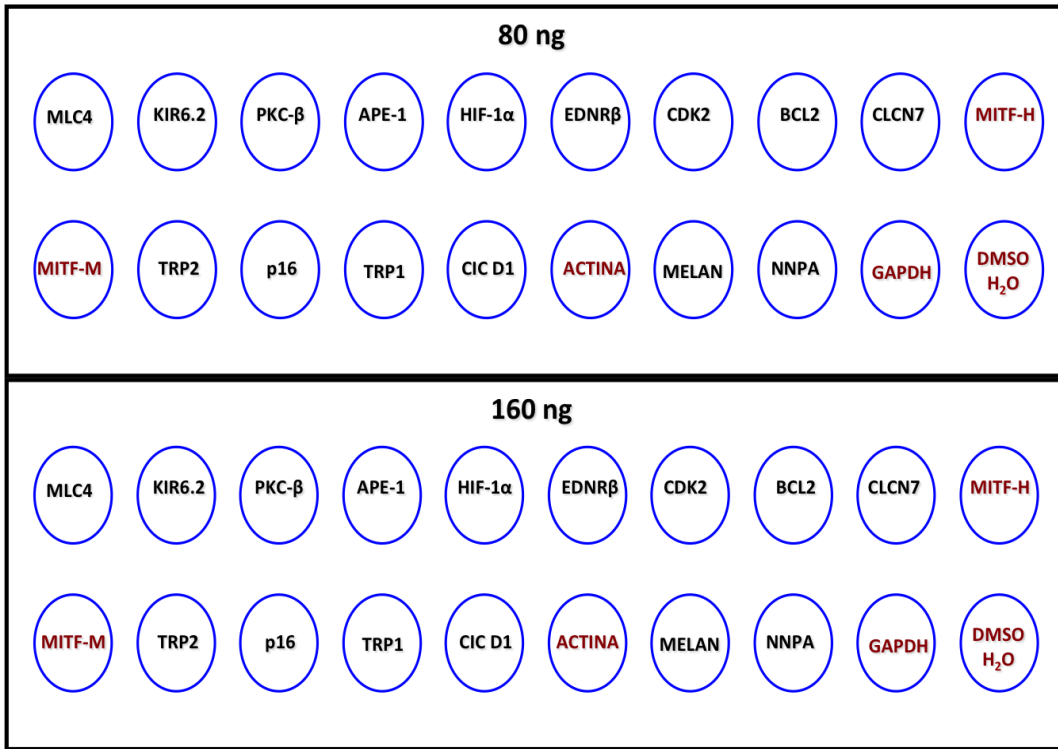


Figura 4-4. Macroarreglos de cADN empleando como sondas ADN complementario obtenido de cardiomiocitos aislados sometidos a ischemia simulada, a preconditionamiento isquémico y en condiciones de normoxia y a partir de corazones completos. En las gráficas se muestra la expresión diferencial de los genes incluidos en los macroarreglos, normalizados con GAPDH y con respecto a corazón completo y células en normoxia.



Una vez estandarizada la metodología construimos diferentes macroarreglos incluyendo los potenciales genes blanco de MITF , de acuerdo con el siguiente esquema:

Figura 4-5. Distribución de los diferentes genes en los macroarreglos de cADN. Nótese que se incluyeron genes específicos de tejido cardíaco caracterizados durante este proyecto y genes diana de MITF caracterizados en cáncer.



Sondas que se emplearon: cADN-Células control , cADN-Células transfectadas, cADN-C1, cADN-C2 , cADN-C3

Entre los factores de transcripción implicados en enfermedades cardiovasculares el MITF se asocia con una respuesta hipertrófica disminuida bajo estimulación beta-adrenérgica y tendencia a muerte súbita. Su expresión es específica de tejidos y regula la expresión de genes que participan en viabilidad, proliferación, diferenciación celular. En isquemia cardíaca existe una sobre estimulación beta-adrenérgica que se asocia con cambios en la citoarquitectura, disfunción y pérdida de la viabilidad miocárdica. Sin embargo, actualmente no se sabe, cuales genes regulados por MITF-H, la isoforma específica expresada en corazón, son expresados en células cardíacas y si los genes cardíacos que regula participan en la viabilidad y protección contra la isquemia. Con base en nuestros resultados preliminares diseñamos y construimos un macroarreglo de cDNA, tecnología que combina algunas propiedades de micro-arreglos y el *differential display*, una herramienta sensible que facilita la detección e identificación simultánea de cambios en expresión de genes específicos. Con esta herramienta evaluamos la expresión diferencial de genes regulados por MITF-H en cardiomiocitos en condiciones de lesión por isquemia y protección por PCI.

4.2 Resultados obtenidos por pcr en tiempo real

Datos expresión normalizados con GAPDH

Tabla 4.1 Datos expresión Gen APE normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	Std.Dev. Intensity	Promedio Int -BcK	Promedio Int +DS	Promedio Int - DS	Prom Int-Bck +DS	Prom Int-Bck - DS	Promedio Int +DS APE/ GAPDH	Promedio Int -DS APE/ GAPDH	Promedio Int gen/GAPDH
CONTROL	93,20761108	12,44656849	16,35926819	105,6541796	80,76104259	28,80583668	3,912699699	0,837885031	0,720214261	0,782497694
LESION	80,85525513	5,405207157	12,3769989	86,26046228	75,45004797	17,78220606	6,971791744	0,673273504	0,65859207	0,666342901
PCI	82,56117249	12,52003193	20,02902222	95,08120441	70,04114056	32,54905415	7,508990288	0,775959376	0,657589255	0,720914311
CC	151,999176	30,4606781	95,50630188	182,4598541	121,5384979	125,96698	65,04562378	1,354161171	1,00863411	1,191037665
AUR	97,95582581	17,90828705	35,95446777	115,8641129	80,04753876	53,86275482	18,04618073	0,712369546	0,59567795	0,659576025
CONTROL POSITIVO	187,7605286	32,7720871	117,3000336	220,5326157	154,9884415	150,0721207	84,52794647	1,606829659	1,269420324	1,447982327

Tabla 4.2 Datos expresión Gen CDK2 normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	Std.Dev. Intensity	Promedio Int -BcK	Promedio Int +DS	Promedio Int - DS	Prom Int-Bck +DS	Prom Int-Bck - DS	Promedio Int +DS CDK2/ GAPDH	Promedio Int -DS CDK2/ GAPDH	Promedio Int gen/GAPDH
CONTROL	55,40674973	47,93089294	46,30040073	103,3376427	7,475856781	94,23129368	-1,63049221	0,819513854	0,066668514	0,465151433
PCI	72,21494293	58,75831985	63,10204792	130,9732628	13,45662308	121,8603678	4,343728066	1,068875093	0,126339044	0,630572268
LESIÓN	66,41364288	56,49406433	57,25790119	122,9077072	9,919578552	113,7519655	0,763836861	0,912183371	0,082321449	0,520405125
CC	35,43403244	33,63844681	25,51931858	69,07247925	1,795585632	59,15776539	-8,119128227	0,424679648	0,013361944	0,238591611
CONTROL POSITIVO	193,5478516	30,7325592	171,0249367	224,2804108	162,8152924	201,7574959	140,2923775	1,634136587	1,333525515	1,492613334

Tabla 4.3 Datos expresión Gen EDNR β normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	Std.Dev. Intensity	Promedio Int -BcK	Promedio Int +DS	Promedio Int - DS	Prom Int-Bck +DS	Prom Int-Bck - DS	Promedio Int +DS EDNR β / GAPDH	Promedio Int -DS EDNR β / GAPDH	Promedio Int gen/GAPDH
CONTROL	235,7189636	13,78434563	10,23254395	249,5033092	221,934618	24,01688957	-3,551801682	1,978673147	1,979177977	1,978910769
LESION	226,4258118	19,498106	140,6188278	245,9239178	206,9277058	160,1169338	121,1207218	1,919466387	1,806240683	1,866016403
PCI	234,3594971	13,20693684	154,3735123	247,5664339	221,1525602	167,5804491	141,1665754	2,020394006	2,076316095	2,046399175
CC	165,743103	17,72715378	85,65633392	183,4702568	148,0159492	103,3834877	67,92918014	1,361660071	1,228367453	1,298732556
AUR	180,7058716	38,15498352	104,7435226	218,8608551	142,5508881	142,8985062	66,58853912	1,345626391	1,060799896	1,216765408
CONTROL POSITIVO	225,4864197	20,80283356	148,0143967	246,2892532	204,6835861	168,8172302	127,2115631	1,107475992	1,152844399	1,127616806

Tabla 4.4 Datos expresión Gen MLC4 normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	Std.Dev. Intensity	Promedio Int - BcK	Promedio Int +DS	Promedio Int -DS	Prom Int-Bck +DS	Prom Int-Bck -DS	Promedio Int +DS MLC4/ GAPDH	Promedio Int -DS MLC4/ GAPDH	Promedio Int gen/GAPDH
CONTROL	129,3036804	14,3720665	-117,6798706	143,6757469	114,9316139	-103,3078041	-132,0519371	1,139413113	1,024942036	1,085531863
LESION	172,3423157	16,40078354	103,6848145	188,7430992	155,9415321	120,085598	87,28403091	1,473163074	1,361190076	1,420304449
PCI	204,595047	13,97297192	135,1004333	218,5680189	190,6220751	149,0734053	121,1274614	1,783737433	1,789677144	1,786499547
CC	150,6295319	17,26845551	77,95256042	167,8979874	133,3610764	95,22101593	60,68410492	1,246087455	1,106748337	1,180305385
AUR	105,8249969	6,475606442	32,79570007	112,3006034	99,34939051	39,27130651	26,32009363	0,690459953	0,73931369	0,712562323
CABZ	214,6740417	25,02302551	138,8384247	239,6970673	189,6510162	163,8614502	113,8153992	1,746464375	1,553321346	1,65553549
CONTROL POSITIVO	246,983551	4,137608051	176,1054535	251,1211591	242,845943	180,2430615	171,9678454	1,12920337	1,36778718	1,235120072

Tabla 4.5 Datos expresión Gen PKC-β normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	Std.Dev. Intensity	Promedio Int - BcK	Promedio Int +DS	Promedio Int -DS	Prom Int-Bck +DS	Prom Int-Bck -DS	Promedio Int +DS PKC/ GAPDH	Promedio Int -DS PKC/ GAPDH	Promedio Int gen/GAPDH
CONTROL	87,5133667	48,97115707	66,03657532	136,4845238	38,54220963	115,0077324	17,06541824	1,082383488	0,343713356	0,734693302
PCI	108,4268112	27,56343079	91,33136749	135,990242	80,86338043	118,8947983	63,76793671	1,061420543	0,705844232	0,893565122
LESION	51,58563232	25,11089325	35,52101135	76,69652557	26,47473907	60,6319046	10,4101181	0,625921689	0,248561114	0,450439589
CC	44,42538452	23,13391113	23,74549866	67,55929565	21,29147339	46,87940979	0,611587524	0,501404407	0,176695505	0,348109165
AUR	139,5853271	52,48133087	116,1659698	192,066658	87,10399628	168,6473007	63,68463898	1,180887115	0,648188948	0,939884222
CONTROL POSITIVO	204,0436859	21,28749657	181,0856476	225,3311825	182,7561893	202,3731441	159,798151	1,641792648	1,496849823	1,573555707

Tabla 4.6 Datos expresión Gen KIR 6.2 normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	Std.Dev. Intensity	Promedio Int - BcK	Promedio Int +DS	Promedio Int -DS	Prom Int-Bck +DS	Prom Int-Bck -DS	Promedio Int +DS KIR/ GAPDH	Promedio Int -DS KIR/ GAPDH	Promedio Int gen/GAPDH
CONTROL	72,2414093	25,33016586	-122,458374	97,57157516	46,91124344	-97,12820816	-147,7885399	0,773786353	0,418347082	0,606481976
LESION	50,6338501	8,45416069	9,297195435	59,08801079	42,17968941	17,75135612	0,843034744	0,461189182	0,368180137	0,417282792
PCI	55,73948669	12,06322575	11,29370117	67,80271244	43,67626095	23,35692692	-0,769524574	0,553339125	0,410059569	0,486710549
CC	123,6192093	49,77516174	81,03820038	173,394371	73,84404755	130,8133621	31,26303864	1,286879931	0,612823315	0,968657451
AUR	37,95349121	2,051403761	-12,64781189	40,00489497	35,90208745	-10,59640813	-14,69921565	0,245962863	0,267167263	0,255556141
CABZ	44,44047546	3,412392616	8,424301148	47,85286808	41,02808285	11,83669376	5,011908531	0,348662294	0,336037202	0,342718587
CONTROL POSITIVO	194,6997833	18,91871452	152,6552124	213,6184978	175,7810688	171,5739269	133,7364979	0,960567117	0,990056039	0,973658405

Tabla 4.7 Resumen ensayos de expresión para los diferentes genes cuando MITF está expresado

	APE	CDK2	EDNRB	MLC4	PKC-B	KIR 6,2
CONTROL	0.7825	0.4652	1.9789	1.0855	0.7346	0.6065
LESION	0,6663	0,5204	1,866	1,4203	0,4504	0,4173
PCI	0.7209	0.6306	2.0464	1.7865	0.8936	0.4867
CC	1,191	0,2386	1,2987	1,1803	0,3481	0,9687

Figura 4-6. Expresión relativa de algunos genes diana de MITF cuando este factor esta expresado

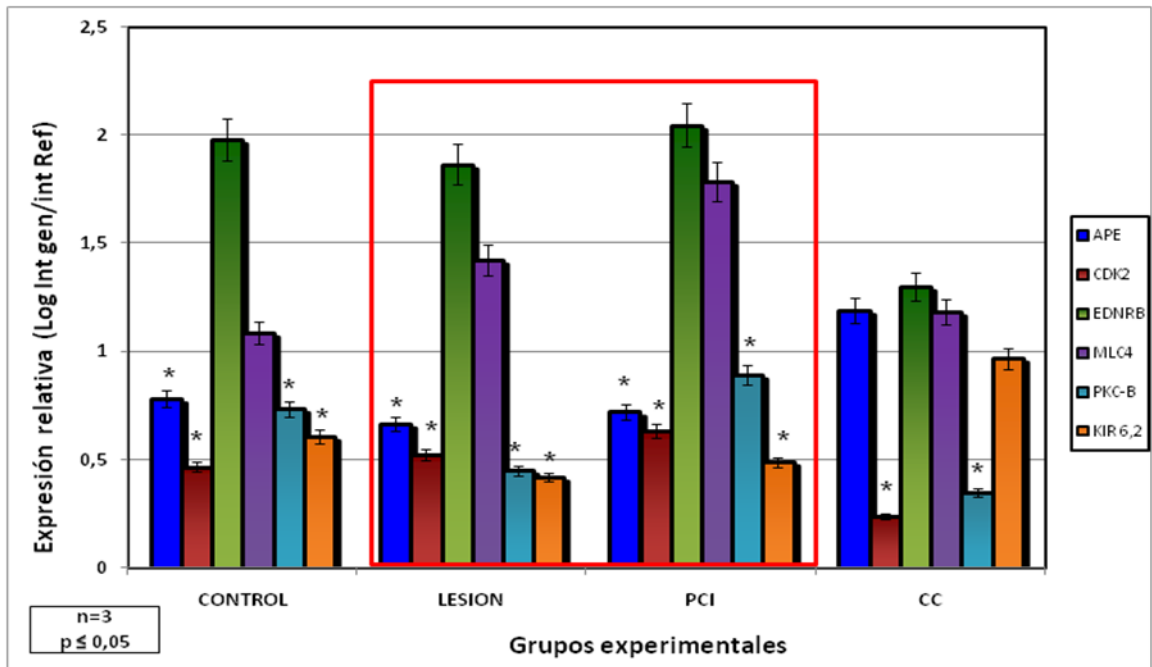


Tabla 4-8 Datos expresión macroarreglos *shScramble*/control sin interferente normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	PROM INT/GAPDH COBAYO	Rel Intensidades normalizada C1/C3	Log2 (Int nor C1/C3)
MLC4	253,7487946	2,852038857	2,158458026	1,110001038
KIR6.2	111,4154587	1,252266904	0,878835916	-0,186334264
PKC-B	101,9565201	1,145952072	0,855967289	-0,22437243
APE-1	96,67150116	1,086550492	0,87253664	-0,196712381
HIF-1a	96,14975739	0,999497814	0,994882962	-0,007401278
EDNR-B	89,69081879	0,932355731	0,821581178	-0,283524964
CDK2	86,34299469	0,970462052	0,811813748	-0,300779322
BCL2	107	1,202638847	1,104897694	0,143912793
CLCN7	195,5314026	2,197697762	1,797853841	0,84627574
MITF-H	95,79226685	1,076668237	0,889773031	-0,168490724
MITF-M	95,87922668	1,077645632	0,857565793	-0,221680736
TUB-a	82,85024261	0,931204862	0,825041302	-0,277461752
p16	81,96618652	0,921268412	0,863354364	-0,211975259
MITF-C	80,00965881	0,899277793	0,811733142	-0,300922576
CIC D1	82,22705078	0,924200426	0,799989958	-0,321946204
ACTINA	96,19806671	1,081229271	1,017325952	0,024781994
DICER	139,7681122	1,570939825	1,176868513	0,234953143

NPPA	119,0676346	1,338274418	1,106981369	0,146630941
GAPDH HUMANO	98,1884079	1,103599941	0,963175744	-0,054129034
GAPDH COBAYO	88,97101593	1	1	0
gADN AURICULA	36,25603867	0,40750393	0,881143714	-0,182550754
gADN CÉLULAS	40,21255875	0,451973694	0,818978331	-0,288102815
BCKG	110,0289841			

Tabla 4.9 Datos expresión macroarreglos *shMITF*/control sin interferente normalizados con GAPDH

Serial Number	Mean Intensity	PROM INT/GAPDH COBAYO	Rel Intensidades normalizada C2/C3	Log2 (Int nor C2/C3)
MLC4	123,3671494	1,373030787	1,039126559	0,055371376
KIR6.2	119,2318878	1,327006854	1,004295081	0,006183223
PKC-B	111,8792267	1,245174453	0,942363315	-0,085644717
APE-1	106,7922668	1,188558469	0,899515644	-0,152779723
HIF-1a	107,1062775	1,216248759	0,920471994	-0,119554267
EDNR-B	107,8840561	1,225080849	0,927156229	-0,109115637
CDK2	102,3816452	1,13946988	0,862364797	-0,213629809
BCL2	88,52173615	0,985214214	0,745622214	-0,423483252
CLCN7	107,2850266	1,194042703	0,903666179	-0,146138166
MITF-H	101,1594238	1,125867008	0,852069976	-0,230956179
MITF-M	95,76811218	1,065863702	0,806658737	-0,309969635
TUB-a	94,87439728	1,055916985	0,741038327	-0,432379934
p16	93,57004547	1,041400031	0,777872289	-0,362394782
MITF-C	101,0338135	1,124469011	0,851011955	-0,232748696
CIC D1	101,2946854	1,127372419	0,853209289	-0,229028422
ACTINA	88,06280518	0,980106482	0,74175662	-0,430982198
DICER	106,5990372	1,186407895	0,897888062	-0,155392496
NPPA	108	1,202000093	0,90968843	-0,136555591
GAPDH HUMANO	98,42028809	1,095381439	0,828998123	-0,270559259
GAPDH COBAYO	89,85024261	1	0,756812279	-0,401992599
gADN AURICULA	37,14009476	0,413355531	0,312832541	-1,676537502
gADN CÉLULAS	40,81642532	0,454271732	0,343798425	-1,540365161
BCKG	107,5603867			

Tabla 4.10 Datos expresión macroarreglos *shMITF/shScramble* normalizados con GAPDH

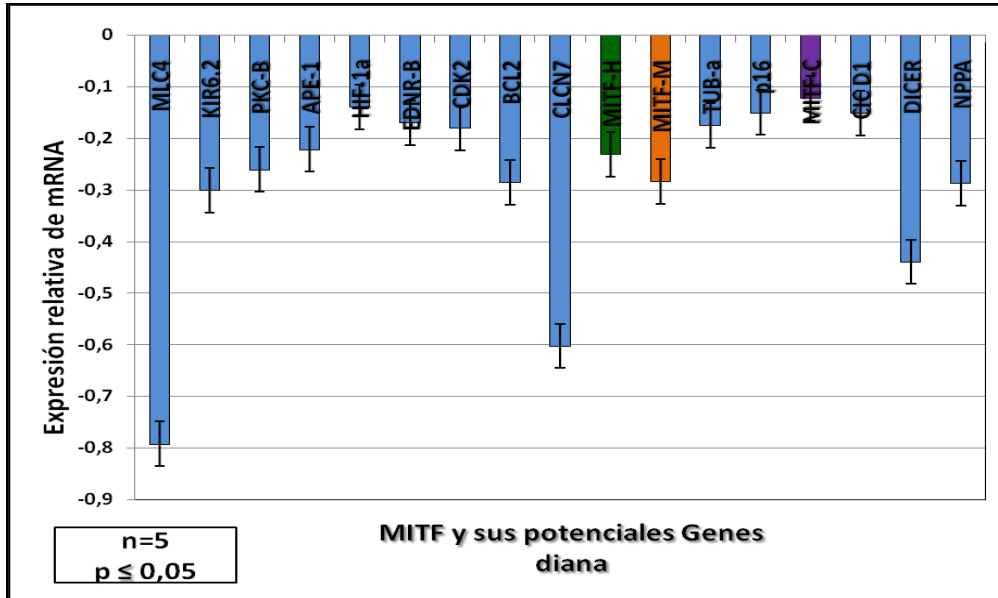
Serial Number	Mean Intensity	PROM INT/GAPDH COBAYO	Rel Intensidades normalizada C2/C1	Log2 (Int nor C2/C1)
MLC4	115,2367172	1,321331627	0,481420786	-1,054629662
KIR6.2	124,2705307	1,424915483	1,059683722	0,083633736
PKC-B	116,7584534	1,338780216	1,086585105	0,119801176
APE-1	108,6038666	1,245277783	1,093882409	0,129457658

HIF-1a	93,12077332	1,004638588	1,216859849	0,283163016
EDNR-B	105,1884079	1,134830928	1,313962909	0,393924552
CDK2	104,2560349	1,19542451	1,174151919	0,231619085
BCL2	94,92753601	1,088461722	0,819210369	-0,287694118
CLCN7	106,608696	1,222400682	0,543315247	-0,88013856
MITF-H	105,5314026	1,21004818	1,045695387	0,064462652
MITF-M	109,5942001	1,256633184	0,989066972	-0,015859883
TUB-a	98,43478394	1,128676661	1,13392555	0,18132592
p16	93,06280518	1,067080274	1,130398067	0,176830903
MITF-C	96,6183548	1,107849052	1,25041341	0,322405156
CIC D1	100,753624	1,155265033	1,219835425	0,286686519
ACTINA	92,69081879	1,06281499	0,90647424	-0,141662073
DICER	116,4154587	1,334847358	0,755221731	-0,405027816
NPPA	105,4347839	1,208940327	0,898171613	-0,154936968
GAPDH HUMANO	99,92753601	1,145792912	0,992553007	-0,010783944
GAPDH COBAYO	87,21256256	1	1	0
gADN AURICULA	40,33333206	0,462471585	1,014359618	0,020569218
gADN CÉLULAS	48,13043594	0,551875034	1,00508445	0,007316726
BCKG	103,0676346			

Tabla 4.11 Resumen datos expresión macroarreglos normalizados con GAPDH cuando MITF está disminuido en su expresión

Nombre gen	Normalizacion GAPDH /ensayos en condiciones silenciamiento genico
MLC4	-0,792605971
KIR6.2	-0,300762885
PKC-B	-0,260830468
APE-1	-0,221853757
HIF-1a	-0,140043435
EDNR-B	-0,16982784
CDK2	-0,180767181
BCL2	-0,285523971
CLCN7	-0,602624338
MITF-H	-0,231845054
MITF-M	-0,284309665
TUB-a	-0,175196958
p16	-0,150846395
MITF-C	-0,123109212
CIC D1	-0,151607276
DICER	-0,439566297
NPPA	-0,287652589

Figura 4-7. Expresión relativa de algunos genes diana de MITF cuando este factor esta disminuido en su expresión



4.3 Discusión y conclusiones

Se logró construir un macro arreglo de genes regulados por el factor de transcripción MITF-H para evaluar genes diferencialmente expresados en condiciones de lesión y protección contra la isquemia cardiaca y evaluar la expresión diferencial de cDNAs regulados por MITF-H en cardiomiocitos ventriculares expuestos a condiciones de isquemia simulada y protección por PCI. A pesar que se encontraron diferencias en los valores de expresion relativa con los obtenidos mediante PCR en tiempo real, pudimos observar la misma tendencia en ambos tipos de metodología (figuras 4-6 y 4-7; tablas 4-1 a 4-11) . Es de resaltar que se cuando se construyeron macroarreglos que se hibridaron con sondas obtenidas en celulas en normoxia, de IS o PCI, se observo un nivel de expresion de los diferentes genes, similar al obtenido para MITF, permitiendo sugerir que MITF regula dicha expresion en las condiciones experimentales estudiadas. Por otra parte, cuando construimos los macroarreglos pero hibridamos con sondas obtenidas de celulas o de corazon completo sometidos a silenciamiento genico para MITF, observamos que la expresion de lospotenciales genes blancos tambien disminuyo, validando los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real mostrados anteriormente (figura 4-7; tabla 4-11).

5. Conclusiones y recomendaciones

1. En tejido cardiaco MITF-H se expresa de manera diferencial y podría regular genes blanco implicados en funciones asociadas con la viabilidad y la fisiología de la célula cardiaca. La regulación de la expresión de estos genes mediada por MITF en tejido cardiaco podría contribuir al entendimiento de la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica.
2. MITF modula la expresión de genes tejido específicos relacionados con la viabilidad de la célula cardiaca, que pueden estar implicados en la enfermedad cardiaca isquémica.
3. Los resultados de este proyecto están permitiendo esclarecer el papel de *MITF* en células cardiacas y permitirá el uso de una herramienta molecular (un macroarreglo) para realizar estudios futuros de potenciales biomarcadores de seguimiento y progresión de enfermedad cardiaca isquémica.
4. El establecimiento de perfiles de expresión diferenciales de genes regulados por *MITF* está permitiendo asociar de manera específica la función de dichos genes con lesión o protección.
5. La regulación funcional de la transcripción es fundamental para el desarrollo y la función del corazón, por lo tanto, un mejor entendimiento del mecanismo de regulación y de los genes diana del factor de transcripción MITF en tejido cardiaco es necesario para avanzar en el conocimiento de la patogenia de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la hipertrofia cardiaca más frecuentes, como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardiaca y el infarto agudo de miocardio, entre otras.

Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones:

En un primer plano estarían los trabajos destinados a validar los resultados de expresión diferencial mostrados, cuando MITF está expresado y en condiciones de silenciamiento génico inducido experimentalmente, mediante qPCR múltiple o microarreglos. Por otra parte, esperamos realizar ensayos funcionales a nivel de promotores de los genes diana para demostrar de manera concluyente que MITF regula dichos genes, reconoce secuencias específicas en dichos promotores e interactúa de manera directa con ellos.

Adicionalmente, para reforzar el papel del Factor de transcripción Asociado a Microftalmia en condiciones de protección y de isquemia, propuestas en esta Tesis, se formuló el proyecto de investigación titulado “Efecto de la adenosina y el dinitrofenol sobre la modulación del factor de transcripción asociado a microftalmia MITF”, que se someterá a evaluación a los Comités institucionales y a Convocatorias futuras.

**A. Anexo: Secuencias consenso
obtenidas de los genes blanco de MITF,
alineamientos empleando el programa
clustal W y reportes de Genbank**

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA BCL2 DE HUMANO, RATA Y RATÓN (287 pb)

GTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCCGGCGACGACTTCTCCCGCCGCTAC
CGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCGCGCGGGGA
CGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGACGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTG
GCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACCGGGAGATGTCGCC
CTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCA

PROTEINA BCL2 DE HUMANO, RATA Y RATÓN

VPPVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIV
AFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLN

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA BCL2 COBAYO (CLON PCI-7/BCL2)

GTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCCGGCGATGACTTCTCCCGCCGCTAT
CGCCAAGACTTCGCTTGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCTTTACCGCGAGGGGA
CGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGATTGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTG
GCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGTGTCAACCGGGAGATGTCACCT
CTGGTGGACAACATCGCCCTCTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCA

SECUENCIA DE LA PROTEINA BCL2 DE COBAYO

VPPVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIV
AFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLN

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

```
RATA          GTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCCGGCGACGACTTCTCCCGCCGCTAC 60
RATON         GTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCCGGCGACGACTTCTCCCGCCGCTAC 60
HUMANO        GTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCCGGCGACGACTTCTCCCGCCGCTAC 60
COBAYO        GTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGCCGGCGATGACTTCTCCCGCCGCTAT 60
*****

RATA          CGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCGCGCGGGGA 120
RATON         CGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCGCGCGGGGA 120
HUMANO        CGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCGCGCGGGGA 120
COBAYO        CGCCAAGACTTCGCTTGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGACGCCTTTACCGCGAGGGGA 120
****.*****

RATA          CGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGACGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTG 180
RATON         CGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGACGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTG 180
HUMANO        CGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGACGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTG 180
COBAYO        CGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGATGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTG 180
*****

RATA          GCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACCGGGAGATGTCGCC 240
```



```

RATON      GCCTTCCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACCGGGAGATGTCGCC 240
HUMANO     GCCTTCCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACCGGGAGATGTCGCC 240
COBAYO     GCCTTCCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGTGTCAACCGGGAGATGTCACCT 240
           *****
RATA       CTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCA 287
RATON      CTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCA 287
HUMANO     CTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCA 287
COBAYO     CTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCA 287
           *****

```

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE BCL2 DE COBAYO EN GENBANK

[Cavia porcellus isolate PCI 7 Bcl2 protein \(BCL2\) mRNA, partial cds](#)

GenBank: JN165776.1

```

LOCUS      JN165776 287 bp      mRNA      linear      ROD 13-NOV-2011
DEFINITION Cavia porcellus isolate PCI 7 Bcl2 protein (BCL2) mRNA,
partial
           cds.
ACCESSION  JN165776
VERSION    JN165776.1  GI:356484675
KEYWORDS
SOURCE     Cavia porcellus (Domestic guinea pig)
ORGANISM   Cavia porcellus
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
           Hystricognathi; Caviidae; Cavia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 287)
AUTHORS    Gunturiz, M.L. and Gomez, L.A.
TITLE      Differential expression of BCL2 gene in isolated
cardiomyocytes
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 287)
AUTHORS    Gunturiz, M.L. and Gomez, L.A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (21-JUN-2011) Molecular Physiology Laboratory,
Colombian
           National Institute of Health, Research Subdirection, Avenida
Calle
           26 No. 51-20, Bogota, DC 80080, Colombia
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..287
                       /organism="Cavia porcellus"
                       /mol_type="mRNA"
                       /isolate="PCI 7"
                       /db_xref="taxon:10141"
           gene            <1..>287
                       /gene="BCL2"
           CDS             <1..>287
                       /gene="BCL2"
                       /codon_start=1

```

```
/product="Bcl2 protein"  
/protein_id="AET11880.1"  
/db_xref="GI:356484676"
```

```
/translation="VPPVVHLTLRQAGDDFSRRYRQDFAEMSSQLHLTPFTARGRFAT
```

```
VVEELFRDGVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNLR"
```

```
ORIGIN
```

```
  1  gtgccacctg  tggccacct  gaccctcgc  caggccggcg  atgacttctc  cgcgcgctat  
 61  cgccaagact  tcgctgagat  gtccagccag  ctgcacctga  cgcctttcac  cgcgagggga  
121  cgctttgcca  cgtggtgga  ggagctcttc  agggatgggg  tgaactgggg  gaggattgtg  
181  gccttctttg  agttcgggtg  ggtcatgtgt  gtggagagtg  tcaaccggga  gatgtcacct  
241  ctggtggaca  acatcgcct  ctggatgact  gagtacctga  accggca
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA CDK2 DE HUMANO, RATA Y RATÓN (306 pb)

AGAGGGCACGTACGGAGTGGTGTACAAAGCCAAAAACAAGTTGACGGGAGAAGTTGTGGCGCTTA
AGAAGATCCGGCTCGACACTGAGACTGAAGGTGTACCCAGTACTGCCATCCGAGAGATCTCTCTC
CTTAAGGAACCTAATCACCCCTAATATCGTCAAGCTGCTGGATGTCATCCACACAGAAAATAAGCT
TTATCTGGTTTTTGAATTTCTGCACCAGGACCTCAAGAAATTCATGGATGCCTCTGCTCTCACGG
GCATTCTCTTCCCCTCATCAAGAGCTATCTGTTCCAGCTGCTCCA

SECUENCIA DE LA PROTEINA CDK2 PARA HUMANO, RATA Y RATÓN

EGTYGVVYKAKNKLTEVVALKKIRLDTETEGVPSTAIRESISLLKELNHPNIVKLLDVIHTENKL
YLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPLPLIKSYLFQLL

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA CDK2 DE COBAYO (CLON PCI-5/CDK2)

AGAGGGCACGTACGGAGTTGTGTACAAAGCCAAAAACAAGTTGACGGGCGAGGTGGTGGCGCTTA
AGAAAATCCGCCTGGACACTGAGACTGAAGGTGTTCCCAGTACTGCCATTCGAGAGATCTCTCTG
CTTAAGGAGCTTAACCCACCCAAACATTGTCAAGCTGCTGGATGTCATCCACACAGAAAATAAAACT
CTACCCTGGTTTTTGAATTTCTGCACCAAGATTCTCAAGAAGTTTATGGATGCCTCTGCTCTCACTT
GTTTCTCTTCCCCTCATCAAGAACTATCTGTTCCAGCTGCTCCA

SECUENCIA DE LA PROTEINA CDK2 DE COBAYO

EGTYGVVYKAKNKLTEVVALKKIRLDTETEGVPSTAIRESISLLKELNHPNIVKLLDVIHTENKL
YLVFEFLHQDLKKFMDASALTGVPLPLIKNYLFQLL

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

Humano	<u>AGAGGGCACGTACGGAGT</u> GGTGTACAAAGCCAAAAACAAGTTGACGGGAGAGTTGTGGC	60
Rata	<u>AGAGGGCACGTACGGAGT</u> GGTGTACAAAGCCAAAAACAAGTTGACGGGAGAGTTGTGGC	60
Raton	<u>AGAGGGCACGTACGGAGT</u> GGTGTACAAAGCCAAAAACAAGTTGACGGGAGAGTTGTGGC	60
Cobayo	<u>AGAGGGCACGTACGGAGT</u> TGTGTACAAAGCCAAAAACAAGTTGACGGG <u>CGAG</u> GT <u>G</u> GTGGC	60

Humano	GCTTAAGAAGATCCGGCTCGACACTGAGACTGAAGGTGTACCCAGTACTGCCATCCGAGA	120
Rata	GCTTAAGAAGATCCGGCTCGACACTGAGACTGAAGGTGTACCCAGTACTGCCATCCGAGA	120
Raton	GCTTAAGAAGATCCGGCTCGACACTGAGACTGAAGGTGTACCCAGTACTGCCATCCGAGA	120
Cobayo	GCTTAAGAA <u>A</u> ATCCG <u>C</u> CT <u>G</u> GACACTGAGACTGAAGGTGT <u>T</u> CCCAGTACTGCCAT <u>T</u> CGAGA	120

Humano	GATCTCTCTCCTTAAGGAACCTAATCACCCCTAATATCGTCAAGCTGCTGGATGTCATCCA	180
Rata	GATCTCTCTCCTTAAGGAACCTAATCACCCCTAATATCGTCAAGCTGCTGGATGTCATCCA	180
Raton	GATCTCTCTCCTTAAGGAACCTAATCACCCCTAATATCGTCAAGCTGCTGGATGTCATCCA	180
Cobayo	GATCTCTCT <u>G</u> CTTAAGGAG <u>C</u> TTA <u>A</u> CC <u>C</u> CA <u>A</u> AC <u>A</u> AT <u>T</u> GTCAGCTGCTGGATGTCATCCA	180

```

***** .***** .***** *****:** ** *****
Humano      CACAGAAAATAAGCTTTATCTGGTTTTTGAATTTCTGCACCAGGACCTCAAGAAATTCAT 240
Rata        CACAGAAAATAAGCTTTATCTGGTTTTTGAATTTCTGCACCAGGACCTCAAGAAATTCAT 240
Raton       CACAGAAAATAAGCTTTATCTGGTTTTTGAATTTCTGCACCAGGACCTCAAGAAATTCAT 240
Cobayo      CACAGAAAATAAACTCTACCTGGTTTTTGAATTTCTGCACCAAGATCTCAAGAAGTTTAT 240
***** .** ** *****
Humano      GGATGCCTCTGCTCTCACGGGCATTCCCTCTCCCTCATCAAGAGCTATCTGTTCCAGCT 300
Rata        GGATGCCTCTGCTCTCACGGGCATTCCCTCTCCCTCATCAAGAGCTATCTGTTCCAGCT 300
Raton       GGATGCCTCTGCTCTCACGGGCATTCCCTCTCCCTCATCAAGAGCTATCTGTTCCAGCT 300
Cobayo      GGATGCCTCTGCTCTCATGGTGTTCCCTCTCCCTCATCAAGAAACTATCTGTTCCAGCT 300
***** ** .*****
Humano      GCTCCA 306
Rata        GCTCCA 306
Raton       GCTCCA 306
Cobayo      GCTCCA 306
*****

```

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE CDK2 DE COBAYO EN GENBANK

Cavia porcellus cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) mRNA, partial cds

GenBank: JN172925.1

```

LOCUS      JN172925 306 bp      mRNA      linear      ROD 12-NOV-2011
DEFINITION Cavia porcellus cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) mRNA,
partial cds.
ACCESSION  JN172925
VERSION    JN172925.1  GI:356467136
KEYWORDS
SOURCE     Cavia porcellus (Domestic guinea pig)
  ORGANISM Cavia porcellus
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
           Hystricognathi; Caviidae; Cavia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 306)
  AUTHORS  Gunturiz,M.L. and Gomez,L.A.
  TITLE    Cyclin dependent kinase 2, CDK2, is differentially expressed
in
           adult isolated cardiomyocytes from guinea pig hearts
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 306)
  AUTHORS  Gunturiz,M.L. and Gomez,L.A.
  TITLE    Direct Submission

```

JOURNAL Submitted (22-JUN-2011) Molecular Physiology Laboratory,
Colombian
National Institute of Health, Research Subdirection, Avenida
calle
26 No. 51-20, Bogota, DC 80080, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..306
 /organism="Cavia porcellus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:[10141](#)"
 gene <1..>306
 /gene="CDK2"
 CDS <1..>306
 /gene="CDK2"
 /note="Cdk2 protein"
 /codon_start=2
 /product="cyclin-dependent kinase 2"
 /protein_id="[AET09700.1](#)"
 /db_xref="GI:356467137"

/translation="EGTYGVVYKAKNKLTGEVVALKKIRLDTETEGVPSTAIRESLL

KELNHPNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGVPLPLIKNYLFQLL"

ORIGIN

```

1 agagggcacg tacggagttg tgtacaaagc caaaaacaag ttgacgggcg aggtggtggc
61 gcttaagaaa atccgctgg aactgagac tgaaggtggt cccagtactg ccattcgaga
121 gatctctctg cttaggagc ttaaccaccc aaacattgctc aagctgctgg atgtcatcca
181 cacagaaaat aaactctacc tggtttttga atttctgcac caagatctca agaagtttat
241 ggatgcctct gctctcactg gtgttctct tccctcctc aagaactatc tgttccagct
301 gctcca
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA la CADENA LIVIANA DE LA MIOSINA (MLC4) DE HUMANO, RATA Y RATÓN (193 pb)

AGGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTTGACAAAGAAAGCAACGGCA
 CAGTCATGGGTGCAGAGCTTCGGCATGTCCTTGCTACCCTGGGAGAGAAGATGAGCGAGG
 CAGAGGTGGAGCAGCTGTTGTCTGGGCAGGAGGATGCCAATGGCTGCATCAAC**TATGAAG**
CCTTTGTCAAGCA

SECUENCIA DE LA PROTEINA MLC4 PARA HUMANO, RATA Y RATÓN

GTYEDFVEGLRVFDKESNGTVMGAELRHVLATLGEKMSEAEVEQLLSGQEDANGCINYEAFVK

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA MLC4 DE COBAYO (CLON PCI-2/MLC4)

AGGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTTGACAAGGGGCAACGGCA
CCGTCATGGGTGCAGAGCTTCGGCATGTCTTGACCTTGGTGAGAGGCTGACTGAAG
ACGAGGTGGAAGTTGATGCCGGGCAGGAGGACTCCAATGGCTGCATTAACTATGAAG
CCTTTGTCAAGCA

SECUENCIA DE LA PROTEINA MLC4 DE COBAYO

GTYEDFVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRHVLATLGERLTEDEVEKLMAGQEDSNGCINYEAFVK

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
RATA          GTYEDFVEGLRVFDKESNGTVMGAELRHVLATLGERKMSAEVEQLLSGQEDANGCINYEAFVK 60
RATON         GTYEDFVEGLRVFDKESNGTVMGAELRHVLATLGERKMSAEVEQLLSGQEDANGCINYEAFVK 60
HUMANO        GTYEDFVEGLRVFDKESNGTVMGAELRHVLATLGERKMSAEVEQLLSGQEDANGCINYEAFVK 60
COBAYO        GTYEDFVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRHVLATLGERRLTEDEVEKLMAGQEDSNGCINYEAFVK 60
*****.*****: : *  ***: : : *****
```

```
RATA          FVK 63
RATON         FVK 63
HUMANO        FVK 63
COBAYO        FVK 63
***
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
Rata      AGGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTTGACAAAGAAAGCAACGGCA 60
Raton     AGGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTTGACAAAGAAAGCAACGGCA 60
Humano    AGGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTTGACAAAGAAAGCAACGGCA 60
Cobayo    AGGGCACCTATGAGGACTTCGTGGAGGGGCTGCGGGTCTTTGACAAAGAAAGCAACGGCA 60
          ***** ** *****

Rata      CAGTCATGGGTGCAGAGCTTCGGCATGTCCTTGCTACCCTGGGAGAGAAGATGAGCGAGG 120
Raton     CAGTCATGGGTGCAGAGCTTCGGCATGTCCTTGCTACCCTGGGAGAGAAGATGAGCGAGG 120
Humano    CAGTCATGGGTGCAGAGCTTCGGCATGTCCTTGCTACCCTGGGAGAGAAGATGAGCGAGG 120
Cobayo    CCGTCATGGGTGCCGAGCTCGCCACCGTGCTGGCCACCCTGGGTGAGAGGCTGACTGAAG 120
          * ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** * ** *

Rata      CAGAGGTGGAGCAGCTGTTGTCTGGGCAGGAGGATGCCAATGGCTGCATCAACTATGAAG 180
Raton     CAGAGGTGGAGCAGCTGTTGTCTGGGCAGGAGGATGCCAATGGCTGCATCAACTATGAAG 180
Humano    CAGAGGTGGAGCAGCTGTTGTCTGGGCAGGAGGATGCCAATGGCTGCATCAACTATGAAG 180
Cobayo    ACGAGGTGGAGAGTTGATGCCGGGCAGGAGGACTCCAATGGCTGCATCAACTATGAAG 180
          ***** ** ** ** * ***** ***** *****

Rata      CCTTTGTCAAGCA 193
Raton     CCTTTGTCAAGCA 193
Humano    CCTTTGTCAAGCA 193
Cobayo    CCTTTGTCAAGCA 193
          *****
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA EL RECEPTOR DE ENDOTELINA (EDNR β) DE HUMANO, RATA Y RATÓN (300 pb)

TCCCAATATCTTGATCGCCAGTCTGGCTCTGGGAGACCTACTGCACATCATCATAGACAT
 ACCCATTAACACCTACAAGTTGCTCGCAGAGGACTGGCCATTTGGAGCTGAGATGTGTAA
 GCTGGTGCCCTTCATACAGAAGGCTTCTGTGGGAATCACAGTGCTGAGTCTTTGTGCTCT
 AAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCGAATTAAGGAATTGGGGTTCC
 AAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTTTTAATTTGGGTGGTCTC**TGTGGTTCTGGCTGTCCC**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA EDNR β PARA HUMANO, RATA Y RATÓN

PNILIASLALGDLLHIIIDIPI**NTY**KLLAEDWPF**GA**EMCKLV**PF**IQKASVGITVLSL**CA**L
 SIDRYRAVASWSRIKIGV**PK**WTAVEIVLIW**V**SVVLAV

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA EDNR β DE COBAYO

TCCCAATATCTTGATCGCCAGCCTGGCTCTGGGAGACCT**T**CTGCAT**T**ATC**G**TCAT**T**GACAT
CCCCATCAGTGTCTACAAGCTTGCT**GGCCGA**AGACTGGCC**C**TTTGGAG**T**TGAGATGTGTAA
 GCTGGTGCC**T**TTTCATACAGAAGGC**C**TCTGT**AGGAATCAC**CGTGCT**A**AGTCT**G**TGTGCTCT
GAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCG**C**ATTAAAGGAATT**GGA**AGTTCC
 AAA**G**TGGACAGCAGT**G**GAAATT**A**TTTTAATTTGGGT**A**TCTC**TGTGGTTCTGGCTGTCCC**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA EDNR β DE COBAYO

PNILIASLALGDLLHIIIDIPI**SVY**KLLAEDWPF**GV**EMCKLV**PF**IQKASVGITVLSL**CA**L
 SIDRYRAVASWSRIKIGV**PR**WTAVEIVLIW**I**SVVLAV

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

RATA	TCCCAATATCTTGATCGCCAGTCTGGCTCTGGGAGACCTACTGCACATCATCATAGACAT	60
RATON	TCCCAATATCTTGATCGCCAGTCTGGCTCTGGGAGACCTACTGCACATCATCATAGACAT	60
HUMANO	TCCCAATATCTTGATCGCCAGTCTGGCTCTGGGAGACCTACTGCACATCATCATAGACAT	60
COBAYO	TCCCAATATCTTGATCGCCAGCCTGGCTCTGGGAGACCTTCTGCATATCCTCATTGACAT	60
	***** * . . ***** ***** ;***** ** . ***** ;*****	
RATA	ACCCATTAACACCTACAAGTTGCTCGCAGAGGACTGGCCATTTGGAGCTGAGATGTGTAA	120
RATON	ACCCATTAACACCTACAAGTTGCTCGCAGAGGACTGGCCATTTGGAGCTGAGATGTGTAA	120
HUMANO	ACCCATTAACACCTACAAGTTGCTCGCAGAGGACTGGCCATTTGGAGCTGAGATGTGTAA	120
COBAYO	CCCCATCAGTGTCTACAAGCTGCTGGCCGAAGACTGGCCCTTTGGAGTTGAGATGTGTAA	120
	.***** * . . ***** ***** ***** ;***** ***** ;***** *****	
RATA	GCTGGTGCCCTTCATACAGAAGGCTTCTGTGGGAATCACAGTGCTGAGTCTTTGTGCTCT	180
RATON	GCTGGTGCCCTTCATACAGAAGGCTTCTGTGGGAATCACAGTGCTGAGTCTTTGTGCTCT	180
HUMANO	GCTGGTGCCCTTCATACAGAAGGCTTCTGTGGGAATCACAGTGCTGAGTCTTTGTGCTCT	180
COBAYO	GCTGGTGCCCTTTTCATACAGAAGGCTTCTGTAGGAATCACCGTGCTAAGTCTGTGTGCTCT	180
	***** ***** ***** ;***** ***** ;***** ***** *****	
RATA	AAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCGAATTAAGGAATTGGGGTTCC	240


```

RATON      AAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCGAATTAAGGAATTGGGGTTCC 240
HUMANO     AAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCGAATTAAGGAATTGGGGTTCC 240
COBAYO     GAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGGAGTCGCATTAAGGAATTGGAGTTCC 240
           .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
RATA       AAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTTTTAAATTGGGTGGTCTCTGTGGTTCTGGCTGTCCC 300
RATON      AAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTTTTAAATTGGGTGGTCTCTGTGGTTCTGGCTGTCCC 300
HUMANO     AAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTTTTAAATTGGGTGGTCTCTGTGGTTCTGGCTGTCCC 300
COBAYO     AAAGTGGACAGCAGTGAAATTATTTTAAATTGGGTGATCTCTGTGGTTCTGGCTGTCCC 300
           ***.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE EDNR β DE COBAYO EN GENBANK

[Cavia porcellus endothelin receptor type B protein \(CTRL-ENDBR-1\) mRNA, partial cds](#)

GenBank: JQ773418.1

```

LOCUS      JQ773418 300 bp mRNA linear ROD 13-JUN-2012
DEFINITION Cavia porcellus endothelin receptor type B protein (CTRL-
ENDBR-1)
           mRNA, partial cds.
ACCESSION  JQ773418
VERSION    JQ773418.1 GI:390432198
KEYWORDS
SOURCE     Cavia porcellus (Domestic guinea pig)
ORGANISM   Cavia porcellus
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
           Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
           Hystricognathi; Caviidae; Cavia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 300)
AUTHORS    Gunturiz,M.L. and Gomez,L.A.
TITLE      Guinea pig (Cavia porcellus) endothelin receptor type B from
           isolated cardiomyocytes
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 300)
AUTHORS    Gunturiz,M.L. and Gomez,L.A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (13-MAR-2012) Research Direction, Molecular
Physiology
           Laboratory, Colombian National Institute of Health, Avenida
Calle
           26 No. 51-20, Bogota, D.C. 80080, Colombia
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..300
                       /organism="Cavia porcellus"
                       /mol_type="mRNA"
                       /db_xref="taxon:10141"
                       /cell_type="cardiomyocytes"
                       /country="Colombia"
           gene            <1..>300
                       /gene="CTRL-ENDBR-1"
           CDS             <1..>300
                       /gene="CTRL-ENDBR-1"

```

```
/codon_start=2  
/product="endothelin receptor type B protein"  
/protein_id="AFL91691.1"  
/db_xref="GI:390432199"
```

```
/translation="PNILIASLALGDLLHIVIDIPISVYKLLAEDWPFVEMCKLVPF
```

```
IQKASVGITVLSLCALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIILIWVISVVLAVP"
```

```
ORIGIN
```

```
1  tcccaatatc ttgatcgcca gctggctct gggagacctt ctgcatatcg tcattgacat  
61  ccccatcagt gtctacaagc tgctggccga agactggccc ttgggagttg agatgtgtaa  
121 gctggtgctt ttcatacaga agcctctgt aggaatcacc gtgctaagtc tgtgtgctct  
181 gagtattgac agatatcgag ctgttgcttc ttggagtcgc attaaaggaa ttggagttcc  
241 aaagtggaca gcagtggaaa ttattttaat ttgggtgatc tctgtggttc tggctgtccc
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA APE (DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase; APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1)) DE HUMANO, RATA Y RATÓN (193 pb)

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA APE DE COBAYO

GGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTCGTCCTGGTTACAGCCTATGTACCTAATGCAGGTCGG
GGTTGGTAAGGCTGGAGTACAGGCAGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGCAAGTTCCTGAAGGGCTT
GGCTTCCCGCAAGCCTCTGGTACTATGTGGGACCTCAATGTGGCTCATGAAGAAATTGACCT

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA APE DE COBAYO

VIVAEFDSFVLVTAYVPNAGRGLVRLEYRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHE EID

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

```

COBAYO      VIVAEFDSFVLVTAYVPNAGRGLVRLEYRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHE 60
HUMANO      VIVAEFDSFVLVTAYVPNAGRGLVRLEYRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHE 60
RATON       VIVAEFESFVLVTAYVPNAGRGLVRLEYRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHE 60
RATA        VIVAEFESFILVTAYVPNAGRGLVRLEYRQRWDEAFRKFLKGLASRKPLVLCGDLNVAHE 60
*****;*:*****.*****

```

```

COBAYO      EID 63
HUMANO      EID 63
RATON       EID 63
RATA        EID 63
***

```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA LA PROTEINA CINASA C-BETA (PKC-β) HUMANO, RATA Y RATÓN

AAGAACCACAAATTCACCGCCGCTTCTTCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACCG
 ACTTCATCTGGGGCTTCGGGAAGCAGGGATTCCAGTGTCAAGTCTGCTGCTTTGTTGTAC
 ACAAGCGCTGCCATGAGTTCGTCACGTTCTCCTGCCCGGTGCGGACAAGGGCCCGGCCT
 CTGATGACCCCGGAGCAAACACAAGTTTAAGATCCACACGTACTCCAGTCTACCTTCT
 GTGACCACTGTGGATCGCTGCTGTATGGACTTATTACCAGGGGATGAAATGCGACACCT
 GTATGATGAACGTG**CACAAGCGCTGCGTGATG**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA PKC-β PARA HUMANO, RATA Y RATÓN

KNHKFTARFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQCQVCCFVVHKRCHEFVTFSCP GADK GPA
 SDDPRSKHKFKIHTYSSPTFCDHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMMNVHKRCVM

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA LA PROTEINA CINASA C-BETA COBAYO (CLON PCI-4/PKC-B)

AAGAACCACAAATTCACCGCCGCTTCTTCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACC
 GACTTCATCTGGGGCTTTGGCAAGCAGGGTTTCCAGTGTCAAGTTTGCTGCTTTGTTGTG
 CACAAGCGGTGCCATGAATTGTGCACAATTCTCTTGCCCTGGAGCTTGACAAGGGACCAGCC
 TCTGATGACCCCGGAGCAAACAAGTTTAAGATCCACACCTACTCCAGCCCACATT
 TGTGACCACTGTGGGTCATTGCTGTATGGACTCATCCATCAGGGGATGAAATGCGATACC
 TG**CATGATGAACGT****CACAAGCGCTGCGTGATG**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA PKC-β DE COBAYO

KNHKFTARFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQCQVCCFVVHKRCHEFVTFSCP GADK GPA
 SDDPRSKHKFKIHTYSSPTFCDHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMMNVHKRCVM

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

Humano	AAGAACCACAAATTCACCG -CCGCTTCTTCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACC	59
Rata	AAGAACCACAAATTCACCG -CCGCTTCTTCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACC	59
Ratón	AAGAACCACAAATTCACCG -CCGCTTCTTCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACC	59
Cobayo	AAGAACCACAAATTCACCG CCGCTTCTTCAAGCAGCCCACCTTCTGCAGCCACTGCACC	60

Humano	GACTTCATCTGGGGCTTCGGGAAGCAGGGATTCCAGTGTCAAGTCTGCTGCTTTGTTGTA	119
Rata	GACTTCATCTGGGGCTTCGGGAAGCAGGGATTCCAGTGTCAAGTCTGCTGCTTTGTTGTA	119
Ratón	GACTTCATCTGGGGCTTCGGGAAGCAGGGATTCCAGTGTCAAGTCTGCTGCTTTGTTGTA	119
Cobayo	GACTTCATCTGGGGCTTTGGCAAGCAGGGTTTCCAGTGTCAAGTTTGCTGCTTTGTTGTG	120
	***** * * ***** ; ***** *****	
Humano	CACAAGCGCTGCCATGAGTTCGTCACGTTCTCCTGCCCGGTGCGGACAAGGGCCCGGCC	179

```

Rata          CACAAGCGCTGCCATGAGTTTCGTACGTTCTCCTGCCCGGTGCGGACAAGGGCCCGGCC 179
Ratón        CACAAGCGCTGCCATGAGTTTCGTACGTTCTCCTGCCCGGTGCGGACAAGGGCCCGGCC 179
Cobayo       CACAAGCGTGCCATGAATTGTCACATTCCTTGCCCTGGAGCTGACAAGGGACCAGCC 180
*****
Humano       TCTGATGACCCCGGAGCAAAACAAGTTTAAGATCCACACGTA CTCCAGTCCTACCTTC 239
Rata        TCTGATGACCCCGGAGCAAAACAAGTTTAAGATCCACACGTA CTCCAGTCCTACCTTC 239
Ratón       TCTGATGACCCCGGAGCAAAACAAGTTTAAGATCCACACGTA CTCCAGTCCTACCTTC 239
Cobayo      TCTGATGACCCCGGAGCAAAACAAGTTTAAGATCCACACCTACTCCAGCCCACATTT 240
*****
Humano       TGTGACCACTGTGGATCGCTGCTGTATGGACTTATTCACCAAGGGGATGAAATGCGACACC 299
Rata        TGTGACCACTGTGGATCGCTGCTGTATGGACTTATTCACCAAGGGGATGAAATGCGACACC 299
Ratón       TGTGACCACTGTGGATCGCTGCTGTATGGACTTATTCACCAAGGGGATGAAATGCGACACC 299
Cobayo      TGTGACCACTGTGGGTCATGCTGTATGGACTCATCCATCAGGGGATGAAATGCGATACC 300
*****
Humano       TGTATGATGAACGTGCACAAGCGCTGCGTGATG 332
Rata        TGTATGATGAACGTGCACAAGCGCTGCGTGATG 332
Ratón       TGTATGATGAACGTGCACAAGCGCTGCGTGATG 332
Cobayo      TG CATGATGAACGTGCACAAGCGCTGCGTGATG 333
**

```

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE PKC- β DE COBAYO EN GENBANK

Cavia porcellus protein kinase C beta protein (PKC-B) mRNA, partial cds

GenBank: JQ773419.1

LOCUS JQ773419 333 bp mRNA linear ROD 13-JUN-2012
DEFINITION Cavia porcellus protein kinase C beta protein (PKC-B) mRNA, partial cds.
ACCESSION JQ773419
VERSION JQ773419.1 GI:390432200
KEYWORDS
SOURCE Cavia porcellus (Domestic guinea pig)
ORGANISM [Cavia porcellus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Hystricognathi; Caviidae; Cavia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 333)
AUTHORS Gunturiz, M. L.
TITLE Guinea pig (Cavia porcellus) protein kinase C beta from isolated cardiomyocytes
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 333)
AUTHORS Gunturiz, M. L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-MAR-2012) Research Direction, Molecular Physiology

Laboratory, Colombian National Institute of Health, Avenida Calle
26 No. 51-20, Bogota, D.C. 80080, Colombia

```
FEATURES             Location/Qualifiers
source               1..333
                   /organism="Cavia porcellus"
                   /mol_type="mRNA"
                   /db_xref="taxon:10141"
                   /cell_type="cardiomyocytes"
                   /country="Colombia"
gene                 <1..>333
                   /gene="PKC-B"
                   /gene_synonym="PCI-4"
CDS                  <1..>333
                   /gene="PKC-B"
                   /gene_synonym="PCI-4"
                   /EC_number="2.7.11.13"
                   /codon_start=1
                   /product="protein kinase C beta protein"
                   /protein_id="AFL91692.1"
                   /db_xref="GI:390432201"
```

```
/translation="KNHKFTARFFKQPTFCSHCTDFIWGFGKQGFQCQVCCFVVHKRCHEFVTFSCPGADKG
PASDDPRSKHKFKIHTYSSPTFCDHCGSLLYGLIHQGMKCDTCMMNVHKRCVM"
```

ORIGIN

```
1  aagaaccaca aattcaccgc cgcgttcttc aagcagccca cttctgcag ccaactgcacc
61  gacttcatct ggggctttgg caagcagggt ttccagtgtc aagtttgctg ctttgttgtg
121 cacaagcggt gccatgaatt tgtcacattc tcttgccctg gagctgacaa gggaccagcc
181 tctgatgacc cccggagcaa acacaagttt aagatccaca cctactccag cccacattt
241 tgtgaccact gtgggtcatt gctgtatgga ctcatccatc aggggatgaa atgcgatacc
301 tgcgatgatg acgtccacaa gcgctgcgtg atg
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA INWARD RECTIFIER POTASSIUM CHANNEL Kir6.2 DE HUMANO, RATA Y RATÓN (366 pb)

ATGATCAACGCCATCATGCTGGGCTGCATCTTCATGAAAACGGCCCAGGCCCATCGGCCGGGCAGA AACCTCATCTTCAGCAAGCATGCTGTGATCACCTGCGCCATGGCCGCCTGTGCTTCATGCTGC GCGTAGGGGACCTCCGAAAGAGCATGATCATTAGCGCCACCATCCACATGCAGGTGGTGCGCAAG ACCACCAGCCCCGAGGGCGAAGTTGTGCCTCTCCACCAGGTAGACATCCCCATGGAGAATGGCGT GGGTGGTAACGGCATCTTCCTGGTGGCCCCACTCATCATCTACCACGTCATCGACTCCAACAGCC CGCTCTACGACCTGGCTCCTAGT**GACCTGCACCACCACCAG**

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA Kir6.2 DE COBAYO (PCI-1 KIR 6.2)

ATGATCAACGCCATCATGCTGGGCTGCATCTTCATGAAGACCTCCCAGGGCGATCGGCCGGGCAGA GACCCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGT**CAT**TGCTCTGCGCCACGGCCGCCTCTGCTTCATGCTGC GCGTGGGTGACCTCCG**GAA**AGCATGATCATCAGT**GCC**ACCATCCACATGCAGGTGGT**CCGAA**AG ACCAC**GAGT**CCCGAGGGCGAGGTGGT**CCCC**CTCCACCAGGTGGAT**TAT**CCCCATGGAGAACGGTGT GGGGG**TA**ACAGT**TAT**CTTCCTGGTGGCCCCGCT**CAT**CATCTACCATGTCAT**CGAT**GCCAACAGT**C** CACTCTACGACCTGG**GACCC**AGT**GACCTGCACCACCACCAG**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA Kir6.2 DE COBAYO

MINAIMLGCIFMKTSQAHRAETLIFSKHAVIALRHGRLCFMLRVGDLRKSMIISATIHMQVVRK TTSPEGEVVPLHQVDIPMENGVGNSIFLVAPLIYHVIDANSPLYDLGPSDLHHH

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

Ratón	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAAACGGCCCAGGCCCATCGGCCGGGCAGA	60
Var2Raton	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAAACGGCCCAGGCCCATCGGCCGGGCAGA	60
Rata	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAAACGGCACAGGCCCATCGGCCGGGCAGA	60
Cavia	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAGACCTCCCAGGGCGATCGGCCGGGCAGA	60
Cobayo	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAGACCTCCCAGGGCGATCGGCCGGGCAGA	60
Humano	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAGACTGCCCAAGCCCAACCGCAGG	60
HumVar2	ATGATCAACGCCATCATGCT GGGCTGCATCTTCATGAAGACTGCCCAAGCCCAACCGCAGG	60
	***** ** * ** ** ** **	
Ratón	GCAGAAACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCTGTGATCACCTGCGCCATGGCCGCCTGTGC	120
Var2Raton	GCAGAAACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCTGTGATCACCTGCGCCATGGCCGCCTGTGC	120
Rata	GCAGAAACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGTGATCACCTGCGACATGGCCGCCTGTGC	120
Cavia	GCAGAGACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGTGATGCTCTGCGCCACGGCCGCCTGTGC	120
Cobayo	GCAGAGACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGTGATGCTCTGCGCCACGGCCGCCTGTGC	120
Humano	GCTGAGACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGTGATCGCCCTGCGCCACGGCCGCCTGTGC	120
HumVar2	GCTGAGACCCCTCATCTTCAGCAAGCATGCGGTGATCGCCCTGCGCCACGGCCGCCTGTGC	120
	** ** ***** ** ** * ***** ** ***** **	

```

Ratón          TTCATGCTGCGCGTAGGGGACCTCCGAAAGAGCATGATCATTAGCGCCACCATCCACATG 180
Var2Raton     TTCATGCTGCGCGTAGGGGACCTCCGAAAGAGCATGATCATTAGCGCCACCATCCACATG 180
Rata          TTCATGCTTCGCGTAGGGGACCTCCGAAAAAGCATGATCATTAGCGCCACCATTCATATG 180
Cavia        TTCATGCTGCGCGTGGGTGACCTCCGGAAAAGCATGATCATCAGTGCCACCATCCACATG 180
Cobayo       TTCATGCTGCGCGTGGGTGACCTCCGGAAAAGCATGATCATCAGTGCCACCATCCACATG 180
Humano       TTCATGCTACGTGTGGGTGACCTCCGCAAGAGCATGATCATCAGCGCCACCATCCACATG 180
HumVar2      TTCATGCTACGTGTGGGTGACCTCCGCAAGAGCATGATCATCAGCGCCACCATCCACATG 180
***** ** ** * ***** ** ***** ** ***** ** **

Ratón          CAGGTGGTGCACAAGACCACAGCCCCGAGGGCGAAGTTGTGCCTCTCCACCAGGTAGAC 240
Var2Raton     CAGGTGGTGCACAAGACCACAGCCCCGAGGGCGAAGTTGTGCCTCTCCACCAGGTAGAC 240
Rata          CAGGTGGTGCACAAGACCACAGCCCCGAGGGCGAAGTTGTGCCTCTCCACCAGGTGGAC 240
Cavia        CAGGTGGTCCGAAAAGACCACGAGTCCCGAGGGCGAGGTGGTCCCCCTCCACCAGGTGGAC 240
Cobayo       CAGGTGGTCCGAAAAGACCACGAGTCCCGAGGGCGAGGTGGTCCCCCTCCACCAGGTGGAT 240
Humano       CAGGTGGTACGCAAGACCACAGCCCCGAGGGCGAGGTGGTCCCCCTCCACCAGGTGGAC 240
HumVar2      CAGGTGGTACGCAAGACCACAGCCCCGAGGGCGAGGTGGTCCCCCTCCACCAGGTGGAC 240
***** ** ***** ** * ***** ** ** ** ***** ** **

Ratón          ATCCCCATGGAGAATGGCGTGGGTGGTAACGGCATCTTCTTGGTGGCCCCACTCATCATC 300
Var2Raton     ATCCCCATGGAGAATGGCGTGGGTGGTAACGGCATCTTCTTGGTGGCCCCACTCATCATC 300
Rata          ATCCCCATGGAGAACGGTGTGGGTGGTAACAGCATCTTCTTGGTGGCCCCACTCATCATC 300
Cavia        ATCCCCATGGAGAACGGTGTGGGTGGTAACAGTATCTTCTTGGTGGCCCCGCTCATCATC 300
Cobayo       ATCCCCATGGAGAACGGTGTGGGTGGTAACAGTATCTTCTTGGTGGCCCCGCTCATCATC 300
Humano       ATCCCCATGGAGAACGGCGTGGGTGGCAACAGCATCTTCTTGGTGGCCCCGCTGATCATC 300
HumVar2      ATCCCCATGGAGAACGGCGTGGGTGGCAACAGCATCTTCTTGGTGGCCCCGCTGATCATC 300
***** ** ***** ** ** * ***** ***** ** *****

Ratón          TACCACGTCAATCGACTCCAAAGCCCCGCTTACGACCTGGCTCCTAGTGACCTGCACCAC 360
Var2Raton     TACCACGTCAATCGACTCCAAAGCCCCGCTTACGACCTGGCTCCTAGTGACCTGCACCAC 360
Rata          TACCACGTCAATCGACTCCAAAGCCCCGCTTACGACCTGGCTCCTAGTGACCTGCACCAC 360
Cavia        TACCATGTCAATCGATGCCAAAGTCCACTTACGACCTGGGACCCAGTGACCTGCACCAC 360
Cobayo       TACCATGTCAATCGATGCCAAAGTCCACTTACGACCTGGGACCCAGTGACCTGCACCAC 360
Humano       TACCATGTCAATGATGCCAAAGCCCCACTTACGACCTGGCACCCAGCGACCTGCACCAC 360
HumVar2      TACCATGTCAATGATGCCAAAGCCCCACTTACGACCTGGCACCCAGCGACCTGCACCAC 360
***** ***** ** ***** ** ***** ***** ** ** ***** *****

Ratón          CACCAG 366
Var2Raton     CACCAG 366
Rata          CACCAG 366
Cavia        CACCAG 366
Cobayo       CACCAG 366
Humano       CACCAG 366
HumVar2      CACCAG 366

```

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE Kir6.2 DE COBAYO EN GENBANK

Cavia porcellus inwardly-rectifying potassium channel Kir6.2 protein (PCI-1) mRNA, partial cds

GenBank: JQ773417.1

LOCUS JQ773417 366 bp mRNA linear ROD 13-JUN-2012
DEFINITION Cavia porcellus inwardly-rectifying potassium channel Kir6.2 protein (PCI-1) mRNA, partial cds.
ACCESSION JQ773417

VERSION JQ773417.1 GI:390432196

KEYWORDS

SOURCE Cavia porcellus (Domestic guinea pig)

ORGANISM [Cavia porcellus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Hystricognathi; Caviidae; Cavia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 366)

AUTHORS Gomez,L.A. and Gunturiz,M.L.

TITLE Cavia porcellus inwardly-rectifying potassium channel Kir6.2
from
isolated cardiomyocytes

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 366)

AUTHORS Gomez,L.A. and Gunturiz,M.L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-MAR-2012) Research Direction, Molecular
Physiology
Laboratory, Colombian National Institute of Health, Avenida
Calle
26 No. 51-20, Bogota, D.C. 80080, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..366
/organism="Cavia porcellus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[10141](#)"
/cell_type="cardiomyocytes"
/country="Colombia"

gene <1..>366
/gene="PCI-1"

CDS <1..>366
/gene="PCI-1"
/codon_start=1
/product="inwardly-rectifying potassium channel
Kir6.2
protein"
/protein_id="[AFL91690.1](#)"
/db_xref="GI:390432197"

/translation="MINAIMLGCIFMKTSQAHRRRAETLIFSKHAVIALRHGRLCFMLRVGDLRKSMIISATI
HMQVVRKTTSPERGEVPLHQVDIPMENGVGGNSIFLVAPLI IYHVIDANSPLYDLGPSDLHHHQ"

ORIGIN

```
1 atgatcaacg ccatcatgct gggctgcatc ttcatgaaga cctcccaggc gcatcggcgg
61 gcagagacc ccatcttcag caagcatgcg gtcattgctc tgcgccacgg ccgcctctgc
121 ttcattgctc gcgtgggtga cctccgaaa agcatgatca tcagtgccac catccacatg
181 caggtggtcc gaaagaccac gagtcccgag ggcgaggtgg tccccctcca ccaggtggat
241 atccccatgg agaacggtgt ggggggtaac agtatcttcc tggtggtccc gctcatcatc
301 taccatgtca tcgatgcaa cagtccactc tacgacctgg gaccacagtga cctgcaccac
361 caccag
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA EL FACTOR DE HIPOXIA INDUCIBLE 1 (Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit, HIF1A) DE HUMANO, RATA Y RATÓN (296 pb)

TGCTTGGTGCTGATTTGTGAACCCATTCCTCACCCATCAAATATTGAAATTCCTTTAGAT
AGCAAGACTTTTCCTCAGTCGACACAGCCTGGATATGAAATTTTCTTATTGTGATGAAAGA
ATTACCGAATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAAGCTTTTAGGCCGCTCAATTTATGAATAT
TATCATGCTTTGGACTCTGATCATCTGACCAAACTCATCATGATATGTTTACTAAAGGA
CAAGTCACCACAGGACAGTACAGGATGCTTGCCAA**AAGAGGTGGATATGTCTGGGT**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA HIF1A PARA HUMANO, RATA Y RATÓN

CLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHSLDMKFSYCDERITELMGYEPEELLGRSIY
YHALDSDHLTKTHHDMFTKGQVTTGQYRMLAKRGGYVW

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA HIF1A DE COBAYO (CLON CONTROL-1/HIF-1a)

TGCTTGGTGCTGATTTGTGAACCCATTCCTCACCCATCAAATATTGAAATTCCTTTAGAT
AGCAAGACTTTTCCTCAGTCGACACAGCCTGGATATGAAATTTTCTTATTGTGATGAAAGA
ATTACCGAATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAAGCTTTTAGGCCGCTCAATTTATGAATAT
TATCATGCTTTGGACTCTGATCATCTGACCAAACTCATCATGATATGTTTACTAAAGGA
CAAGTCACCACAGGACAGTACAGGATGCTTGCCAA**AAGAGGTGGATATGTCTGGGT**

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA HIF1A DE COBAYO

CLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHSLDMKFSYCDERITELMGYEPEELLGRSIY
YHALDSDHLTKTHHDMFTKGQVTTGQYRMLAKRGGYVW

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE HIF1A DE COBAYO EN GENBANK

***Cavia porcellus* clone CONTROL-1/HIF1A hypoxia inducible factor 1 alpha subunit protein mRNA, partial cds**

GenBank: JQ824085.1

LOCUS JQ82408 296 bp mRNA linear ROD 16-JUL-2012
DEFINITION *Cavia porcellus* clone CONTROL-1/HIF1A hypoxia inducible factor 1
alpha subunit protein mRNA, partial cds.
ACCESSION JQ824085
VERSION JQ824085.1 GI:394987312

KEYWORDS

SOURCE *Cavia porcellus* (domestic guinea pig)

ORGANISM [Cavia porcellus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Hystricognathi; Caviidae; *Cavia*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 296)

AUTHORS **Gunturiz, M.L. and Gomez, L.A.**

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (26-MAR-2012) Research Direction, Molecular Physiology
Laboratory. Colombian National Institute of Health, Avenida Calle
26 No. 51-20, Bogota, D.C. 80080, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..296

/organism="Cavia porcellus"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:[10141](#)"

/clone="CONTROL-1/HIF1A"

/cell_type="cardiomyocytes"

/country="Colombia"

CDS <1..>296

/codon_start=1

/product="hypoxia inducible factor 1 alpha subunit
protein"

/protein_id="[AFN42887.1](#)"

/db_xref="GI:394987313"

/translation="CLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHS LDMKFSYCDERITEL
MGYEP EELLGRSIY EYYHALDS DHLT KTHHDMFTKGQVTTGQYRMLAKRGGYVWV"

ORIGIN

```
1  tgcttggtgc  tgatttgtga  acccattcct  cacccatcaa  atattgaaat  tcctttagat
61  agcaagactt  tcctcagtcg  acacagcctg  gatatgaaat  tttcttattg  tgatgaaaga
121  attaccgaat  tgatgggata  tgagccagaa  gaacttttag  gccgctcaat  ttatgaatat
181  tatcatgctt  tggactctga  tcatctgacc  aaaactcatc  atgatatggt  tactaaagga
241  caagtcacca  caggacagta  caggatgctt  gccaaaagag  gtggatatgt  ctgggt
```

SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA EL H(+)/CL(-) EXCHANGE TRANSPORTER 7 (CLCN7) DE HUMANO, RATA Y RATÓN (261 pb)

CCACACAACGAGAAGCTCCTGTCCTCAAGTATGAGAGCTTGGACTATGACAACAGTGAG
 AACCAAGCTGTTCTGGAGGAGGAGCGGCGGATCAATCACACGGCCTTCCGGACGGTGGAG
 ATCAAGCGCTGGGTCATCTGCGCCCTCATTGGGATCCTCACGGGCCTCGTGGCCTGCTTC
 ATTGACATCGTGTTGGAAAACCTGGCTGGCCTCAAGTACAGGGTCATCAAGGGCAATATC
GACAAGTTCACAGAGAAGGGC

SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA CLCN7 DE COBAYO (CLON CONTROL-4)

CCACACAACGAGAAGCTCCTGTCTCTAAAGTATGAGAGCTTAGACTATGACAACAGTGAG
 AACCAACTGTTTTTAGAGGAAGAAAGGCGGATCAACCACATTGGCCTTCCGAACAGTGGAG
 ATTAAACGCTGGGTCATATGTGCCCTCATCGGGATCCTCACAGGCCTTGTGGCCTGCTTC
 ATTGACATCGTGTTAGGAACTTGGCCGGCCTGAGGTACAGGCTCATCAAGGACAATATC
GACAAGTTCACAGAGAAGGGC

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA CLCN7 DE COBAYO

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

```

RATA      CCACACAACGAGAAGCTCCTGTCCTCAAGTATGAGAGCTTGGACTATGACAACAGTGAG 60
RATON     CCACACAACGAGAAGCTCCTGTCCTCAAGTATGAGAGCTTGGACTATGACAACAGTGAG 60
HUMANO    CCACACAACGAGAAGCTCCTGTCCTCAAGTATGAGAGCTTGGACTATGACAACAGTGAG 60
COBAYO    CCACACAACGAGAAGCTCCTGTCCTAAAGTATGAGAGCTTAGACTATGACAACAGTGAG 60
*****

RATA      AACCAAGCTGTTCTGGAGGAGGAGCGGCGGATCAATCACACGGCCTTCCGGACGGTGGAG 120
RATON     AACCAAGCTGTTCTGGAGGAGGAGCGGCGGATCAATCACACGGCCTTCCGGACGGTGGAG 120
HUMANO    AACCAAGCTGTTCTGGAGGAGGAGCGGCGGATCAATCACACGGCCTTCCGGACGGTGGAG 120
COBAYO    AACCAACTGTTTTAGAGGAAGAAAGGCGGATCAACCACATGGCCTTCCGAACAGTGGAG 120
*****

RATA      ATCAAGCGCTGGGTCATCTGCGCCCTCATTGGGATCCTCACGGGCCTCGTGGCCTGCTTC 180
RATON     ATCAAGCGCTGGGTCATCTGCGCCCTCATTGGGATCCTCACGGGCCTCGTGGCCTGCTTC 180
HUMANO    ATCAAGCGCTGGGTCATCTGCGCCCTCATTGGGATCCTCACGGGCCTCGTGGCCTGCTTC 180
COBAYO    ATTAACCGCTGGGTCATATGTGCCCTCATCGGGATCCTCACAGGCCTTGTGGCCTGCTTC 180
*****

RATA      ATTGACATCGTGTTGGAAAACCTGGCTGGCCTCAAGTACAGGGTCATCAAGGGCAATATC 240
RATON     ATTGACATCGTGTTGGAAAACCTGGCTGGCCTCAAGTACAGGGTCATCAAGGGCAATATC 240
HUMANO    ATTGACATCGTGTTGGAAAACCTGGCTGGCCTCAAGTACAGGGTCATCAAGGGCAATATC 240
COBAYO    ATTGACATCGTGGTAGAGAACTTGGCCGGCCTGAGGTACAGGCTCATCAAGGACAATATC 240
*****

RATA      GACAAGTTCACAGAGAAGGGC 261
RATON     GACAAGTTCACAGAGAAGGGC 261
HUMANO    GACAAGTTCACAGAGAAGGGC 261
COBAYO    GACAAGTTCACAGAGAAGGGC 261
*****
    
```

PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DE CLCN7 DE COBAYO EN GENBANK

Cavia porcellus clone control-4 H(+)/Cl(-) exchange transporter 7 mRNA, partial cds

GenBank: JF894321.1

LOCUS JF894321 261 bp mRNA linear ROD 14-JUN-2011

DEFINITION Cavia porcellus clone control-4 H(+)/Cl(-) exchange transporter 7

mRNA, partial cds.

ACCESSION JF894321

VERSION JF894321.1 GI:335345648

KEYWORDS

SOURCE Cavia porcellus (Domestic guinea pig)

ORGANISM [Cavia porcellus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;

Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;

Hystricognathi; Caviidae; Cavia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 261)

AUTHORS **Gunturiz, M.L. and Gomez, L.A.**

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-APR-2011) Research Sub-direction, Molecular Physiology Laboratory, Colombian National Institute of

Health,

Avenida Calle 26 No. 51-20, Bogota, D.C. 80080, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..261

/organism="Cavia porcellus"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:[10141](#)"

/clone="control-4"

/cell_type="cardiac myocytes"

[CDS](#)

<1..>261

/note="CLCN7"

/codon_start=1

/product="H(+)/Cl(-) exchange transporter 7"

/protein_id="[AEH41426.1](#)"

/db_xref="GI:335345649"

/translation="PHNEKLLSLKYESLDYDENSENQLFLEEERRINHMAFRTVEIKRW

VICALIGILTGLVACFIDIVVENLAGLRYRLIKDNIDKFTEKG"

ORIGIN

```
1 ccacacaacg agaagctcct gtctctaaag tatgagagct tagactatga caacagtgag
61 aaccaactgt ttttagagga agaaaggcgg atcaaccaca tggccttcg aacagtgagg
121 attaaacgct gggcatatg tggcctcatc gggatcctca caggccttgt ggctgcttc
181 attgacatcg tggtagagaa cttggccggc ctgaggtaca ggctcatcaa ggacaatatc
241 gacaagttca cagagaaggg c
```

**SECUENCIA CONSENSO ESPERADA PARA INHIBIDOR p16 DE
HUMANO, RATA Y RATÓN (246 pb)**

TCAGTCACCGAAGGTCCTACAGGGCCACAACCTGCCCCCGCCACAACCCACCCCGCTTTCGTAGTT
TTCATTTAGAAAATAGAGCTTTTAAAAATGTCCTGCCTTTTAAACGTAGATATATGCCTTCCCCACT
ACCGTAAATGTCCATTTATATCATTTTTTATATATTCTTATAAAAATGTAAAAAAGAAAAACACCGC
TTCTGCCTTTTCACTGTGTTGGAGTTTTCT**TGGAGTGAGCACTCACGC**

CLON CABZ/hP16-5. PRIMER T7

AGGGCCACAACCTGCCCCCGCCACAACCCACCCCGCTTTCGTAGTTTTTCATTTAGAAAATAGAGCTT
TAAAAATGTCCTGCCTTTTAAACGTAGATATATGCCTTCCCCACTACCGTAAATGTCCATTTATAT
CATTTTTTATATATTCTTATAAAAATGTAAAAAAGAAAAACACCGCTTCTGCCTTTTCACTGTGTTG
GAGTTTTCT**TGGAGTGAGCACTCACGC**

**PUBLICACIÓN DE LA SECUENCIA DEL INHIBIDOR p21 DE
COBAYO EN GENBANK**

p21-4 Guinea pig heart fibroblasts *Cavia porcellus* cDNA clone p21-4, mRNA sequence

GenBank: CA844388.1

IDENTIFIERS

dbEST Id: 16094314

EST name: p21-4

GenBank Acc: CA844388

GenBank gi: 26675789

CLONE INFO

Clone Id: p21-4

DNA type: cDNA

PRIMERS

PCR forward: AGCTGGCCTTGTCGCTGTCTT

PCR backward: GAAGATGGGGAAGAGGCCTCC

PolyA Tail: Unknown

SEQUENCE

```
AGCTGGCCTTGTCGCTGTCTTGCACCTCTGGTGTCTGAGCGGCCTGAAGATTCCCCGGGTG
GGCCCCGAACATCTCAGGGCCGAAAACGGAGGCAGACCAGCCTGACAGATTCTATCACT
CCAAGCGCAGATTGGTCTTCTGCAAGAGAAAACCCTGAAGTGCCACGGGAGCCCCGCC
ACTTCTGCTGTGGGTCAGGAGGCCTTCCCCATCTTC
```

Entry Created: Dec 13 2002

Last Updated: Dec 13 2002

LIBRARY

Lib Name: LIBEST_012325 Guinea pig heart fibroblasts

Organism: [Cavia porcellus](#)

Strain: Hartley

Tissue type: Heart

Cell type: fibroblasts

Develop. stage: young adult

SUBMITTER

Name: Luis A Gomez

Lab: Molecular Physiology Laboratory

Institution: National Institute of Health

Address: Av Calle 26, No. 51-60. Bogotá, D.C. Colombia

Tel: 57-1-220-7700

Fax: 57-1-222-1093

E-mail: lgomez@ins.gov.co

CITATIONS

Title: Identification of expressed genes in guinea pig involved
in
cardioprotection

Authors: **Gomez,L.A., Gunturiz,M.L., Gutierrez,L.D.**

Year: 2002

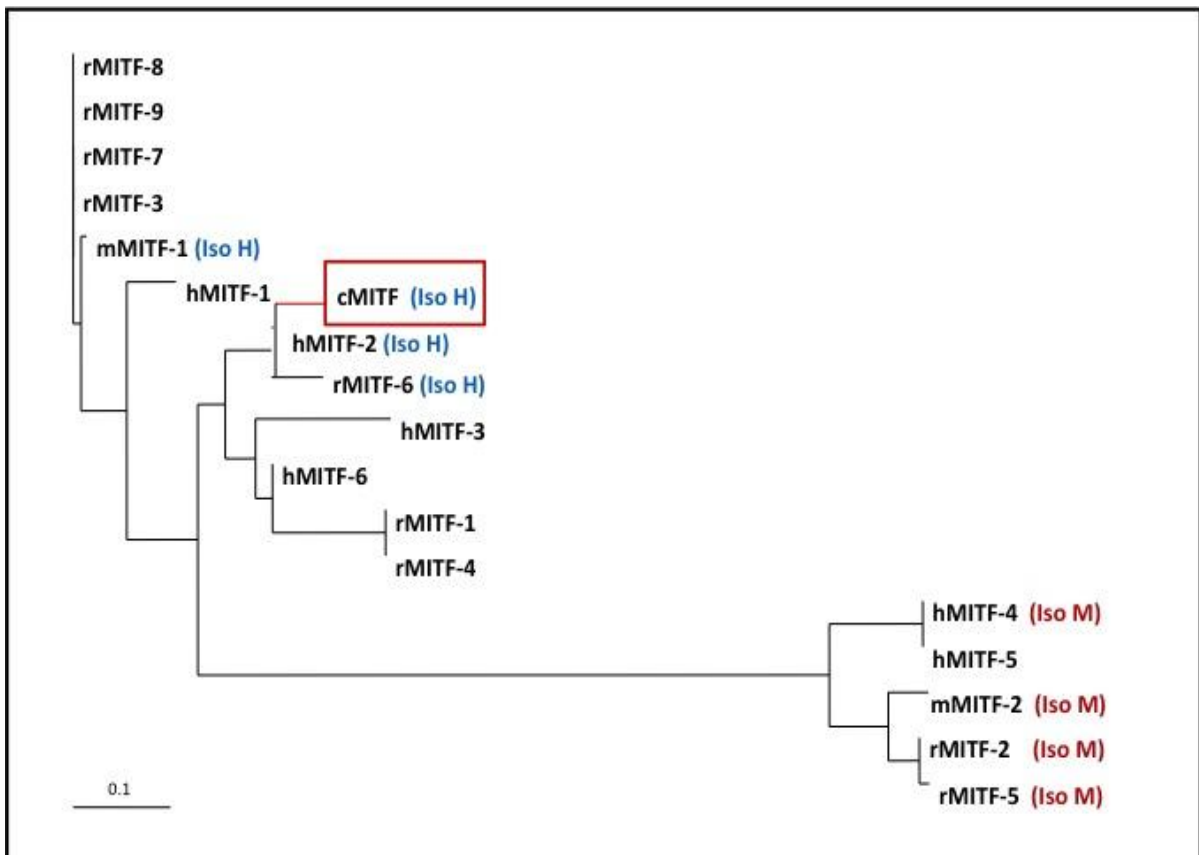
Status: Unpublished

**SECUENCIA CONSENSO PARA EL PEPTIDO NATRIUTERICO
ATRIAL NPPA**

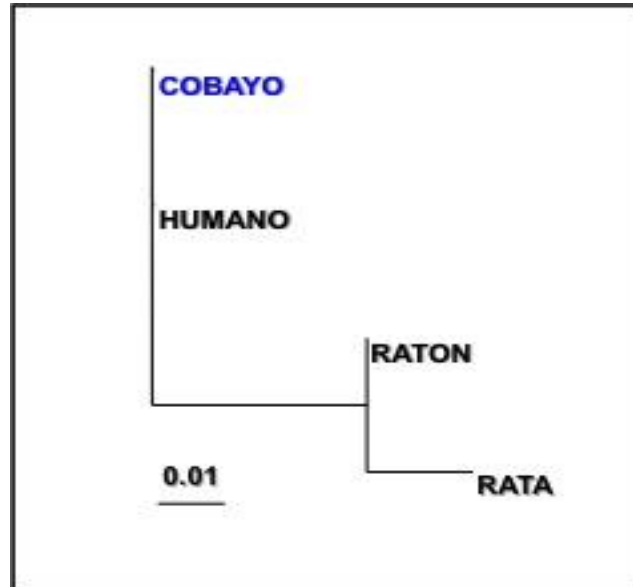
GAGGTGCCTCCCTGGACTGGGGAAGTCAACCCGTCTCAGAGAGATGGAGGTG
CTCTCGGGCGCGGCCCTGGGACCCCTCCGATAGATCTGCCCTCTTGAAAAG
CAAAGTGAAGGCTCTGCTCGCTGGCCCTCGGAGCCTGCGAAGGTCAAGCTGC
TTCGGGGGTAGGATT**GACAGGATTGGAGCCCAGAG**

B. Anexo: Árboles filogenéticos para MITF y sus diferentes genes diana

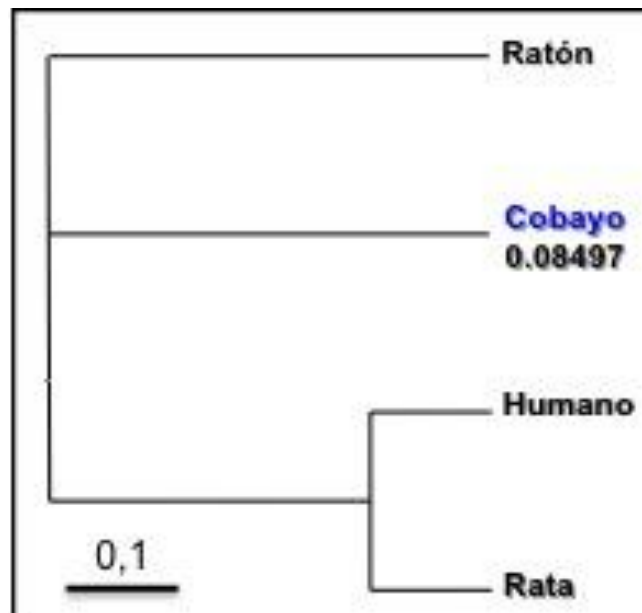
Árboles filogenéticos para MITF y sus diferentes genes diana



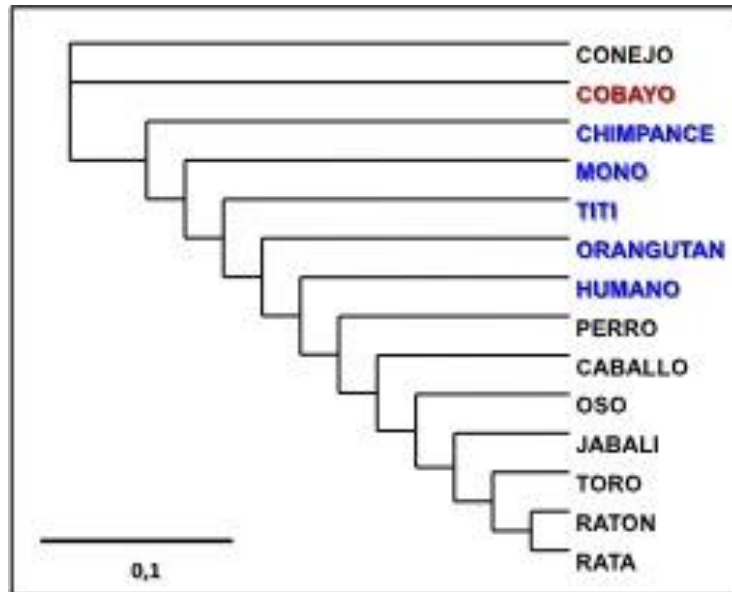
Árbol filogenético: Gen APE-1



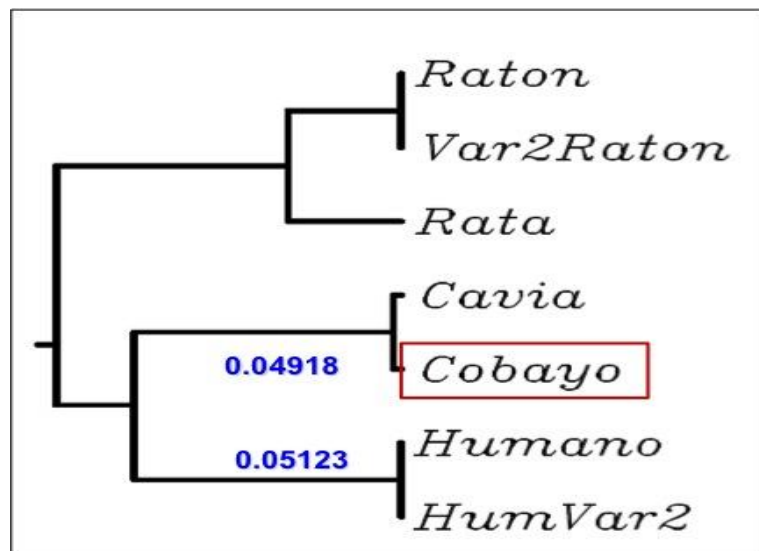
Árbol filogenético: Gen CDK2



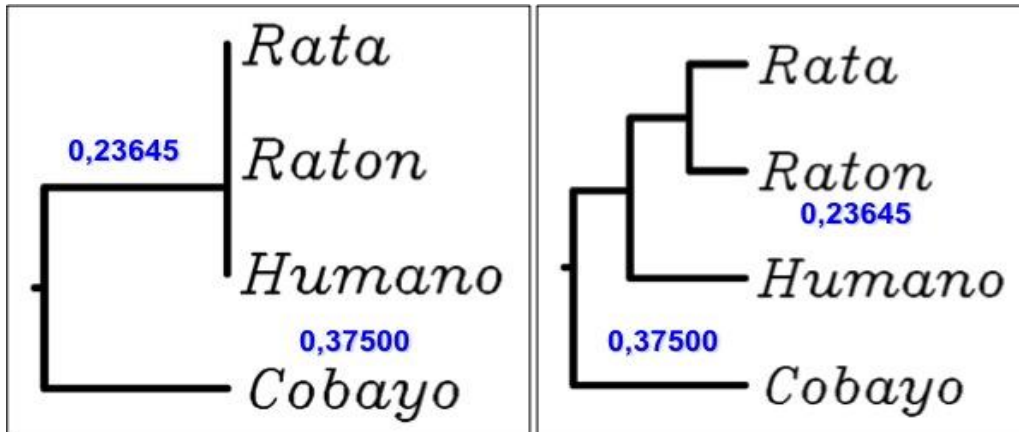
Árbol filogenético: Gen MLC4



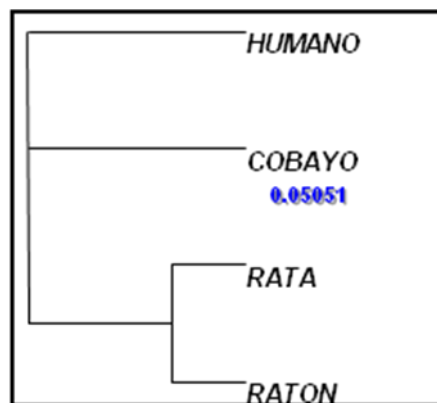
Árbol filogenético: Gen Kir 6.2



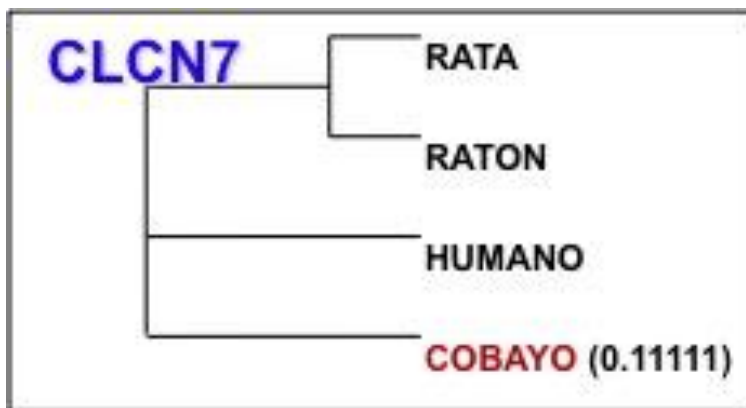
Árbol filogenético: Gen PKC-B



Árbol filogenético: Gen EDNR-B



Árbol filogenético: Gen CLCN7



C. Anexo: Presentaciones realizadas a partir de resultados parciales y finales del proyecto de tesis doctoral

1. en tejido cardiaco expuesto a isquemia experimental. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XI Encuentro Científico del INS. Noviembre 25 al 27 de 2009, Bogotá, D.C.
2. Caracterización de potenciales genes blanco regulados por el Factor de Transcripción Asociado a *Microftalmia*, *MITF*, y su posible papel en la enfermedad cardiaca isquémica. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Octubre 6 al 10 de 2010, Armenia
3. Caracterización de la cinasa-2 dependiente de ciclina (CDK2) en cardiomiocitos aislados sometidos a lesión por isquemia simulada y a protección por preconditionamiento isquémico. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XII Encuentro Científico del INS. Agosto 24 al 26 de 2011, Bogotá, D.C. **(Ganador 1er puesto al mejor trabajo presentado en modalidad oral)**
4. Expresión de los genes que regulan la síntesis de melanina: *MITF-M*, *TRP1* y *TRP2* en células de melanoma maligno B16 y A375. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XII Encuentro Científico del INS. Agosto 24 al 26 de 2011, Bogotá, D.C.
5. Expresión diferencial del gen *BCL2* en células de melanoma proliferantes y sometidas a supresión de crecimiento tumoral. Autores: María Luz Gunturiz, Hector Javier Ardila, Luis A. Gómez. Presentado durante el XII Encuentro Científico del INS. Agosto 24 al 26 de 2011, Bogotá, D.C.
6. Conferencia magistral "Caracterización del factor de transcripción asociado a *Microftalmia* y su posible papel en enfermedad cardiaca isquémica" III Seminario Nacional Y I Internacional de Avances y Actualidades en Biotecnología. Universidad Incca de Colombia. Septiembre 29 y 30 de 2011.
7. Expresión diferencial de los genes *MITF-H*, *MLC* Y *APE* en cardiomiocitos y su papel potencial en enfermedad cardiaca isquémica. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XLVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Octubre 11 al 15 de 2011, Medellín
8. Silenciamiento del factor de transcripción asociado a microftalmia en células cardiacas aisladas. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XLVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Octubre 11 al 15 de 2011, Medellín

9. Proteína Cinasa C beta y factor de transcripción asociado a microftalmia en protección cardiaca. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Octubre 9 al 13 de 2012, Cali.
10. Canales de potasio sensibles al ATP y factor de transcripción asociado a microftalmia en cardiomiocitos precondicionados por hipoxia. Autores: Luis A. Gómez, María Luz Gunturiz. Presentado durante el XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Octubre 9 al 13 de 2012, Cali.
11. Conferencia magistral: "Estrategias para la caracterización de genes". Seminario Nacional de Avances en Biotecnología. Universidad Incca de Colombia. Noviembre 9 de 2012.
12. Conferencia científica: Factores de transcripción y desarrollo cardiaco. Instituto Nacional de Salud. Abril 5 de 2013.
13. Expresión de los factores de transcripción HIF-1 α y MITF-H en células cardiacas: Posible co-regulación en protección contra la isquemia. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XIII Encuentro Científico del INS. Conocimiento, Innovación y liderazgo en Salud Pública. Septiembre 10 al 13 de 2013, Bogotá. (**Ganador 1er puesto al mejor trabajo presentado en modalidad oral**)
14. Perfil de expresión diferencial de microRNAs en cardiomiocitos adultos aislados de *Guinea pig* expuestos a isquemia simulada y a precondicionamiento isquémico. Autores: Luis A. Gómez, María Luz Gunturiz. Presentado durante el XIII Encuentro Científico del INS. Conocimiento, Innovación y liderazgo en Salud Pública. Septiembre 10 al 13 de 2013, Bogotá. (Ganador 2do puesto al mejor trabajo presentado en modalidad oral)
15. Expresión diferencial de potenciales marcadores tumorales regulados por el factor de transcripción asociado a microftalmia en líneas celulares de melanoma humano melanóticas y amelanóticas. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el XIII Encuentro Científico del INS. Conocimiento, Innovación y liderazgo en Salud Pública. Septiembre 10 al 13 de 2013, Bogotá.
16. Expresión de MAGE-A10 como posible marcador tumoral en melanoma. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 6 al 9 de Octubre de 2013, Bogotá, D.C.
17. Expresión del receptor de endotelina tipo B en células cardiacas ventriculares aisladas de *Guinea pig*. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 6 al 9 de Octubre de 2013, Bogotá, D.C.
18. Expresión diferencial del Factor de Transcripción asociado a Microftalmia en líneas celulares de melanoma melanóticas y amelanóticas. Autores: María Luz Gunturiz, Luis A. Gómez. Presentado durante el Primer Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular, 4 al 7 de junio de 2014, Bogotá, D.C.

D. Carta de aceptación de manuscrito

Biomédica
Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 34

Comité Editorial INS
Luis Alberto Gómez
Santiago Nicholls
Carlos Arturo Hernández
Enrique Ardila
María Cristina Ferro
Nancy Gore Saravia
Miguel Guzmán
Leonard Munstermann
Gustavo Román
Orlando Torres-Fernández

Instituto Nacional de Salud
Avenida calle 26 No. 51-20, Oficina B-245
Zona 6, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono (57 1) 220-7700, Ext. 1386
Fax (57 1) 220 7700, Ext. 1269
biomedica@ins.gov.co

Bogotá D.C., 28 de abril de 2014

Doctor
Luis Alberto Gómez
Grupo de Fisiología Molecular
Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica
Dirección de Investigación en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C.

Ref. Manuscrito 03 14 “Identificación y expresión diferencial del factor de transcripción asociado a microftalmia en corazón y cardiomiocitos aislados, posible papel en hipertrofia y en viabilidad”

Doctor Gómez:

De la manera más atenta, nos permitimos comunicarle que el manuscrito de la referencia fue aceptado para ser publicado en la revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud.

Cordial saludo,

Comité Editorial *Biomédica*

E. Manuscrito en revisión

Título en español:

Desarrollo cardíaco y expresión de algunos factores de transcripción

Título abreviado español:

Desarrollo cardíaco y factores de transcripción

Título en inglés:

Cardiac development and expression of some transcription factors

Autores:

María Luz Gunturiz, Luis Alberto Gómez

Afiliación institucional:

Grupo de Fisiología Molecular, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud

Correspondencia:

Luis Alberto Gómez, Grupo de Fisiología Molecular, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 2207700, extensiones 1483, 1419 y 1416

Correo electrónico: lgomez@ins.gov.co

Aportes de los autores:

María Luz Gunturiz: formulación del proyecto de investigación, diseño experimental realización de las actividades experimentales, análisis de resultados y escritura de artículo.

Luis Alberto Gómez: Dirección y formulación del proyecto de investigación, diseño experimental, análisis, discusión e interpretación de los resultados, corrección de artículo.

Resumen

La embriogénesis cardíaca es el resultado de múltiples procesos, altamente dinámicos y con alto grado de heterogeneidad en su expresión génica que se presenta en las distintas etapas del desarrollo del miocardio y en el corazón completamente formado. El objetivo de esta revisión es ilustrar los distintos patrones de expresión de algunas familias génicas de factores de transcripción que se expresan de manera específica en los diferentes estadios del corazón en formación y aportar información sobre los avances y resultados de la función y papel del Factor de transcripción asociado a microftalmia MITF obtenidos en el Grupo de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de Salud. El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la expresión específica de tejido, los factores reguladores y las interacciones que permiten la expresión dirigida a un determinado compartimiento tisular, constituye la base de aplicaciones clínicas. Dentro de las familias de genes con patrones de expresión específicos en el corazón se encuentran proteínas contráctiles, canales iónicos y factores de transcripción cuyo estudio permitirá esclarecer la asociación entre desregulación génica y la alta incidencia de enfermedades cardiovasculares. Es de mencionar que esta revisión se centró exclusivamente, en las familias de factores de transcripción que se expresan de una manera más generalizada durante cada uno de los estadios del desarrollo cardíaco y por el objetivo trazado inicialmente, no se incluyeron estudios de expresión génica a nivel de proteínas contráctiles y reguladores del metabolismo del calcio del corazón, que son tan importantes como los factores de transcripción aquí mencionados.

Palabras clave: desarrollo cardíaco, factores de transcripción, expresión génica, corazón, embriología cardíaca.

Abstract:

Cardiac embryogenesis is the result of multiple processes, highly dynamic and high degree of heterogeneity in gene expression that occurs at different stages of development of the myocardium and heart fully formed. The aim of this review is to illustrate the different patterns of expression of some gene families of transcription factors that are expressed specifically in the different stages of heart formation and provide information on the progress and results of the function and role of the factor microphthalmia associated transcription MITF obtained in the group Molecular Physiology, National Institute of Health. The understanding of the molecular mechanisms that control tissue-specific expression, regulatory factors and interactions that allow expression directed to a particular tissue compartment is the basis for clinical applications. Within families of genes with specific expression patterns in the heart are contractile proteins, ion channels and transcription factors whose study will clarify the association between gene deregulation and the high incidence of cardiovascular disease. It is worth mentioning that this review focused exclusively on families of transcription factors that are expressed in a more widespread during each of the stages of cardiac development and the initially stated objective way, no gene expression studies were included at regulators of contractile and calcium metabolism of the heart that are as important as transcription factors referenced herein proteins.

Key words: Cardiac development, transcription factors, gene expression, heart, heart embryology.

Introducción

Los diversos tipos celulares que constituyen los órganos y tejidos en cualquier organismo, difieren ampliamente y no son más que un reflejo de cambios en la expresión diferencial de sus genes, a través de mecanismos finos de regulación, en donde los factores de transcripción son determinantes en dicha modulación (Hernández et al, 2005). El gran avance en el conocimiento de la expresión específica de tejido y de los mecanismos moleculares de su regulación, ha permitido establecer, que distintos genes al igual que sus productos proteicos experimentan cambios en su distribución espacio-temporal y a nivel de expresión durante la ontogénesis; siendo estos cambios especialmente dinámicos durante el desarrollo cardíaco (Clowes C, 2014). La formación del corazón en vertebrados requiere la coordinación de varios procesos complejos que abarcan desde la diferenciación de las crestas precordíacas hasta la formación de un corazón adulto con cuatro cámaras y sus correspondientes válvulas (Franco *et al*, 2002).

Una de las formas más importantes de control de la expresión génica es la regulación transcripcional y dentro de ésta, los factores de transcripción son los que se encargan de llevarla a cabo de forma preferente. Los factores de transcripción son proteínas de localización nuclear que se unen a secuencias específicas de DNA y que modulan la expresión de los genes blanco, participando en la regulación de la transcripción del ADN, reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores o directamente a la ARN polimerasa y que al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes (Egido J *et al*, 2000).

De acuerdo con su estructura, se han definido diferentes familias de factores de transcripción:

1. Dedos de zinc (*Zinc fingers*): son estructuras de unión a DNA cuya estructura primaria consiste de un átomo de zinc unido a residuos de cisteínas e histidinas distantes, con una secuencia intermedia descrita como una asa (loop). Las proteínas de éste tipo usualmente están organizadas en series de 9 dominios repetidos que contienen 30 aminoácidos plegados en una unidad estructural simple alrededor de un átomo de zinc al que se unen las cisteínas e histidinas en número variable, dando lugar a la familia cys-cys-his-his (2 cisteínas y 2 histidinas), a la familia cys-cys-cys-cys (4 cisteínas), y a la familia cys-cys-his-cys (2 cisteínas y 1 histidina) (Pabo, 1992, Acosta-Viana *et al*, 1996). Otros factores de transcripción que presentan conformación de dedos de zinc son las proteínas GATA, importantes en el desarrollo cardíaco normal (Crossley *et al*, 1995, Yang F, 2014) y la proteína MAZ que juega un papel muy importante en el control de la expresión genética de la glicoproteína de superficie celular CD4 (Duncan *et al*, 1995; Acosta-Viana *et al*, 1996).
2. Cierre o cremallera de leucina (*leucine zipper* o *ZIP*): son un grupo de proteínas que contienen una cremallera de leucina como motivo estructural común con una zona de aminoácidos básicos que la precede al dominio con la que se unen a secuencias de reconocimiento específicas del ADN en forma de dímeros, en zonas próximas a los promotores y regiones activadoras o potenciadoras (*enhancer*) de los genes. Se cree que, junto a otros factores, contribuyen a la eficiencia con la cual la RNA polimerasa se une al promotor e inicia la transcripción. En general, todas estas proteínas son activadores de la transcripción de manera constitutiva o regulable a través de

modificación post-traducciona (normalmente por fosforilación) en respuesta a estímulos externos. Muchos factores b-Zip se expresan de forma específica en diferentes tipos celulares o de forma regulada en función de los patrones de desarrollo, y contribuyen a la diferenciación de tejidos (Fisher *et al*, 1992; Muhle-Goll *et al*, 1995; Acosta-Viana *et al*, 1996).

3. Hélice-asa-hélice (*helix-loop-helix* o *HLH*): al igual que en los cierres de leucina esta clase estructural tiene una región básica que hace contacto con el DNA y tiene una región dimerizada de dos hélices alfa (Pabo, 1992). Las familias cierres de leucina y hélice-asa-hélice tienen una subfamilia de dominios que se conocen con el nombre de cierres de leucina básicos (bZIP) y los hélice-asa-hélice básicos (bHLH) (Muhle-Goll *et al*, 1995), que se caracterizan por la presencia de un dominio HLH y ZIP básico adyacente (Fisher *et al*, 1992). Estos factores de transcripción regulan la expresión genética mediante su unión específica como dímeros a sitios simétricos del DNA (Johnson *et al*, 1994; Acosta-Viana *et al*, 1996). El dominio básico de estas proteínas controla la unión a la secuencia de DNA consenso CANNTG conocida como caja E (*E-box*) que esta presente en las regiones regulatorias de algunos genes tejido-específicos. Las proteínas bHLH pueden ser clasificadas en tres clases: Clase A, proteínas generalmente expresadas (E12, E47, E2-2); clase B, proteínas tejido-específicas (MyoD, myogenin, MRF4); clase C, proteínas con la característica de arreglo en tándem de los motivos bHLH y bZIP (c-Myc, Max, USF, AP4, TFE3 y TFEB) (Olson *et al*, 1993; Acosta-Viana *et al*, 1996). El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) pertenece a esta última clase.
4. Homeodominios (homeobox): secuencias de ADN que forman parte de genes implicados en la regulación del desarrollo (morfogénesis) de los animales. Los genes que tiene un homeobox se llaman genes homeóticos que forman la familia de genes HOM/ HOX que codifican proteínas que actúan como factores de transcripción de otros genes que dirigen el desarrollo de los distintos segmentos corporales e indican qué clase de estructuras deben desarrollar teniendo una función relevante en las decisiones que controlan la diferenciación celular y los patrones de formación. Los homeodominios han divergido mucho a lo largo de la evolución en los eucariotas, pero todos ellos contienen residuos altamente conservados que podrían ser necesarios para la unión al ADN (Wilson *et al*, 2002).

Muy relacionados a los genes homeobox, se encuentran los factores de transcripción de la familia T-box, implicados en el desarrollo de las extremidades y del corazón, son necesarios tanto para decisiones de linaje celular tempranas, tales como la formación del plan corporal básico de los vertebrados, como para decisiones tardías, como la diferenciación y organogénesis. Las proteínas de la caja T tienen un tamaño de 50 a 78 kDa, que se unen a una región del DNA cuya secuencia consenso es 5'-TCACACCT-3'; tienen una función tanto represora como activadora y su actividad reguladora se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína. Al ser mutados, los genes T-box (o caja T) producen fenotipos extremos tanto en el ratón como en el pez cebra. Se ha demostrado su implicación en la formación de las extremidades, y en enfermedades genéticas humanas como los síndromes de *DiGeorge*, *Holt-Oram*, *ulnar-mammario*, deficiencia ACTH y paladar hendido/anquiloglosia (Jerome *et al*, 2001; Lamolet *et al*, 2001; Braybrook *et al*, 2001; Marcano *et al*, 2004). Los factores T-box son expresados en un amplio rango de patrones durante la embriogénesis jugando papeles críticos durante muchos procesos de desarrollo. El requerimiento de los factores Tbx en el desarrollo del corazón está

soportado mediante estudios mutacionales que generan defectos cardiacos en ratones que pierden genes T-box individuales incluyendo Tbx5, Tbx1, Tbx3 and Tbx6 (Bruneau *et al*, 2001, Chapman *et al*, 2003, Hoogaars *et al*, 2004). Además, la sobreexpresión a nivel cardiaco de genes T-box adicionales como Tbx2, Tbx18 y Tbx20 sugieren un importante papel de estos genes en la cardiogénesis (Papaioannou, 2001; Ryan *et al*, 2003). En humanos y en algunos otros animales, defectos en la expresión génica del gen TBX5 pueden conducir a defectos en los pulgares y el septo ventricular, lo que da lugar a que no se produzca una correcta separación entre el ventrículo izquierdo y derecho del corazón (Wilson V, 2002).

Desarrollo cardiaco y expresión génica

El conocimiento detallado de las regiones promotoras de los genes, esenciales para la transcripción, y de los diferentes factores de transcripción implicados en la activación del promotor constituye, un primer paso para el conocimiento de los mecanismos de regulación génica.

El desarrollo cardiaco normal es dependiente de la actividad regulada de numerosos factores de transcripción, incluyendo aquellos de las familias de dedos de zinc, homeodominio, T-box, bHLH, bZip y MADS (Cripps y Olson, 2002; Stennard F *et al*, 2003, Petersen *et al*, 2005). Esos factores interactúan y colaboran para crear un circuito regulatorio de *feedback* positivo que controla las múltiples contribuciones de linaje al corazón, así como las respuestas a influencias inductivas intrínsecas y extrínsecas que establecen patrones y guían la morfogénesis.

Durante el desarrollo embrionario (Figura 1), el corazón pasa de ser una estructura tubular sencilla a convertirse en un órgano multicameral con un alto grado de complejidad; proceso que requiere la diferenciación y el crecimiento de distintas estructuras embrionarias. Durante la cardiogénesis se pueden distinguir 6 fases prototípicas: en el primer estadio (figura 1A), las células destinadas a la formación del tubo cardiaco se disponen simétricamente en dos crestas, las crestas precardiacas, donde reciben señales del ectodermo y del endodermo para configurarse en futuros cardiomiocitos (Schultheiss *et al*, 1997; Shi *et al*, 2000, Verzi *et al*, 2005); luego, en el segundo estadio, las crestas cardiacas se unen en la línea media embrionaria dando lugar al tubo cardiaco inicial (figura 1B); en este estadio, el corazón está formado únicamente por dos capas celulares, miocardio y endocardio, separadas por una matriz acelular llamada gelatina cardiaca (Franco *et al*, 2002). En el tercer estadio (figura 1C), el tubo cardiaco sufre una torsión hacia la derecha constituyendo así el primer signo morfológico de asimetría corporal durante el desarrollo embrionario; dicha torsión termina con la formación de un corazón embrionario en el cual se empiezan a distinguir diferentes regiones miocárdicas (tracto de entrada, el atrio embrionario, el canal atrioventricular, el ventrículo embrionario y el tracto de salida), dando origen al cuarto estadio (Moorman *et al*, 1994; Franco *et al*, 2002). (Figura1D). En cada una de estas regiones miocárdicas se presenta un patrón de expresión diferencial, así como características funcionales distintas; el tracto de entrada, el canal atrioventricular y el tracto de salida presentan en su superficie interior cojines endocárdicos, mientras que las cámaras atriales y ventriculares están trabeculadas y carecen de estructuras mesenquimáticas (Moorman *et al*, 1994; De Jong *et al*, 1997; Franco *et al*, 1998).

En el estadio fetal, estas 5 estructuras son tabicadas para obtener un corazón con doble circuito, sistémico (sangre oxigenada) y pulmonar (sangre venosa); la septación del ventrículo primitivo genera los ventrículos derecho e izquierdo, mediante el crecimiento del septo interventricular; por su parte el atrio primitivo se divide en derecho e izquierdo, mediante la formación del complejo de los septos interatriales primario y secundario, constituyendo así el quinto estadio (figura 1E); luego, se produce una reestructuración de las distintas regiones embrionarias para dar lugar, en el corazón adulto, a dos cámaras atriales y dos ventriculares, todas con un tracto de entrada y de salida propios. Cuando la separación de las cuatro cámaras se completa (estadio sexto) se conforma el corazón adulto, (Webb *et al*, 1996, Franco *et al*, 1998 y 2002).

Expresión génica durante el desarrollo cardíaco:

Genes Homeóticos (Genes *Homeobox* o genes T-box)

Varias familias de factores de transcripción presentan expresión de alguno de sus miembros en estadios tan tempranos como en el promiocardio; entre estas familias están los genes homeóticos, GATA, bHLH, bZip y MEF2. Dentro de estos, la expresión de *Nkx2.5* es homogénea a lo largo de las crestas precardiáticas (Figura 2A) (Lints *et al*, 1993). Por su parte, el factor de transcripción *Pitx2* se expresa en la cresta precardiaca izquierda, pero no en la derecha, configurándose así como el primer signo de asimetría molecular durante el desarrollo cardíaco (Wang J, 2014). Bruneau *et al* en el 2000, describieron un nuevo factor homeótico, *Irx4*, que tiene una expresión restringida a la región anterior de las crestas y estos autores han postulado que las células que expresan *Irx4* constituyen, a esta temprana edad, el primordio del miocardio ventricular (Franco *et al*, 2002).

Varios miembros de la familia de factores de transcripción GATA se expresan en las crestas precardiáticas y desempeñan un papel primordial en la especificación miocárdica. Expresión de GATA4, GATA5 y GATA6 es observada desde los estadios más tempranos de la formación miocárdica presentando distribución homogénea a lo largo de las crestas precardiáticas (Zhao *et al*, 2008), y al menos GATA4 es imprescindible en los primeros estadios de gestación ya que su ausencia ocasiona la formación de cardia bífida (Heikinheimo *et al*, 1994; Molkentin *et al*, 1997; Kuo *et al*, 1997; Koutsourakis *et al*, 1999). Esta distribución induce a pensar que los factores GATA actúan como cofactores en la especificación miocárdica pero no en la adquisición de heterogeneidad celular (Morrissey *et al*, 1996 y 1997; Durocher *et al*, 1997; Franco *et al* 2002) (Figura 2A).

En los primeros estadios del desarrollo cardíaco, uno de los componentes de la familia de factores de transcripción MEF (*myocyte enhancer factor*), MEF2C, se expresa en las crestas precardiáticas de forma homogénea (Lin *et al*, 1997) (Figura 2A).

A nivel de tubo cardíaco inicial, *Pitx2* en este estadio mantiene la regionalización en su patrón de expresión; y solo se evidencia su expresión en el margen izquierdo del tubo cardíaco (Campione *et al*, 1999 y 2001, Wang J, 2014) ((Figura 2B). Por otro lado, el factor *Irx4* presenta un patrón de expresión restringido al futuro miocardio ventricular (Bruneau *et al*, 2000). La primera evidencia de regionalización en el eje dorsoventral se origina con la expresión del factor de transcripción eHAND en el tubo cardíaco inicial, este factor muestra una mayor expresión en la región ventral del tubo cardíaco que en la dorsal (Wagh V, 2014). Christoffels *et al*, en el 2000, postularon que dicha expresión constituye la primera

evidencia molecular del miocardio ventricular trabeculado, implicando, que el ventrículo se especifica a lo largo del eje dorsoventral y no como clásicamente se ha establecido en el eje anteroposterior (Franco *et al* 2002). Por otro lado, los genes HRT mantienen la regionalización anteroposterior (craneocaudal) en el tubo cardíaco inicial que ya presentaban en estadios anteriores; HRT1 se expresa en la región caudal mientras que HRT2 lo hace en la región cefálica (Franco *et al* 1998 y 2002; Shi *et al* 2000) (Figura 2B).

En asa cardíaca (Figura 2C), *Pitx2*, presenta un patrón de expresión característico durante la torsión cardíaca; el movimiento hacia la derecha del futuro ventrículo embrionario permite el desplazamiento del patrón de expresión de *Pitx2* desde una posición izquierda hasta una posición ventral en esta región cardíaca; sin embargo, la expresión de *Pitx2* se mantiene exclusivamente en las regiones izquierdas de los extremos del tubo cardíaco (Campione *et al*, 2001, Wang J, 2014). Asimismo, el factor de transcripción eHAND, que en el estadio de tubo cardíaco inicial se localiza principalmente en la región ventral, muestra un desplazamiento de su expresión hacia la zona prospectiva de diferenciación del ventrículo embrionario con la torsión (Wagh V, 2014). Factores de transcripción, como GATA5 y GATA6, presentan expresión preferencial en los extremos del tubo cardíaco desapareciendo gradualmente de las regiones más mediales localizándose básicamente en los polos arterial y venoso; lo que permite inferir que estos factores cumplen un papel importante en la especificación miocárdica, pero no son necesarios para el mantenimiento del fenotipo muscular cardíaco (Morrissey *et al*, 1997; Franco *et al*, 2002).

En corazón embrionario (Figura 2D), *Irx4*, mantiene su expresión restringida al miocardio ventricular; sin embargo, se expresa en forma decreciente hacia el tracto de salida y el canal atrioventricular, mientras *Tbx5* presenta un patrón de expresión limitado al ventrículo izquierdo, el canal atrioventricular, el atrio (derecho e izquierdo) y el tracto de entrada del corazón embrionario (Bruneau *et al*, 1999 y 2001, Mori *et al*, 2006). *Tbx5* en el septo interventricular está localizado principalmente en la región izquierda, lo que permite asegurar que el septo interventricular tiene componentes derecho e izquierdo distintos. *Tbx2*, otro miembro de la familia T-box, inicia su expresión de forma clara en el canal atrioventricular y tracto de entrada en este estadio (Hatcher *et al*, 2001), este factor de transcripción ejerce una función inhibitoria de la expresión en otros tejidos, y parece ser que su función durante la cardiogénesis está relacionada con la inhibición del programa de expresión génica característica del miocardio de trabajo (tanto auricular como ventricular) en el canal atrioventricular y en el tracto de salida. Por su parte, *Pitx2* incrementa en este estadio el patrón de expresión que se distinguía de forma inicial en el estadio de asa cardíaca expresándose en la región ventral del ventrículo, pero no en la dorsal, mientras que su expresión en el tracto de entrada, el atrio, el canal atrioventricular y el tracto de salida está restringida a la porción izquierda, observaciones que sugieren que los primordios ventriculares obtienen una contribución semejante de las crestas cardíacas derecha e izquierda (Wang J, 2014), existiendo una relocalización de las contribuciones derecha e izquierda respecto al eje embrionario derecha/izquierda que afecta solamente a los ventrículos. En este estadio tres miembros de la familia *Iroquois* se expresan en el miocardio, *Irx1* e *Irx2*, que se expresan exclusivamente en la cresta del septo interventricular desde el inicio de su formación (Christoffels *et al*, 2000; Campione *et al* 2001), distribución que relaciona a estos factores de transcripción con la formación y/o especificación del sistema de conducción ventricular, aunque no existen evidencias directas. El tercer factor *Irx3*, presenta una expresión restringida al miocardio de trabajo (auricular y ventricular) ((Figura 2D).

Factores de transcripción bHLH

La familia de factores de transcripción bHLH (*basic helix-loop-helix*) incluye, por ejemplo, a numerosos factores de transcripción específicos de musculatura estriada. Dentro de ellos, MyoD, Myf5 y Mrf-4 cumplen un papel importante en la regulación de la expresión en la musculatura esquelética, pero ninguno de ellos se expresa en el miocardio en condiciones normales (Buckingham, 2001). En los últimos años, se han descubierto dos nuevos miembros de la familia bHLH (dHAND y eHAND) que se expresan en el corazón embrionario y desempeñan un papel importante en la morfogénesis cardíaca; en los primeros estadios del desarrollo dHAND y eHAND se expresan de forma homogénea, aunque posteriormente se expresan de forma asimétrica en las cámaras ventriculares (Srivastava *et al*, 1997, Wagh V, 2014) (Figura 2A).

Distintos miembros de la familia de los factores de transcripción relacionados con el gen *hairy* (*hairy-related transcription factors*; HRT) presentan una regionalización en el eje anteroposterior incluso en estadios tan tempranos como en las crestas precardiáticas (Figura 2A), expresándose HRT1 en la región más posterior, mientras que HRT2 lo hace en la región más anterior; ya que el sistema Notch-Delta regula la expresión de *hairy* y desempeña un papel fundamental en el establecimiento de barreras celulares y tisulares en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*, MacGrew *et al*, 1998; Griffin *et al*, 2000), Nakagawa *et al* (1999) han postulado que los HRT pueden tener una función semejante en el corazón, por ejemplo, delimitando las regiones atriales y ventriculares, aunque actualmente no existen datos experimentales que refuercen dicha hipótesis (High *et al*, 2008).

Aunque la función de los factores de transcripción *Tbx-5*, SRF (*serum response factor*), CARP (*cardiac ankyrin repeat protein*), pCMF1, *Midori*, c-CLP-1 y *Mesp1* (Saga *et al* 1996 y 1999; Wei *et al*, 1996; Ghatpande *et al*, 1999; Franco *et al* 2002) en general es desconocida, se sabe que se expresan en las crestas precardiáticas de manera homogénea. SRF y *Tbx5* parecen actuar como cofactores junto con otros factores de transcripción (GATA4 y *Nkx2.5*) (Zhao *et al*, 2008) (Figura 2A-D).

A nivel de corazón adulto, la expresión de estos factores de transcripción presenta patrones muy similares a los descritos para el corazón fetal, sin embargo, la expresión de proteínas contráctiles y de aquellas que regulan el metabolismo del calcio, si pueden mostrar patrones de expresión mejor diferenciados. En resumen, durante el desarrollo del corazón existe una regionalización de la expresión de algunos factores de transcripción, que aporta nuevas evidencias sobre la complejidad de la cardiogénesis.

Específicamente para el Factor de transcripción asociado a microftalmia, no existen evidencias experimentales suficientes para asignar un papel de MITF en la regulación, en la cardiogénesis y en la fisiología cardíaca y no se conoce su función en la patogénesis de la enfermedad cardiaca isquémica, por tanto, en el Grupo de Fisiología Molecular, hemos evaluado la expresión de este factor en corazón y cardiomiocitos de cobayo. De igual forma, describimos los efectos sobre el tamaño cardíaco asociados con la interferencia génica de MITF y determinamos cambios relativos de su expresión en cardiomiocitos aislados sometidos a condiciones de pérdida y protección de la viabilidad por isquemia y preacondicionamiento isquémico (Figura 3). En un artículo reciente (Gunturiz M, Gómez LA, 2014, en prensa) mostramos la amplificación e identificación del exón 1 de la isoforma de MITF-H en corazón y cardiomiocitos aislados de cobayo y cambios morfológicos

cardiacos asociados con el *knockdown* inducido por RNA interferente específico de MITF. Demostramos que la isoforma H de MITF de corazón y células cardiacas aisladas de cobayo es diferente a las reportadas para humano, rata y ratón, siendo en el momento del envío al GenBank la primera secuencia parcial para este gen reportada para *Guinea pig* (Número de acceso al GenBank: JF_309109.1). Por otro lado, presentamos evidencia experimental que muestra que la disminución relativa de la expresión de MITF inducida por un RNA interferente específico en el corazón de cobayos durante un periodo de 30 días, se asoció con una diferencia aparente en los niveles de expresión relativa del transcrito de MITF y de su proteína, con lo cual sugerimos que en corazón, la regulación de MITF es mayor a nivel post-transcripcional que post-traducciona (Figura 3). Además, pudimos establecer que estos cambios se asocian con incremento en el peso de los animales, en el diámetro de las fibras cardiacas y en una reducción relativa del número de las mismas, lo que sugiere que MITF podría estar involucrado en la regulación o modulación del crecimiento cardíaco y especialmente en hipertrofia cardíaca (Gunturiz M, Gómez LA, 2014, en prensa). Otro de los hallazgos reportados por nosotros es que la expresión del mRNA de MITF-H en células sometidas a lesión por isquemia simulada disminuye con respecto al grupo de células sometidas a protección por pre-acondicionamiento isquémico (número), indicando que MITF puede estar implicado en la regulación de la viabilidad en respuesta a la isquemia inducida experimentalmente, lo que nos permite inferir que en el caso del cobayo (*Cavia porcellus*) empleado por nosotros, la hipertrofia se pudiera presentar y asociar a una respuesta adaptativa alterada como consecuencia de la pérdida del número de cardiomiocitos y de la masa contráctil del miocardio, mientras que en el caso de la hipertrofia cardíaca en el modelo ratón ésta podría estar asociada a una respuesta adaptativa alterada a la presión arterial inducida. Con los resultados obtenidos podemos sugerir que MITF-H se expresa en ventrículo izquierdo y aurículas y que su expresión es diferencial en condiciones patológicas vs corazones sanos, por tanto sugerimos que la expresión y actividad de esta isoforma puede ser importante en la regulación de la supervivencia de las células cardiacas, en la respuesta al estrés por isquemia y a condiciones asociadas con hipertrofia cardíaca, ya sea por regulación específica de la isoforma H o por la regulación de genes blancos de MITF-H involucrados en estas alteraciones cardiovasculares (artículo en revisión; Gunturiz ML, Gómez LA).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Esta investigación fue financiada con recursos propios del Instituto Nacional de Salud.

Figura 1. Fig. 2. Representación esquemática de los diversos estadios en el desarrollo cardiaco. (A) Estadio de crestas cardíacas; (B) estadio de tubo cardíaco lineal; (C) estadio asa cardíaca; Nótese que en los estadios embrionario (D) y fetal (E) ya es posible identificar los ventrículos, aurículas y estructuras que permiten el funcionamiento adecuado en el corazón adulto.

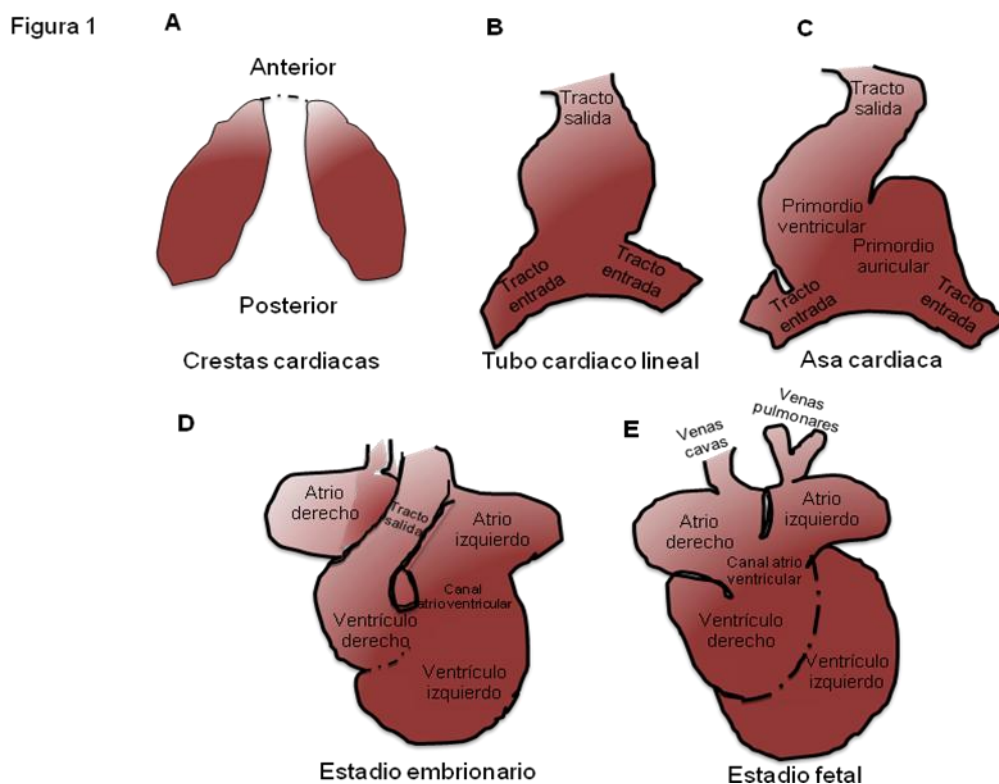


Figura 2. Representación de la expresión de diferentes factores de transcripción en estadios cardiacos. (A). Estadio de crestas cardiacas. Nótese que hay regionalización en la expresión de algunos factores de transcripción en este estadio (Irx4, HTR 1 y 2). (B) Estadio de tubo cardiaco lineal. (C) Estadio de asas cardiacas. Nótese la redistribución de diferentes factores cardiacos con la torsión que sufre el corazón en este estadio. (D) Estadio embrionario. Se muestra la expresión diferencial de diferentes familias y miembros de factores de transcripción, incluyendo el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) estudiado en el Grupo de Fisiología Molecular y que se expresa a nivel de ventrículo izquierdo. (E) Estadio fetal. Se presentan la mayoría de factores de transcripción expresados en este estadio y que se mantienen en el corazón adulto. Nótese que en todos los estadios se observan genes distribuidos homogéneamente.

Figura 2

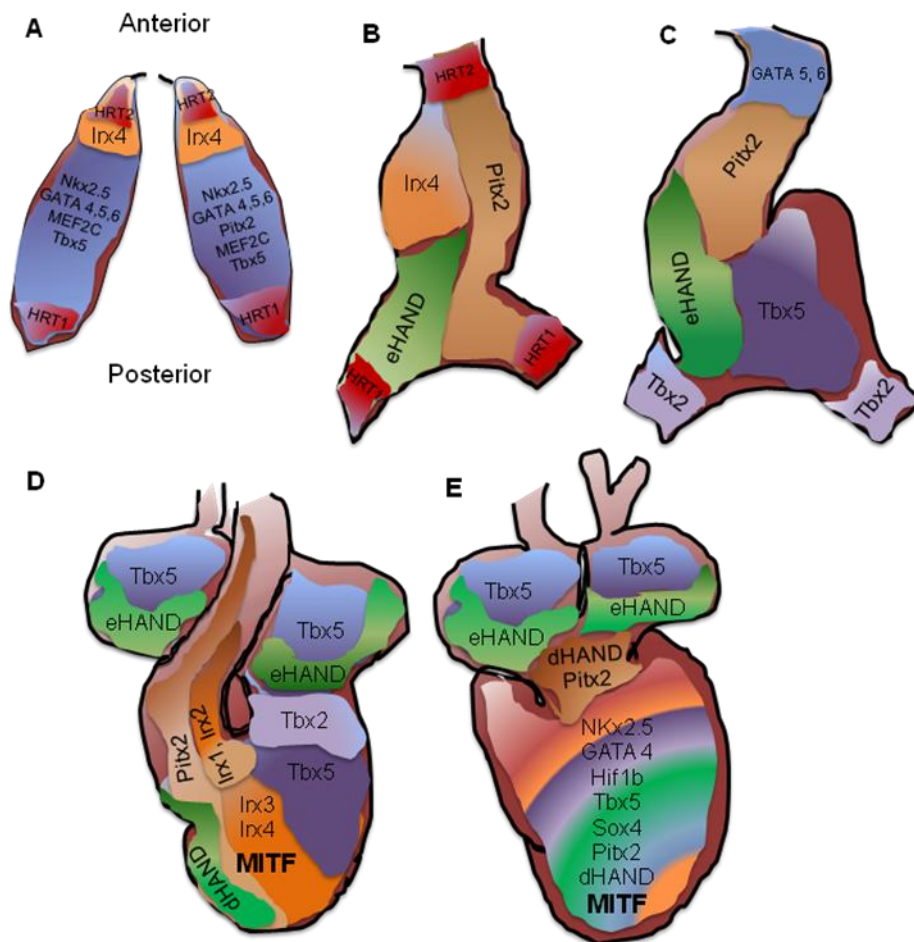
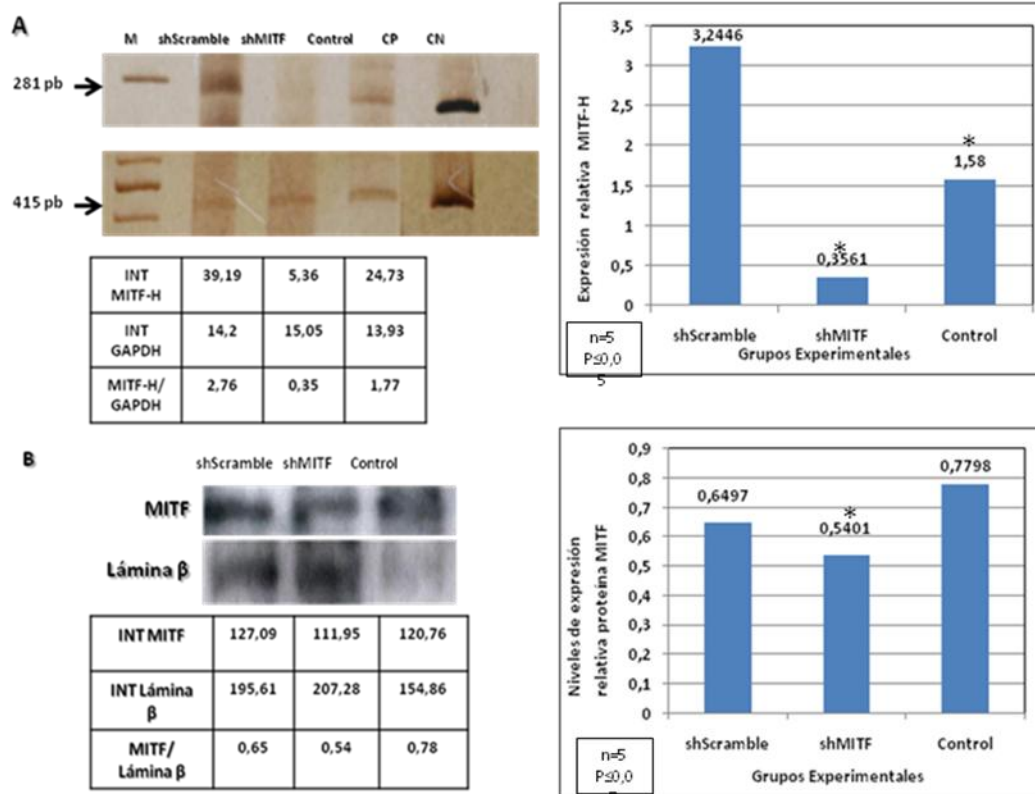


Figura 3. Expresión de la isoforma MITF-H en corazón a nivel de mRNA y proteína. (A) Geles de poliacrilamida mostrando los productos de amplificación para los transcritos de la isoforma MITF-H (arriba) y GAPDH (abajo). CP representa los controles positivos para ambos genes y CN los controles negativos de la PCR. A la izquierda arriba se muestra la representación gráfica de la expresión relativa de MITF-H en corazones transfectados con ARN pequeño control (shScramble), con un interferente específico de MITF (shMITF) y de un control sin interferir. (Control). (B) Expresión relativa de la proteína MITF en corazón (arriba) y lámina β (abajo). En la tabla se presentan los valores del promedio de intensidad para cada proteína y la relación entre las proteínas MITF y Lámina β . A la izquierda bajo se muestra la representación gráfica de la expresión relativa de MITF en corazones transfectados con los diferentes siARN. (n=3; p>0,05).

Figura 3



6. Bibliografía

cardiovascular disease in high-risk individuals in low-income and middle-income countries: health effects and costs. *Lancet*. 2007;370:2054–62. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61699-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61699-7)

Gómez LA. Enfermedades cardiovasculares: un problema de salud pública y un reto global. *Biomedica* 2011;31:469-73. <http://dx.doi:10.1590/S0120-41572011000400001>

Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J*. 2001; 65:353-8. <http://dx.doi.org/10.1253/jcj.65.353>

Alekseev AE, Gomez LA, Aleksandrova LA, Brady PA, Terzic A. Opening of cardiac sarcolemmal KATP channels by dinitrophenol separate from metabolic inhibition. *J Membr Biol* 1997; 157:203-14.

Imokawa G, Yada Y, Mitsutoshi K. Signaling mechanisms of endothelin induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J*. 1996;314:305-12.

Díez J, López B, González A, Ardanaz N, Fortuño MA. Respuestas del miocardio al estrés biomecánico. *Rev Esp Cardiol*. 2001;54:507-15

Cooper G 4th. Cardiocyte cytoskeleton in hypertrophied myocardium. *Heart Failure Rev*. 2000;5:187-201.

Arnheiter H. The discovery of the microphthalmia locus and its gene, Mitf. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23:729-35. <http://dx.doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00759.x>.

Bharti K, Debbache J, Wang X, Arnheiter H. The basic-helix-loop-helix-leucine zipper gene Mitf: analysis of alternative promoter choice and splicing. *Methods Mol Biol*. 2010;647:237-50. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-738-9>

Udono T, Yasumoto K, Takeda K, Amae S, Watanabe K, Saito H, et al. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1491:205-19. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00051-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00051-8)

Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*. 2003;22:3035-41. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206443>

Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the Microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*. 2004;38:365-411.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092717>

Steingrímsson E. All for one, one for all: alternative promoters and Mitf. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21:412-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00473.x>.

Shibahara S, Takeda K, Yasumoto K, Udono T, Watanabe K, Saito H, et al. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2001;6:99-104. Review. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00010.x>

Hallsson JH, Favor J, Hodgkinson C, Glaser T, Lamoreux ML, Magnúsdóttir R, et al. Genomic, transcriptional and mutational analysis of the mouse microphthalmia locus. *Genetics.* 2000;155:291-300.

Saito H, Takeda K, Yasumoto K, Ohtani H, Watanabe K, Takahashi K, et al. Germ cell-specific expression of microphthalmia-associated transcription factor mRNA in mouse testis. *J Biochem.* 2003;134:143-50. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvg122>

Kumasaka M, Sato H, Sato S, Yajima I, Yamamoto H. Isolation and developmental expression of Mitf in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.*2004;230:107-13. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.20019>

Tsuchida S, Takizawa T, Abe K, Okamoto M, Tagawa M. Identification of microphthalmia-associated transcription factor isoforms in dogs. *Vet J.* 2009;182:283-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.004>

Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:11077-83. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111696200>

Shibahara S, Yasumoto K, Amae S, Udono T, Watanabe K, Saito H, et al. Regulation of pigment cell-specific gene expression by MITF. *Pigment Cell Res.* 2000;13:98-102. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.18.x>

Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey D, et al. MicroRNA-137 Targets Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Melanoma Cell Lines. *Cancer Res.* 2008;68:1362–8. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2912>

Goswami S, Tarapore RS, Teslaa JJ, Grinblat Y, Setaluri V, Spiegelman VS. MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor mRNA is inhibited by the coding region determinant-binding protein. *J Biol Chem.* 2010;285:20532-40. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.109298>

Murakami M, Iwata Y, Funaba M. Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. *Mol Cell Biochem.* 2007;303:251-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-007-9474-x>

Shahlaee AH, Brandal S, Lee YN, Jie C, Takemoto CM. Distinct and shared transcriptomes are regulated by microphthalmia-associated transcription factor isoforms in mast cells. *J Immunol.* 2007;178:378-88.

Fuse N, Yasumoto K, Takeda K, Amae S, Yoshizawa M, Udono T, et al. Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J Biochem.* 1999;126:1043-51.

Hershey CL, Fisher DE. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene.* 2005;347:73-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.002>

Bismuth K, Maric D, Arnheiter H. MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms. *Pigment Cell Res.* 2005;18:349-59. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00249.x>

Kuiper RP, Schepens M, Thijssen J, Schoenmakers EF, van Kessel AG. Regulation of the MiTF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:2315-22. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh571>

Mansky KC, Sulzbacher S, Purdom G, Nelsen L, Hume DA, Rehli M, et al. The microphthalmia transcription factor and the related helix-loop-helix zipper factors TFE-3 and TFE-C collaborate to activate the tartrate-resistant acid phosphatase promoter. *J Leukoc Biol.* 2002;71:304-10.

McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* 2002;109:707-18. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00762-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00762-6)

Loercher AE, Tank E, Delston R, William J. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol.* 2005;168:35–40. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200410115>

Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galiber MD, et al. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21^{Cip1} expression to regulate cell cycle progression. *Nature.* 2005;433:764-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03269>

Sestáková B, Ondrusová L, Vachtenheim J. Cell cycle inhibitor p21/ WAF1/ CIP1 as a cofactor of MITF expression in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23:238-51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00670.x>

Du J, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Ross K, Huber WE, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell.* 2004;6:565-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2004.10.014>

Lekmine F, Chang CK, Sethakorn N, Das Gupta T, Salti GI. Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:830-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.075>

Bertolotto C, Bille K, Ortonne J, Ballotti R. Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol.* 1996;134:747-55.

Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet.* 1994;8:251-5. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1194-251>

Brenner L, Burke K, Leduc CA, Guha S, Guo J, Chung WK. Novel splice mutation in microphthalmia-associated transcription factor in Waardenburg Syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011;15:525-9. <http://dx.doi.org/10.1089/gtmb.2010.0277>

Léger S, Balguerie X, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Cabot A, Amstutz-Montadert I, et al. Novel and recurrent non-truncating mutations of the MITF basic domain: genotypic and phenotypic variations in Waardenburg and Tietz syndromes. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:584-7. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2011.234>.

Tshori S, Gilon D, Beeri R, Nechushtan H, Kaluzhny D, Pikarsky E, et al. Transcription factor MITF regulates cardiac growth and hypertrophy. *J Clin Invest.* 2006;116:2673-81. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI27643>

Tshori S, Sonnenblick A, Yannay-Cohen N, Kay G, Nechushtan H, Razin E. Microphthalmia transcription factor isoforms in mast cells and the heart. *Molecular Cell Biol.* 2007;27:3911-9. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01455-06>

Shizukuda Y, Buttrick PM. Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiology.* 2002;34:823-31. <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.2002.2020>

Muntz KH, Zhao M, Miller JC. Downregulation of myocardial beta-adrenergic receptors. Receptor subtype selectivity. *Circ Res.* 1994;74:369-75. Review. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.74.3.369>

Cooke L, Muntz KH. Differences in beta adrenergic receptor agonist affinity between cardiac myocytes and coronary arterioles in canine heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;269:351-7.

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Research.* 1998; 40:426-32. Review. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00244-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00244-2)

Devic E, Xiang Y, Gould D, Kobilka B. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* 2001; 60:577-83.

Shizukuda Y, Reyland ME, Buttrick PM. Protein kinase C-delta modulates apoptosis induced by hyperglycemia in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiology.* 2002; 282:H162534. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00783.2001>

Bernstein D, Fajardo G, Zhao M, Urashima T, Powers J, Berry G, et al. Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by beta-adrenergic receptor subtypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289:H2441-9. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00005.2005>.

Gomez LA, Alekseev AE, Aleksandrova LA, Brady PA, Terzic A. Use of the MTT assay in adult ventricular cardiomyocytes to assess viability: effects of adenosine and potassium on cellular survival. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1255-66.

Gómez LA, Gómez G, Fajardo G. Procesamiento y análisis de imágenes como herramienta para medir la actividad MTT reductasa en cardiomiocitos ventriculares aislados. Uso de imágenes para evaluar en tiempo real la viabilidad de células cardiacas. En: 75 maneras de generar

conocimiento en Colombia 1995-2005. Casos seleccionados por los programas nacionales de Ciencia, Tecnología e Innovación. Bogotá, D.C.: COLCIENCIAS: 2006.P.26-27.

Marber MS. Ischemic preconditioning in isolated cells. *Circ Res*;86:926-31. Review

Liu F, Song YK, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 1999; 6:1258-66.

Gómez LA. Avances científicos y tecnológicos. Genoma humano y salud pública. Cap. 37. En: Salud pública-perspectivas. Segunda edición. Bogotá, D.C.: Editorial Médica Panamericana: 2011.p.615-30.

Gómez LA. Premios nobel en Fisiología o Medicina y Química, año 2006. Una nueva dimensión del ARN en la regulación de la expresión. *Biomédica* 2006;26:475-84.

Gómez LA. Preacondicionamiento isquémico en cardiomiocitos ventriculares aislados. Identificación y expresión de algunos miRNA asociados. *Rev Acad Colomb Cienc* 2013; 37. En prensa.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med.* 2006;84:901-10. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>

Gao Z, Xu H, DiSilvestre D, Halperin V, Tunin R, Tian Y, et al. Transcriptomic profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2006;40:76-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.20>

Wang Y, Huang S, Sah YP, Ross J, Brown JH, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen - activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998; 273: 2161-8.

Nanda J, Kolodgie FD, Virmani R. Apoptosis and cardiomyopathy. *Current Opinion in Cardiology* 2000; 15: 183-188.

Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of Apoptosis in Dilated Cardiomyopathy. *Herz.* 1999; 24: 219-24.

Saraste A, Pukki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997; 95: 320-3.

James TN. Normal and Abnormal consequences of apoptosis in the human heart: from postnatal morphology to arrhythmogenesis. *Circulation* 1994; 90: 556-73.

Ing DJ, Zang J, et al. Modulation on cytokine - induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl - x. *Circ. Res* 1999; 84:21-33.

Sawa Y, Bai HZ, Suzuki K. Overexpression of Bcl-2 gene improves the myocardial tolerance of ischemia - reperfusion by preventing DNA fragmentation, *Circulation*. 1995; 92 (suppl 8): 1526.

Yamauchi A, Kawabe J, Kabara M, Matsuki M, Asanome A, Aonuma T, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 maintains adhesion of endothelial progenitor cells and reduces neointima formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 15;305H1158-67.

Liu Y, Nie H, Zhang K, Ma D, Yang G, Zheng Z, et al. A feedback regulatory loop between HIF-1 α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2014;588:3137-46.

Hua LL, Vedantham V, Barnes RM, Hu J, Robinson AS, Bressan M, et al. Specification of the mouse cardiac conduction system in the absence of Endothelin signaling. *Dev Biol*. 2014;393:245-54. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.07.008.

Welsh IC, O'Brien TP. Loss of late primitive streak mesoderm and interruption of left-right morphogenesis in the *Ednrb(s-1Acr)* mutant mouse. *Dev Biol*. 2000;225:151-68.

Kornak U, Kasper D, Bösl MR, et al. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 2001;104:205–5. [http://dx.doi: 10.1016/S0092-8674\(01\)00206-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00206-9).

Tane S, Ikenishi A, Okayama H, Iwamoto N, Nakayama KI, Takeuchi T. CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;17:443:1105-9.

Liem DA, Zhao P, Angelis E, Chan SS, Zhang J, Wang G, et al. Cyclin-dependent kinase 2 signaling regulates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:610-6.

Chen ZC, Cheng YZ, Chen LJ, Cheng KC, Li Y, Cheng J. Increase of ATP sensitive potassium (K(ATP)) channels in the heart of type-1 diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:8. doi: 10.1186/1475-2840-11-8.

Alekseev AE, Gomez LA, Aleksandrova LA, Brady PA, Terzic A. Opening of cardiac sarcolemmal KATP channels by dinitrophenol separate from metabolic inhibition. *J Membr Biol* 1997; 157:203-14.

Gross GJ, Yao Z, Auchampach JA. KATP Channels, Adenosine Receptors and Ischemic Preconditioning. *Developments in Cardiovascular Medicine*. 1996;181:459-67.

Gross GJ, Fryer RM. Mitochondrial K_{ATP} Channels: Triggers or Distal Effectors of Ischemic or Pharmacological Preconditioning?. *Circ Res*. 2000;87:431-3. doi: 10.1161/01.RES.87.6.431.

Liu X, Qi F, Wu W. Effect of intervention in the diacylglycerol-protein kinase C signaling pathway on JNK1 expression and its downstream signaling in diabetic cardiomyopathy. *Mol Med Rep*. 2014;9:979-84. doi: 10.3892/mmr.2014.1904.

Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem* 1999, 274: 6272 – 9.

Fan HC, Fernández-Hernando C, Lai JH. Protein kinase C isoforms in atherosclerosis: pro- or anti-inflammatory?. *Biochem Pharmacol*. 2014;88:139-49. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.006.

- Acosta-Viana KY, Zavala-Castro JE.** Proteínas de unión a DNA. *Rev Biomed.* 1996;7:163-72.
- Braybrook C, Doudney K, Marcano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA.** The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet.* 2001;29:179–83. <http://dx.doi:10.1038/ng730>
- Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, et al.** Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2.5* and *dHAND*. *Dev Biol.* 2000; 217:266-77. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1999.9548>
- Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, et al.** Chamber-specific cardiac expression of *Tbx5* and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol.* 1999; 211:100-8. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1999.9298>
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Robitaille L, Caron S, Conner DA, et al.** A murine model of Holt-Oram Syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001;106:709-21. [http://dx.doi:10.1016/S0092-8674\(01\)00493-7](http://dx.doi:10.1016/S0092-8674(01)00493-7)
- Buckingham M.** Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11:440-8. [http://dx.doi:10.1016/S0959-437X\(00\)00215-X](http://dx.doi:10.1016/S0959-437X(00)00215-X)
- Christoffels VM, Habets PEMH, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH et al.** Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 2000; 223:266-78. <http://dx.doi:10.1006/dbio.2000.9753>
- Cripps RM, Olson E.** Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev Biol.* 2002; 246:14-28. <http://dx.doi:10.1006/dbio.2002.0666>
- Crossley M, Merika M, and Orkin S.** Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol.* 1995;15:244-56.
- De Jong F, Viragh SZ, Moorman AFM.** Cardiac Development: a morphologically integrated molecular approach. *Cardiol Young.* 1997;7:131-46.
- Duncan DD, Stupakoff A, Hedrick SM, Marcu KB, Siu G.** A Myc-associated zinc finger protein binding site is one of four important functional regions in the CD4 promoter. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:3179-86.
- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz R, Nemer M.** The cardiac transcription factors *Nkx2.5* and *GATA-4* are mutual cofactors. *EMBO J* 1997, 16:5687-96. <http://dx.doi:10.1093/emboj/16.18.5687>
- Egido J, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Blancocolio LM, Ortego M, Suzuki Y, et al.** El factor de transcripción kB (NF-kB) y las enfermedades cardiovasculares. *Cardiovasc risk factors.* 2000;9:92-103.
- Fisher DE, Parent LA, Sharp PA.** Myc/Max and other helix-loop-helix/leucine zipper proteins bend DNA toward the minor groove. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:11779-83.

Franco D, Lamers WH, Moorman AFM. Patterns of gene expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 25-53. [http://dx.doi:10.1016/S0008-6363\(97\)00321-0](http://dx.doi:10.1016/S0008-6363(97)00321-0)

Franco D, Domínguez J, De Castro MP, Aránega A. Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. *Rev Esp Cardiol.* 2002; 55:167-84.

Ghatpande S, Goswami S, Mathew S, Rong G, Cai L, Shafiq S, et al. Identification of a novel cardiac lineage-associated protein(cCLP-1): A candidate regulator of cardiogenesis. *Dev Biol.* 1999;208:210-21. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1998.9180>

Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, Alexiou M, Garvey N, Silver LM. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev.* 1996; 56: 93–101.

Griffin KJP, Stoller J, Gibson M, Chen S, Yelon D, Stainier DYR, Kimelman D. A conserved role for H15-related T-box transcription factors in zebrafish and *Drosophila* heart formation. *Dev Biol.* 2000;218:235–47. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1999.9571>

Hatcher CJ, Kim MS, Goldstein MM, Wong B, Mikawa T, Basson CT. TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis. *Dev Biol.* 2001;230:177-88. <http://dx.doi:10.1006/dbio.2000.0134>

Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol.* 1994;164:361-73. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1994.1206>

Hernández S, Rojas del Castillo E. El papel del factor de transcripción NF- κ B en la célula cardíaca. *Arch Cardiol Méx.* 2005;75 (3).

High FA, Lu MM, Pear WS, Loomes KM, Kaestner KH, Esstein JA. Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:1955-9. <http://dx.doi:10.1073/pnas.0709663105>

Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet.* 2001;27:286–91. <http://dx.doi:10.1038/85845>

Johnson NP, Lindstrom J, Baase WA von Hippel PH. Double-stranded DNA templates can induce α -helical conformation in peptides containing lysine and alanine: Functional implications for leucine zipper and helix-loop helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:4840-44.

Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development.* 1999;126:723-32.

Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 1997;11:1048-60. <http://dx.doi:10.1101/gad.11.8.1048>

Lamolet AM, Pulichino T, Lamonerie Y, Gauthier T, Brue A, Drouin J. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*. 2001;104:849–59. [http://dx.doi:10.1016/S0092-8674\(01\)00282-3](http://dx.doi:10.1016/S0092-8674(01)00282-3)

Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 1997; 276:1404-7. <http://dx.doi:10.1126/science.276.5317.1404>

Marcano ACB, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM, et al. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet*. 2004;41:68-74. <http://dx.doi:10.1136/jmg.2003.010868>

McGrew MJ, Pourquie O. Somitogenesis: segmenting a vertebrate. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8:487-93. [http://dx.doi:10.1016/S0959-437X\(98\)80122-6](http://dx.doi:10.1016/S0959-437X(98)80122-6)

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 1997;11:1061-72. <http://dx.doi:10.1101/gad.11.8.1061>

Moorman AFM, Lamers WH. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med* 1994, 4:257-64. [http://dx.doi:10.1016/1050-1738\(94\)90029-9](http://dx.doi:10.1016/1050-1738(94)90029-9)

Moorman AFM, Schumacher CA, de Boer PAJ, Hagoort J, Bezstarosti K, van den Hoff MJB, et al. Presence of functional sarcoplasmic reticulum in the developing heart and its confinement to chamber myocardium. *Dev Biol*. 2000; 223:279-90. <http://dx.doi:10.1006/dbio.2000.9752>

Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 1993; 119:419-31.

Moorman AFM, Vermeulen JML, Koban MU, Schwartz K, Lamers WH, Boheler KR. Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. *Circ Res*. 1995;76:616-25. <http://dx.doi:10.1161/01.RES.76.4.616>

Mori AD, Zhu Y, Vahora I, Nieman B, Koshiba-Takeuchi K, Davidson L, et al. Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev Biol* 2006, 566-86. <http://dx.doi:10.1016/j.ydbio.2006.05.023>

Morrisey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS. GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol*. 1996; 77:309-22. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1996.0165>

Morrisey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS. GATA-5: A transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol*. 1997;183:21-36. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1996.8485>

Muhle-Goll C, Nilges M, Paastore A. The leucine zippers of the HLH-LZ proteins Max and c-Myc preferentially form heterodimers. *Biochemistry*. 1995;34:13554-64.

- Nakagawa O, Nakagawa M, Richardson JA, Olson EN, Srivastava D.** HRT1, HRT2 and HTR3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic and pharyngeal arch segments. *Dev Biol.* 1999;216:72-84. <http://dx.doi:10.1006/dbio.1999.9454>
- Olson EN.** Regulation of muscle transcription by the MyoD family. The heart of the matter. *Cir Res.* 1993;72:1-6. <http://dx.doi:10.1161/01.RES.72.1.1>
- Pabo CO.** Transcription factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:1053-95. <http://dx.doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.005201>
- Papaioannou VE.** T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol.* 2001;207:1-70.
- Pedersen JK, Nelson SB, Jorgensen MC, Henseleit KD, Fujitani Y, Wright CVE, et al.** Endodermal expression of Nkx6 genes depends differentially on Pdx1. *Dev Biol.* 2005;28:487-501. <http://dx.doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.001>
- Ryan K, Chin AJ.** T-box genes and cardiac development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today.* 2003;69:25-37. <http://dx.doi:10.1002/bdrc.10001>
- Saga Y, Hata N, Kobayashi S, Magnuson T, Seldin MF, Taketo MM.** MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development.* 1996;122:2769-78.
- Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T.** MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development.* 1999;126:3437-47.
- Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S.** BMP signalling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol.* 2000;224:226-37. <http://dx.doi:10.1006/dbio.2000.9802>
- Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN.** Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet.* 1997;16:154-60. <http://dx.doi:10.1038/ng0697-154>
- Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJP, Lai D, et al.** Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4 and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol.* 2003; 262:206-24. [http://dx.doi:10.1016/S0012-1606\(03\)00385-3](http://dx.doi:10.1016/S0012-1606(03)00385-3)
- Wei Y, Bader D, Litvin J.** Identification of a novel cardiac-specific transcript critical for cardiac myocyte differentiation. *Development.* 1996;122:2779-89.
- Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR.** CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2.5 homeobox gene pathway. *Development.* 1997;124:793-804.
- Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, Dodou E, Black BL.** The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol.* 2005; 134-45. <http://dx.doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.041>

Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Dev Biol.* 2008; 317:614-9. <http://dx.doi:10.1016/j.ydbio.2008.03.013>

Gunturiz ML, Gómez LA. Identificación y expresión diferencial del factor de transcripción asociado a Microftalmia en corazón y cardiomiocitos aislados, posible papel en hipertrofia y en viabilidad. *Biomédica.* 2014;34:387-402.

Wang J, Bai Y, Li N, Ye W, Zhang M, Greene SB, et al. Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; pii: 201405411. <http://dx.doi:10.1073/pnas.1405411111>

Wagh V, Pomorski A, Wilschut KJ, Piombo S, Bernstein HS. MicroRNA-363 negatively regulates the left ventricular determining transcription factor HAND1 in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5:75. <http://dx.doi:10.1186/scrt464>

Yang F, Zhou L, Wang Q, You X, Li Y, Zhao Y, et al. NEXN inhibits GATA4 and leads to atrial septal defects in mice and humans. *Cardiovasc Res.* 2014. <http://dx.doi:10.1093/cvr/cvu134>

Clowes C, Boylan MG, Ridge LA, Barnes E, Wright JA, Hentges KE. The functional diversity of essential genes required for mammalian cardiac development. *Genesis.* 2014. <http://dx.doi:10.1002/dvg.22794>

Wilson V, Conlon FL. The T-box family. *Genome Biol.* 2002; 3:reviews3008.1-7. <http://dx.doi:10.1186/gb-2002-3-6-reviews3008>