



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS

Y AGROPECUARIAS

EVALUACION GENICA Y ACTIVIDAD
TRANSCRIPCIONAL DE HIF-1ALFA y PPARGAMMA
EN VENTRICULO IZQUIERDO DE RATA
DURANTE EL EMBARAZO Y POSPARTO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO BIOLOGO CLINICO

PRESENTA

José Arquimides Godoy Lugo

NAVOJOA, SONORA

23 DE MAYO DEL 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de José Arquímedes Godoy Lugo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.




Dr. José Gpe. Soñanez Organiz

Presidente del Jurado



Dr. Jesús A. Rosas Rodriguez

Secretario



Dra. Gloria Yepiz Plascencia

Vocal

M.C. Sarai Limón Miranda

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Primero, a Deus por permitirme finalizar esta magnus opus con la cual termina un de las más importantes etapas de mi carrera.

A mi familia, mi más sincero agradecimiento pues siempre estuvo ayudándome durante toda mi vida, en especial mi madre por todo lo que hizo por mí.

A mi tutor, el Sr. Dr. José Guadalupe Soñanez Organis, quien siempre estuvo dispuesto a ayudarme y por sus obras de bona fide para enseñarme todo lo que necesitaba saber para realizar este trabajo y más.

Al Sr. Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez que, al igual que mi tutor, siempre tuvo una buena voluntad para socorrerme e impulsarme durante mi trabajo en el laboratorio.

Además, tomo esta oportunidad para agradecer a mi apreciada alma mater, a mis valiosos maestros y todo el personal que trabaja arduamente, día a día y sin descanso para hacer de este un mundo mejor.

Ergo, al University of California Institute for Mexico and the United States y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (UC MEXUS-CONACYT, donativo CN-14-79), al CONACYT (donativo INFR-2013-01-205799) y al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI), por proveer el capital que permitió realizar los experimentos de laboratorio.

Y no menos importante, a mis amigos, compañeros de laboratorio, a aquellas personas con las que trabajé y et alii, que me enseñaron como ser humano.

Índice	
ANTECEDENTES	8
Regulación de la Expresión Génica	8
Regulación Transcripcional	9
Factor Inducido por Hipoxia	10
Receptor Activado-Proliferador de Peroxisoma	11
Hipertrofia Cardíaca	12
Reprogramación Metabólica	13
Regulación transcripcional de la reprogramación metabólica	14
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Manejo de Animales y Colección de Muestras	18
Extracción de RNA Total, Digestión de DNA Genómico y Síntesis de DNA Complementario	19
Diseño de oligonucleótidos	20
Evaluación génica de HIF-1 α y PPAR γ	23
Extracción y Cuantificación de Proteínas Nucleares	24
Ensayo de unión al DNA de HIF-1 α y PPAR γ	25
Análisis Estadístico	26
Resultados y discusión	27
Integridad y Pureza del RNA Total	27
Amplificación y Curvas Estándar de HIF-1 α y PPAR γ	28
Niveles de Expresión Génica	33

Actividad Transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ	34
CONCLUSIÓN.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Engrosamiento de la pared miocárdica durante la hipertrofia	13
2.	Representación esquemática de la reprogramación del metabolismo	15
3.	Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos para HIF-1 α , PPAR γ y α -actina.	21
4.	Representación de la configuración de placa para ensayo de unión al DNA	26
5.	Análisis de la integridad del RNA total extraído de ventrículo izquierdo.	27
6.	Productos de PCR obtenidos a partir de cDNA de ventrículo izquierdo utilizados para realizar las curvas de calibración	28
7.	Diagramas de temperaturas de disociación	29
8.	Curvas estándar utilizadas para la cuantificación del mRNA para HIF1 α , PPAR γ y α -actina	32
9.	Expresión relativa de los niveles de mRNA de HIF-1 α y PPAR γ	33
10.	Ensayo de unión a DNA para HIF-1 α y PPAR γ	35

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Características de los oligonucleótidos utilizados para cada gen	20

INTRODUCCIÓN

El factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción formado por una subunidad α (HIF-1 α) regulada por oxígeno y otra subunidad β (HIF-1 β) que se expresa constitutivamente (Wang y Semenza, 1995). La actividad funcional de HIF-1 está regulada por la subunidad HIF-1 α (Huang y col., 1998). HIF-1 tiene un papel importante en la adaptación celular a bajas concentraciones de oxígeno induciendo genes involucrados en el metabolismo celular (Semenza y col., 1994). Por otro lado, el receptor activado-proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ) pertenece a la familia de receptores nucleares que forman heterodímeros con diferentes moléculas. PPAR γ se une al Receptor X retinoide α (RXR α) formando un complejo heterodimérico que induce la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (Braissant y col., 1996), y la biosíntesis y almacenamiento de triacilglicérols (Spiegelman, 1998).

La hipertrofia cardíaca se caracteriza por el engrosamiento de la pared ventricular del corazón y una reducción en la capacidad de contracción para realizar el bombeo sanguíneo (Chung y Leinwand, 2014) y puede clasificarse en hipertrofia fisiológica o patológica (Chung y Leinwand, 2014). La hipertrofia patológica es ocasionada por un aumento en la presión de sangre y es la respuesta del miocardio a algunas enfermedades (e.g. hipertensión arterial, infartos de miocardio o producto de mutaciones genéticas) (Iemitsu y col., 2001; Rohilla y col., 2012; Sagara y col., 2012). Por otro lado, la hipertrofia fisiológica se caracteriza por una sobrecarga en el volumen de sangre, y está presente en respuestas fisiológicas adaptativas que son reversibles (i.e. entrenamiento físico o embarazo) (Eghbali y col., 2005; Shephard, 1996; Willenheimer y col., 1998).

Estudios previos en humanos reportan un incremento en la expresión de HIF-1 α y PPAR γ durante hipertrofia patológica, en las que hay un aumento en los mediadores clave de glucólisis y anabolismo de lípidos, generando cambios en el metabolismo normal del corazón (Krishnan y col., 2009). Además, durante el ejercicio en ratones con HIF-1 α silenciado se observaron descensos en el flujo glucolítico (Egan y Zierath, 2012). Por otro lado, en condiciones de ejercicio extremo se observó mayor actividad en el núcleo del

coactivador de PPAR gamma 1 alfa (PGC-1 α) el cual activa a PPAR γ para la inducción de genes diana (Egan y Zierath 2012). Datos obtenidos en nuestro grupo de trabajo demuestran un aumento en la expresión de genes involucrados en el metabolismo glucolítico y lipídico (Hernández-Palomares, 2015), además de cambios en la actividad enzimática, concentración de sustratos e intermediarios metabólicos relacionados con las rutas antes mencionadas (datos no publicados) durante el embarazo en ventrículo izquierdo de rata. Sin embargo, se desconoce la expresión génica y actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ durante hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por embarazo, y su proceso reversible el posparto.

ANTECEDENTES

Regulación de la Expresión Génica

La regulación de la expresión génica son los mecanismos por los cuales una célula aumenta o disminuye la expresión específica de uno o más genes. Ésta regulación puede ocurrir en diferentes etapas de la transcripción y traducción génica (i.e. apertura de la cromatina, iniciación de la transcripción y elongación, procesamiento del transcrito, transporte del mRNA del núcleo a citoplasma, traducción del transcrito, degradación del mRNA) (Krebs y col., 2014). Por otro lado, la modificación química por acetilación o metilación de histonas, reacomodo de nucleosomas, RNA regulador y factores transcripcionales son los principales mecanismos que regulan la expresión génica en células eucariotas. La regulación transcripcional, a base de factores transcripcionales, es uno de los mecanismos más importantes que regulan la expresión génica (Krebs y col., 2013).

Regulación Transcripcional

La regulación transcripcional es mediada por proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA llamados elementos de respuesta, y son capaces de estimular o inhibir la expresión de uno o más genes determinados. Los factores de transcripción son proteínas que en conjunto con otras moléculas (e.g. cofactores, otros factores transcripcionales, receptores nucleares) y la RNA polimerasa, participan en la regulación de la transcripción (Ptashne y Gann, 1997). Los factores de transcripción tienen dominios importantes para su función, entre los que destacan los siguientes: 1) dominios de unión a DNA (DBD); 2) dominio de trans-activación (TAD); y 3) dominios de interacción DNA/proteína (PAS). Los factores de transcripción se clasifican de acuerdo a la manera en la que se unen al DNA (i.e. dedos de zinc, receptores de esteroides, cremalleras de leucina, hélice-lazo-hélice, hélice-vuelta-hélice), y una de sus características principales es que pueden encontrar su DNA diana aun cuando la cromatina está compacta (Krebs y col., 2014).

Los genes que codifican para las enzimas que participan en el metabolismo celular están bajo un alto grado de control transcripcional vía factores de transcripción (Cairns y col., 2011; Kozhevnikova y col., 2012; Liang y col., 2013; Ward y Thompson, 2012) entre los que destacan, el receptor activado-proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ) y el factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α) (Janani y Ranjitha Kumari, 2015; Krishnan y col., 2009; Lund y col., 2016; Marion-Letellier y col., 2015; Ochiai y col., 2011; Xu y col., 2016; Zhuonan y col., 2015). Los PPARs son miembros de una superfamilia de receptores nucleares activados por ligando que regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos (Kaur y Tappia, 2009; Michalik y col., 2006). Por otro lado, HIF pertenece a la familia de factores de transcripción que contiene los dominios conservados de hélice-vuelta-hélice (bHLH) y PAS (Yang y col., 2005), y está involucrado en la regulación de genes codificantes para enzimas glucolíticas (Krishnan y col., 2009; Lopaschuk y col., 2010).

Factor Inducido por Hipoxia. HIF está formado por una subunidad α (HIF α) regulada por oxígeno y una subunidad β (HIF β) que se expresa constitutivamente (Wang y Semenza, 1995). HIF α tiene dominios conservados de PAS, involucrados en la interacción proteínica y unión a ligandos pequeños (p300/CBP, [CREB (cAMP-response element binding protein)-binding protein]), y dominio bHLH, a cargo de la oligomerización y unión al DNA en el extremo N-terminal. Contiene también un dominio dependiente de oxígeno (ODD) que tiene un papel importante regulando la estabilidad de HIF α ; otras regiones son las dos TAD, las cuales contiene sitios de unión para otras proteínas, como los correguladores transcripcionales CBP y p300; además de dos secuencias de localización nuclear (NLS), que ayudan a HIF α a translocarse al núcleo. Entre las regiones TAD se encuentra el dominio ODD involucrado en la regulación de HIF α en condiciones de normoxia (Huang y col., 1998; Wang y col., 1995).

En humano y elefante marino se han identificado 3 isoformas de HIF α nombradas HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α (Gu y col., 1998; Hogenesch y col., 1997; Semenza y Wang, 1992; Sonanez-Organis y col., 2013). HIF-1 α es igualmente expresada en todos los tejidos, mientras que HIF-2 α , que comparte un 48% de identidad estructural con HIF-1 α , es expresado principalmente en pulmón, endotelio y arteria carótida (Ema y col., 1997; Flamme y col., 1997; Semenza y Wang, 1992; Tian y col., 1998). HIF-3 α se expresa en diferentes tejidos (e.g. timo, pulmón, cerebro, corazón y riñón), no cuenta con un dominio TAD, pero comparte un 57% de identidad estructural con HIF-1 α y 53% con HIF-2 α en su región N-terminal (Gu y col., 1998).

En cuanto a la función, se conoce que HIF-2 α está relacionada con la regulación homeostática de catecolamina, control del ritmo cardiaco, protección ante daño cardiaco, entre otros (Kay y Millar, 1995; Tian y col., 1998). Por otro lado, HIF-3 α es conocida como la responsable de la regulación negativa de las HIF-1 α y HIF-2 α (Drevytska y col., 2012; Hara y col., 2001; Heidbreder y col., 2003). Mientras que HIF-1 α regula cientos de genes relacionados con metabolismo, angiogénesis, supervivencia ante estrés, entre otros (Semenza y col., 1994) e induce la expresión de múltiples genes clave de la ruta glucolítica [i.e. hexocinasa (HK), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), piruvato cinasa (PK), fosfofructocinasa (PFK)] (Semenza y Wang, 1992).

La actividad de HIF está regulada por la subunidad α la cual, durante condiciones de normoxia es hidroxilada por proli hidroxilasas específicas. Lo anterior permite la unión de HIF α a la proteína de von Hippel Lindau (pVHL) para su degradación vía el sistema ubiquitina-proteosoma (Formenti y col., 2010; Huang y col., 1998). En contraste, durante condiciones de bajo oxígeno (hipoxia) el grado de hidroxilación de HIF α se reduce, impidiendo la unión a la pVHL y dando como resultado la estabilización y translocación de HIF α al núcleo, donde se dimeriza con HIF β para realizar su función (Formenti y col., 2010; Wu y col., 2013). Una vez en el núcleo, HIF se une a la secuencia consenso 5'-ACGTG-3' llamada elemento de respuesta a hipoxia (HRE), presente en cada uno de sus genes diana (Wenger y Gassmann, 1997), mediante la interacción y ayuda de sus dominios bHLH (Wang y col., 1995; Wang y Semenza, 1995) y PAS (Marmorstein y Simon, 2015), respectivamente.

Receptor activada-proliferador de peraxisamas. Los PPAR son parte de la familia de receptores nucleares que estimulan la expresión de genes mediante la unión a un activador (e.g. receptor X retinoide), para luego unirse al DNA en la secuencia de respuesta a PPAR (PPRE) 5'-AGGTCA-3' (para PPARy), formando el conjunto PPAR:PPRE (Rodríguez y col., 1994). Se ha demostrado que los PPAR regulan genes relacionados con metabolismo lipídico, diferenciación celular, tumorigénesis, entre otros (Belfiore y col., 2009; Krishnan y col., 2009; Zoete y col., 2007).

En humanos, se han caracterizado 3 isoformas de PPARs: alfa (PPAR α), beta/delta (PPAR β/δ), y gamma (PPARy), que tienen distintos patrones de expresión, que sugieren importantes diferencias funcionales. PPAR α es expresado principalmente en tejidos que metabolizan grandes cantidades de ácidos grasos, como el corazón, hígado, riñón y músculo. Además, PPAR α induce genes relacionados con la regulación metabólica, autofagia, proliferación hemolítica, etc. (Jung y Kullak-Ublick, 2002; H. Y. Lee y col., 2015; J. M. Lee y col., 2014). Por otro lado, PPAR β/δ induce genes relacionados con proliferación peroxisomal, formación de tumores, inflamación, etc. (Harman y col., 2004; C. H. Lee y col., 2003; Park y col., 2001). La expresión de PPARy es alta en el tejido adiposo, donde participa en la diferenciación adipocítica e induce la expresión de genes para la adipogénesis (Staelens y col., 1998).

PPAR γ cuenta con 2 isoformas, que se han encontrado en humano y ratón, PPAR γ 1 y PPAR γ 2. PPAR γ 2 se expresa en hígado y tejido adiposo, pero está ausente en otros órganos (i.e. intestino delgado, intestino grueso, riñón), mientras que PPAR γ 1 se expresa de manera abundante en intestino grueso, tejido adiposo, riñón e hígado (Fajas y col., 1997). Estos patrones de expresión y la información conocida hasta ahora de PPAR γ sugieren que las isoformas de PPAR γ están relacionadas con el metabolismo, carcinogénesis y adipogénesis (Fajas y col., 1997; Michalik y col., 2002). PPAR γ es fundamental en la diferenciación y proliferación de los adipocitos y en consecuencia produce un aumento en el transporte de ácidos grasos a los adipocitos para su consecuente almacenamiento, contribuyendo al anabolismo de los mismos (Cao y col., 2006; Patsouris y col., 2004; Weiss y Maslov, 2004).

Hipertrofia Cardiaca

La hipertrofia cardíaca se caracteriza por el engrosamiento de la pared ventricular del corazón (Fig. 1) y una reducción en la capacidad de contracción para realizar el bombeo sanguíneo (Chung y Leinwand, 2014). Puede clasificarse en fisiológica o patológica, en donde la primera es ocasionada por una sobrecarga de volumen y la segunda por una sobrecarga de presión (Chung y Leinwand, 2014). La hipertrofia inicia por el estrés sobre las paredes miocárdicas del ventrículo izquierdo induciendo el engrosamiento de las mismas (Grossman y col., 1975), determinando la forma, tamaño, propiedades contráctiles y de relajación del corazón (Nagatomo y col., 1999; Spaanderman y col., 2000).

Durante la hipertrofia cardíaca, ya sea patológica o fisiológica, diversos estudios en ratón y humano señalan cambios en el metabolismo cardíaco, en ellos se observa un aumento en el consumo de glucosa y descenso en la oxidación de ácidos grasos (AG) (Kolwicz y Tian, 2011; Krishnan y col., 2009; Liu y Arany, 2014; Lopaschuk y Kelly, 2008; Razeghi y col., 2001). Además, se ha demostrado un aumento en los ácidos grasos libres y

el almacenamiento y producción de triacilgliceroles en células humanas y de ratones con hipertrofia cardiaca inducida (Krishnan y col., 2009).

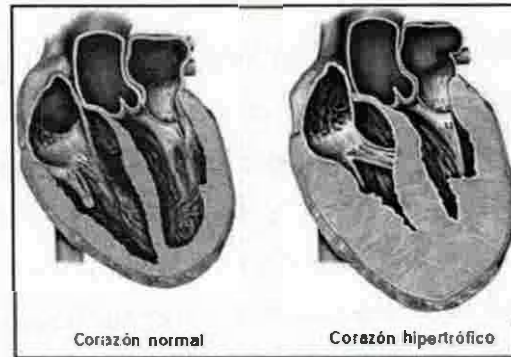


Figura 1. Engrosamiento de la pared miocárdica durante la hipertrofia patológica.

Fuente: (Bassett, 2009).

Reprogramación Metabólica

La reprogramación del metabolismo cardiaco es una característica común de la hipertrofia cardiaca. Los AG, cuerpos cetónicos y la glucosa son el combustibles para un corazón adulto en condiciones fisiológicas normales, siendo los AG los que proveen >90% de la demanda energética (Kolwicz y col., 2013; Liu y Arany, 2014; Lopaschuk y Kelly, 2008; Stanley y col., 1988; Weiss y Maslov, 2004). Sin embargo, en corazones hipertroficos y defectuosos se muestra un incremento en la liberación de glucosa y una disminución en la utilización de AG (Lehman y Kelly, 2002). Lo anterior, provoca que las necesidades para satisfacer las demandas energéticas del corazón se alteren, contribuyendo a fallas en el corazón (Taegtmeyer, 2004).

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que los niveles de glucosa y AG libres aumentan en ventrículo izquierdo de rata durante el embarazo (datos no publicados). Además, en dichos estudios, se observa un aumento en la actividad de glicerol-3-fosfato

deshidrogenasa (GPD1) y un descenso en la actividad de la GAPDH, además de un aumento en las concentraciones de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y glicerol 3-fosfato (G3P), que en conjunto sugieren una desviación del metabolismo glucolítico hacia la biosíntesis de triacilgliceroles vía DHAP (datos no publicados).

Regulación transcripcional de la reprogramación metabólica. HIF-1 α y PPAR γ son mediadores clave en la glucólisis y anabolismo de ácidos grasos, respectivamente. Estudios recientes demuestran que HIF-1 α y PPAR γ trabajan sinérgicamente para mediar cambios en el metabolismo cardíaco durante la hipertrofia patológica (Fig. 2) (Krishnan y col., 2009). En humanos, se ha demostrado que HIF-1 α y PPAR δ son inducidos en músculo esquelético durante el ejercicio agudo junto con aumentos en la oxidación de glucosa y lactato, mientras que en la ausencia de HIF-1 α , en las mismas condiciones de ejercicio, hay un descenso en el flujo glucolítico (Egan y Zierath, 2013).

La activación de HIF-1 α promueve la glucólisis y PPAR γ la biosíntesis de lípidos en corazones hipertróficos a expensas de glucosa y oxidación de ácidos grasos (Krishnan y col., 2009). En humanos y ratón, HIF-1 α y PPAR γ son coordinadamente inducidos durante miocardiopatía hipertrófica y cooperan para mediar cambios importantes en el metabolismo cardíaco que son característicos y contribuyen a las formas comunes de enfermedades cardíacas. HIF-1 α activa los genes glucolíticos transportador de glucosa 1 (GLUT1), hexocinasa 2 (HK-2), fosfofructocinasa muscular (PFK-M), GAPDH y piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4). Por otro lado PPAR γ , gen diana de HIF-1, activa los genes GPD1 y glicerol 3 fosfato aciltransferasa (GPAT) involucrados en la biosíntesis de glicerol-lípidos en respuesta al estrés patológico (Krishnan y col., 2009).

Además, estudios en rata demuestran un incremento en la estabilización nuclear y citoplasmática de HIF-1 α , además de un aumento en su unión a DNA en condiciones de ejercicio extenuante (Egan y Zierath, 2013). Igualmente se han descrito otros estudios donde hay un aumento en la oxidación de glucosa y lactato durante condiciones de ejercicio moderado (Stanley y col., 1988), parecido en el embarazo, donde se reporta a la glucosa como el sustrato generador de energía predominante en el corazón (Sugden y col., 1992).

Datos obtenidos en nuestro grupo de trabajo demuestran un aumento en los niveles de mRNA de HK-2, PFK-M, GAPDH, GPD1 y GPAT durante hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el embarazo en ventrículo izquierdo de rata (Hernández-Palomares, 2015), sugiriendo entonces que HIF-1 α cumple con la misma función adaptativa tanto en hipertrofia fisiológica como patológica. Sin embargo, no existe información sobre la expresión o actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ en hipertrofia fisiológica inducida por el embarazo y su proceso reversible, el posparto.

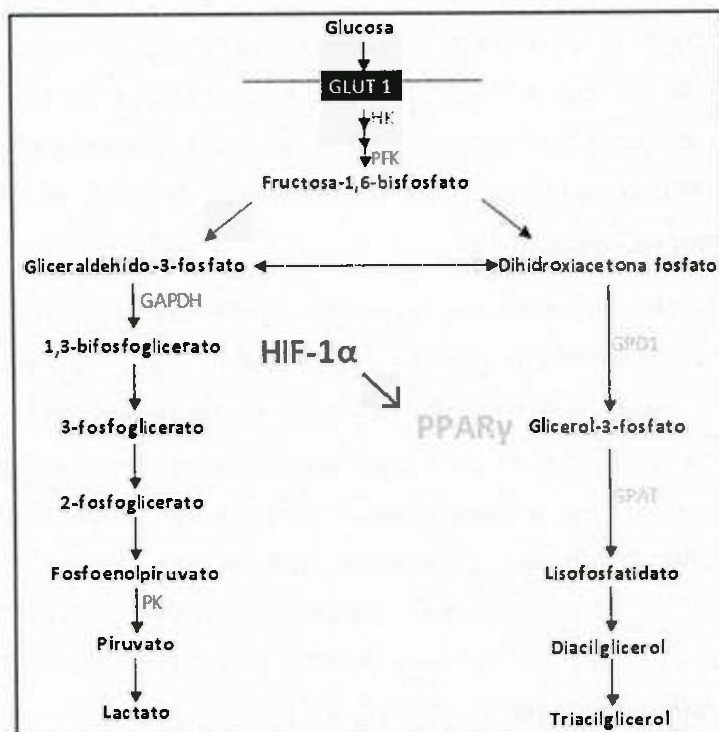


Figura 2. Representación esquemática de la reprogramación del metabolismo. El aumento en la expresión de HIF-1 α , inducida por hipertrofia patológica, incrementa la expresión de genes glucolíticos y PPAR γ , el cual induce la expresión de los genes relacionados con biosíntesis de lípidos (Color rojo: genes diana de HIF-1 α ; color amarillo: genes diana de PPAR γ).

Fuente: (Krishnan y col., 2009)

JUSTIFICACIÓN

HIF-1 α y PPAR γ regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético celular. La hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por embarazo requiere cambios en el metabolismo energético para mantener la función del corazón. Se ha demostrado que durante la hipertrofia cardíaca patológica HIF-1 α y PPAR γ inducen, de manera irreversible, genes involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

En nuestro grupo de trabajo se han generado datos que sugieren que el cambio metabólico cardíaco durante hipertrofia fisiológica inducida por embarazo, es producto de la inducción de genes diana de HIF-1 α y PPAR γ . Sin embargo, en la hipertrofia fisiológica inducida por el embarazo se desconoce el papel de HIF-1 α y PPAR γ . Por lo anterior, este trabajo plantea investigar la expresión génica y actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ durante la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por la preñez, y su proceso reversible el posparto en ventrículo izquierdo de rata.

HIPÓTESIS

La expresión génica y actividad transcripcional de **HIF-1 α** y **PPAR γ** aumenta durante el embarazo, y su inducción es reversible durante el posparto en el ventrículo izquierdo de rata.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión génica y la actividad transcripcional de **HIF-1 α** y **PPAR γ** en ventrículo izquierdo de rata durante la preñez y el posparto.

Objetivos Específicos

- 1) Cuantificar el mRNA para **HIF-1 α** y **PPAR γ** en el ventrículo izquierdo de rata durante el embarazo y el posparto mediante **PCR cuantitativo**.
- 2) Evaluar la actividad transcripcional de **HIF-1 α** y **PPAR γ** en extractos nucleares de ventrículo izquierdo de rata durante el embarazo y el posparto por medio de ensayos de unión al **DNA**.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de Animales y Colección de Muestras

Los procedimientos experimentales y cuidados con las ratas fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Colima, siguiendo las bases descritas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (US Department of Health, NIH). Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de tres meses de edad que fueron separadas en los siguientes grupos: 1) controles o no preñadas (NP, peso de 260 ± 10 g, $n=10$); 2) preñez temprana (P12, ratas con 12 días de gestación, 300 ± 10 g, $n=10$); 3) preñez tardía (P18, ratas con 18-21 días de gestación, 350 ± 10 g, $n=9$); y 4) ratas posparto (PP, 7 días, 270 ± 10 g, $n=8$).

Todas las ratas fueron provistas con agua y alimento, y mantenidas individualmente en cajas de acrílico en ciclos de 12:12 horas de luz-obscuridad con una temperatura y humedad promedio de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y 60-70%, respectivamente. Las ratas fueron previamente anestesiadas vía intraperitoneal con 50 mg/kg de pentobarbital sódico antes de ser sacrificadas. Inmediatamente se realizó la extracción de corazón y la disección de ambos ventrículos, derecho e izquierdo, los cuales fueron rápidamente congelados por inmersión en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para los análisis posteriores.

Extracción de RNA Total, Digestión de DNA Genómico y Síntesis de DNA

Complementario

La extracción de RNA total se llevó a cabo homogeneizando el tejido de ventrículo izquierdo de rata con el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se homogeneizaron 50 mg de tejido en 500 μ L de TRIzol, se adicionaron 100 μ L de cloroformo y se separaron las fases por centrifugación a 12,000g por 15 min a 4 °C. Posteriormente, la fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 300 μ L de isopropanol frío y se centrifugó a 12,000g por 20 min a 4 °C. El pellet formado se lavó con 500 μ L de etanol al 75% y finalmente se resuspendió en 50 μ L de agua tratada con dietilpircarbonato al 0.1% (DEPC). La concentración y pureza del RNA total se determinó por absorbancia a 260 y 280nm, y la integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con Sybr Safe (Invitrogen).

Para eliminar la posible contaminación del RNA total con DNA genómico (gDNA), el RNA total fue tratado con el kit DNasa I (Roche). Se tomaron 10 μ g de RNA total y se le adicionaron 5 μ L de la solución tamponada del kit además de 1 μ L de la enzima DNasa I, una vez mezclado esto, el volumen se llevó a 50 μ L adicionando agua tratada con DEPC. Esta reacción se incubó a 37 °C por 15 min, para detener la reacción se le agregaron 2 μ L de EDTA (0.2 M) y se incubó a 75 °C por 10 min. Al final se agregaron 50 μ L extra de agua tratada con DEPC a la reacción para llevarlas a una concentración de 100 ng/ μ L.

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de cada RNA total libre de gDNA obtenido usando el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) y el oligo dT (50 μ M). Se tomó 1 μ g de RNA total, se le adicionaron 2 μ L de DNasa (10 U en total) y 2 μ L de agua, esto se incubó por 5 min a 42 °C. Una vez finalizada la incubación se le agregó la siguiente mezcla: 4 μ L de solución tamponada provista por el kit, 1 μ L de la enzima transcriptasa reversa y 1 μ L de oligo dT (50 μ M), se incubó a 42 °C por 25 min y finalmente a 95 °C por 3 min para detener la reacción. Una vez terminada la incubación se le agregan 21 μ L de agua tratada con DEPC para diluir el cDNA.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para detectar HIF-1 α , PPAR γ y α -actina fueron diseñados en base a secuencias nucleotídicas de sus homólogos de *Rattus norvergircus* depositadas en el banco de genes GenBank (Tabla 1). Se realizaron alineamientos múltiples en Clustal Omega (Fig. 3) y para el diseño de los oligonucleótidos se usaron las regiones diferentes entre cada isoforma utilizando el software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) con las siguientes características: 1) longitud de 20-23 nucleótidos; 2) amplifican fragmentos de PCR de 100-250 pares de bases; 3) temperatura de alineación (T_m) de $\sim 60^\circ\text{C}$; 3) porcentajes de G-C de 55-60%; 4) no formen estructuras secundarias o dímeros de oligonucleótidos.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos utilizados para cada gen.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Número de acceso en GenBank
HIF-1α			
HIFaF1 HIFaR1	TGACTCTGCTAGCTCCAGCGG CAGAGGCAGGTAATGGAGAC	177	NM_024359.1
PPARγ			
PPARgF1 PPARgR1	GTTGACCCAGAGCATGGTGC GGGATGTCTTCATAGTGTGG	218	NM_013124.3
α-actina			
aActinF1 aActinR1	ATGTGTGACGACGAGGAGACC CTACATAGGAGTCTTTCTGCC	169	X80130.1

HIF-1 α

HIF2a	CCTGTTCAACCAACCTGAAGGAGGAGCCAGAGGACCTGGCCCCAGCTGGCCCCA CCCCAGG	1223
HIF3a	CCTCCTCG--AA---GAAGGGTATCCCAGGCAAC--AGTCTAGACC-CTCCCGTCCACG	1148
HIF1a	CCTCTTCGACAAGCTTAAGAAAGAGCCCGATGCCCTGACTCTGCTAGCTCCAGCGGCTGG	1217
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	>> HIF1A1 >>	
HIF2a	GGATGCTATTATTTCTCTGGACTTCGG-----AAGCCAGAACTT	1262
HIF3a	G-ATCCTG--GCCTTCCTGCACCCTCC-----AGCCCTGAG---	1181
HIF1a	GGACACGATCATATCACTGGACTTCGGCAGCGATGACACGGAAACTGAAGACCAACAACT	1277
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
HIF2a	TGATGA-----ATCCTCGACT-----	1278
HIF3a	TGAGGC-----CTCCCTGGCT-----	1197
HIF1a	TGAAGATGTCCCGTTGTACAATGATGTAATGTCCCCCTTCTAATGAGAAATTAATAT	1337
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
HIF3a	---TATGGCAAGGCCATCCTT-----CCCCAGGCCA----GCCGT- <u>GGGC</u>	1316
HIF2a	---GCTGACCC--TCGCCGTT-----TTTGTAGCCCA----GACCT-GCGC	1233
HIF1a	AAATCTGGCAATGCTCTCCATTACCTGCCTCTGAAACTCCAAGCCACTTCGAAGTAGTGC	1397
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	<< HIF1A1 <<	

α -actina

	>> aActinF1 >>	
aActina	<u>ATGTGTGACGACGAGGAGACCACAGCTTTGGTGTGCGACAATGGCTCCGGACTGGTGAAG</u>	60
bActina	ATGGATGACGAT-----ATCGCTGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAG	54
	*** .***** * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
aActina	GCTGGCTTTGCGGGTGAATGATGCTCCCAGAGCTGTCTTCCCATCCATCGTGGGTGCCCCA	120
bActina	GCCGGCTTCGCGGGGACGATGCTCCCCGGGCGCTTCCCCCTCCATCGTGGGCGCCCT	114
	** ***** ***** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	<< aActinR1 <<	
aActina	CGCCACCAGGGTGTCA TGGTAGGTATGGGGCAGAAAGACTCCTATGTAGGTGACGAGGCT	180
bActina	AGGCACCAGGGTGTGATGGTGGGTATGGGTCAGAAGGACTCCTACGTGGGCGACGAGGCC	174
	* ***** *	

Evaluación génica de HIF-1 α y PPAR γ

La cuantificación del mRNA de HIF-1 α y PPAR γ se realizó mediante PCR cuantitativo. Como estándar interno para normalizar la expresión de cada gen se utilizó α -actina (Número de acceso al GenBank X80130.1). Para la realización de las curvas estándar de cada gen se realizó PCR de punto final con un programa de: 94°C por 3 minutos; seguido de 40 ciclos con 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos y finalmente 72 °C por 7 minutos. Los amplicones obtenidos se purificaron utilizando el kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). A partir de cada fragmento de PCR purificado se realizaron curvas de calibración usando diluciones seriadas de 5×10^{-3} a 5×10^{-8} ng/ μ L.

La cuantificación de la expresión de cada gen en ventrículo izquierdo se realizó por PCR cuantitativo (qPCR) en un equipo Step-One Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Se realizó una reacción de qPCR por cada cDNA de los diferentes grupos a un volumen final de 15 μ L conteniendo: 7.5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 5 μ L of agua miliQ, 0.25 μ L de cada oligonucleótido (20 μ M) y 2 μ L de cDNA (equivalente a 50 ng de RNA total). Las condiciones de amplificación y detección de los amplicones fueron las siguientes: 95 °C por 10 min; 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto (40 ciclos) con una única medición de fluorescencia. Para la curva de disociación el programa utilizado fue: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 min y 95°C por 15 segundos, subiendo de 60 °C a 95 °C 0.3 °C cada 20 segundos. Lo valores obtenidos fueron presentados como niveles de expresión relativa de HIF-1 α o PPAR γ entre α -actina.

Extracción y Cuantificación de Proteínas Nucleares

Para evaluar la actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ se realizó la extracción de proteínas nucleares utilizando el kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce). Para evitar la degradación de las proteínas, se adicionó 1 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma), equivalente al 1% de la solución de trabajo, por cada 100 μ L de reactivo de extracción citoplasmática I (CER I) y 1 μ L de coctel inhibidor de proteasas (Sigma, P9599) por cada 100 μ L de CER I. Así mismo al reactivo de extracción nuclear (NER) se le agregan 1 μ L del PMSF y 1 μ L del coctel inhibidor de proteasas, mencionados anteriormente.

Se homogenizaron ~20 mg de ventrículo izquierdo en 100 μ L de CER I/1% PMSF/1% coctel inhibidor de proteasas usando el homogeneizador POLYTRON PT 10-35 GT (Kinematica), posteriormente se incubó en hielo durante 10 min y se agregaron 5.5 μ L de CER II para finalmente centrifugarlo por 5 min a 13,500 RPM y 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -80 °C (extracto citoplasmático). Para la obtención del extracto nuclear se agregaron, a la pastilla que quedó en el tubo, 50 μ L de NER/2% PMSF/2% coctel inhibidor de proteasas, se agitó usando el vortex y se incubó en hielo por 10 min, estos últimos pasos se repitieron tres veces (para un total de 40 minutos de incubación en hielo) y al final se centrifugó a 13,500 RPM por 10 min y 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80 °C.

La cuantificación de las proteínas nucleares se realizó usando el reactivo Quick Start Bradford (Bio-Rad) a partir de una dilución única (1:20, extracto:H₂O) que fue dividida en dos alícuotas para su evaluación. Se realizó una mezcla del extracto nuclear con el reactivo, se incubó 1 min a 25 °C y le midió la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro 67 Series, 6705 UV/Vis Spectrophotometer (Jenway).

Ensayo de unión al DNA de HIF-1 α y PPAR γ

Para la evaluar la actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ se utilizó el kit Transcription Factor Assay (Abcam, ab133104) y PPAR gamma Transcription Factor Assay (Abcam, ab133101), los cuales son métodos sensibles para la detección específica de la unión de un factor transcripcional a su respectiva secuencia consenso de DNA. En la micro placa provista por el kit se encuentran las secuencias consenso HRE (5'-ACGTG-3') y PPRE (5'-AGGTCA-3') que reconocen HIF-1 y PPAR γ , respectivamente. El factor transcripcional, ya unido al DNA, se detecta mediante un anticuerpo primario específico, después se agrega un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano que reconoce al anticuerpo primario y la interacción se mide por la actividad de esta enzima. Para detectar el reconocimiento por cambio colorimétrico se agrega el sustrato peróxido de hidrógeno que es oxidado y reduce un colorante que genera el cambio de color y se detecta a 655 nm. Para detener la reacción se agrega un ácido y la lectura espectrofotométrica se lleva a cabo a 450 nm.

En la micro placa antes mencionada se colocaron por duplicado 10 μ g de proteínas nucleares de cada muestra (Figura 3). La placa se incubó toda la noche a 4°C, se lavó 5 veces con 200 μ L de buffer de lavado (incluido en el kit), se agregó el anticuerpo primario 100 μ L a una dilución de 1:100 (anticuerpo:solución tamponada) y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 5 veces con buffer de lavado, se agregó el anticuerpo secundario 100 μ L a 1:100 (anticuerpo:solución tamponada) y se incubó por 1hr a 25°C, se lavaron los pozos con buffer de lavado, se agregó la solución reveladora y se incubó por 45 min con agitación a 60 RPM a 25°C. Finalmente, se agregó la solución desactivadora (un ácido, e.g. ácido sulfúrico) y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro de micro placa Stat Fax® 4200 Microplate Reader (Awareness Technology, INC).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
B	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
C	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
D	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
E	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	NSB	NSB
F	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38		
G	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39	Blk	Blk
H	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40	C1	C1

Figura 4. Representación de la configuración de placa para ensayo de unión DNA. Donde S = muestra, NSB = pozo de unión inespecífica, BLK = blanco y C1 = control positivo.

Fuente: (Abcam, 2015)

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar y los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para verificar la normalidad, los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para evaluar diferencias entre cada tratamiento se usó la prueba de comparación múltiple de Duncan a un nivel de probabilidad del 95%, usando el software estadístico NCSS (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Integridad y Pureza del RNA Total

El análisis del RNA total por espectrofotometría y por electroforesis en gel de agarosa confirmó la integridad y pureza del RNA total para trabajar. Siguiendo las instrucciones del protocolo del reactivo TRizol se extrajo RNA total de ventrículo izquierdo de rata y se determinó la relación 260/280, obteniendo un cociente de 2.03 ± 0.1 . Por otro lado, la electroforesis en gel de agarosa reveló bandas definidas correspondientes a RNA ribosomal 28S y 18S (Fig. 5). El RNA total se limpió de gDNA y se utilizó como templado para la síntesis de cDNA para la evaluación de los niveles de mRNA de HIF-1 α , PPAR γ y α -actina.

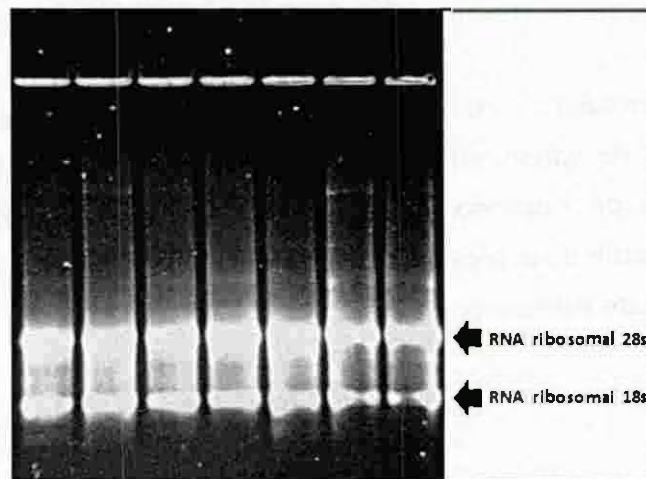


Figura 5. Análisis de la integridad del RNA total extraído de ventrículo izquierdo. Gel de agarosa al 1 % teñido con Sybr Safe.

Amplificación y Curvas Estándar de HIF-1 α y PPAR γ

Los productos de PCR utilizados para generar las curvas amplificaron un fragmento de 177, 218 y 169 pb para HIF-1 α , PPAR γ y α -actina, respectivamente (Figura 6). Por otro lado, la amplificación por qPCR para cada uno de los genes mostró un solo pico y una sola temperatura de disociación de $\sim 85^{\circ}\text{C}$ en el gráfico de la curva de disociación indicando la especificidad de los oligonucleótidos (Fig. 7).

La curva estándar para cada uno de los genes evaluados mostró una eficiencia de amplificación promedio de 107% (± 8) (Fig. 8). Una eficiencia mayor del 100% indica la formación de dímeros de oligonucleótidos o amplicones no específicos, el uso de pipetas mal calibradas o mal pipeteo (Taylor y col., 2010). Para α -actina se obtuvo una eficiencia de 115% la cual se atribuye a la formación de dímeros de oligonucleótidos que presentaron una temperatura de disociación $\sim 67^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7), lo cual no afecta los resultados obtenidos debido a que las muestras presentan un solo pico y una temperatura de disociación de 84.39°C para el fragmento esperado de 169 pb. Lo anterior, a pesar de que se tuvo una eficiencia $>100\%$, demuestra la especificidad de los oligonucleótidos utilizados además de la precisión y reproducibilidad experimental.

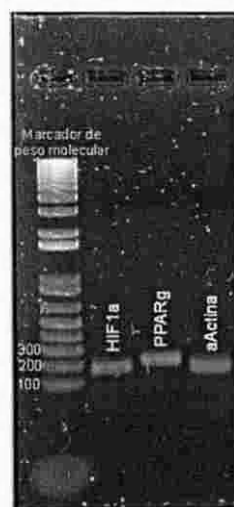


Figura 6. Productos de PCR obtenidos a partir de cDNA de ventrículo izquierdo utilizados para realizar las curvas de calibración. Gel de agarosa al 1 % teñido con Sybr Safe.

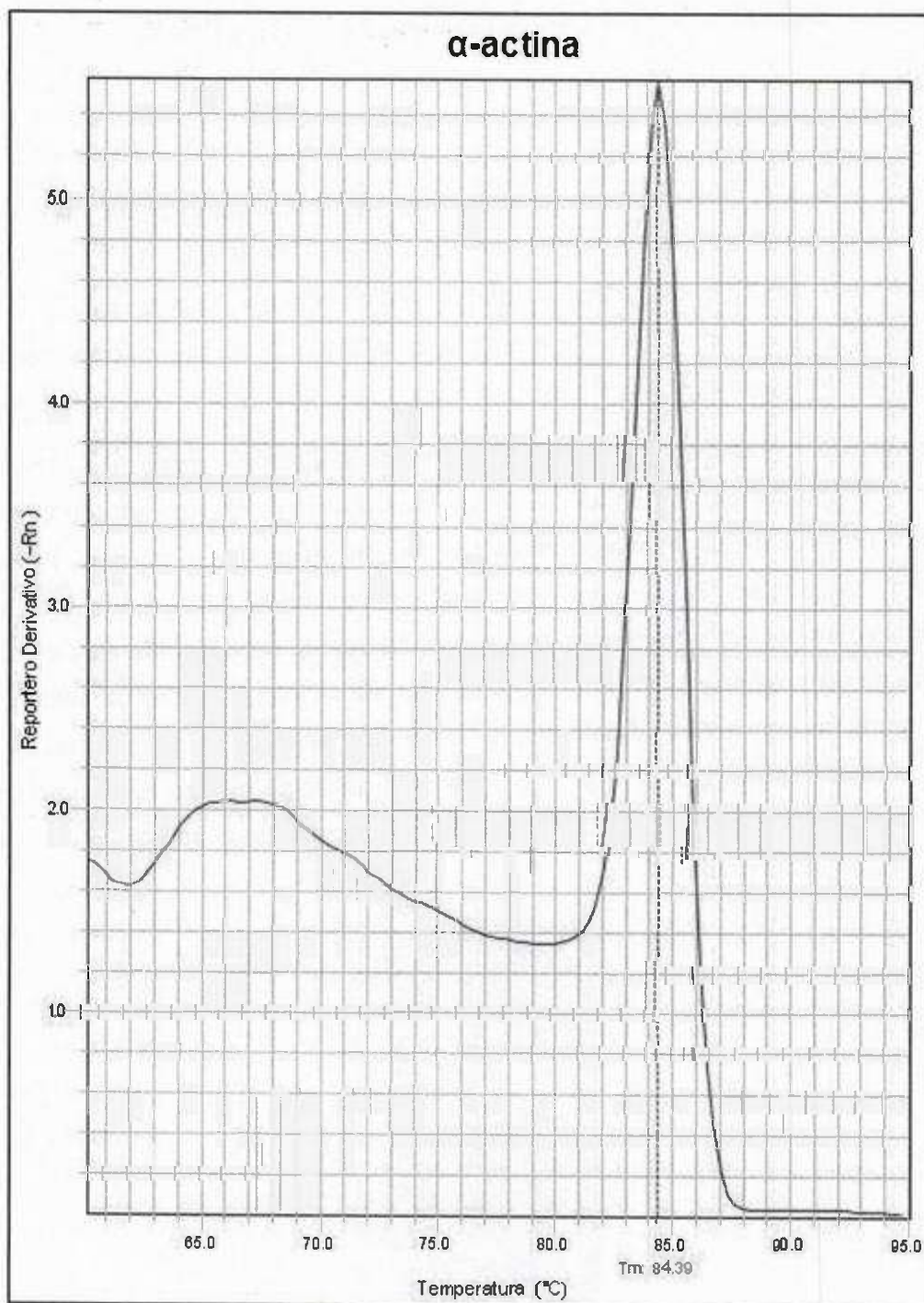


Figura 7a. Diagramas de temperaturas de disociación: α -actina. Los picos en cada gráfico demuestran la amplificación específica de un solo fragmento de DNA.

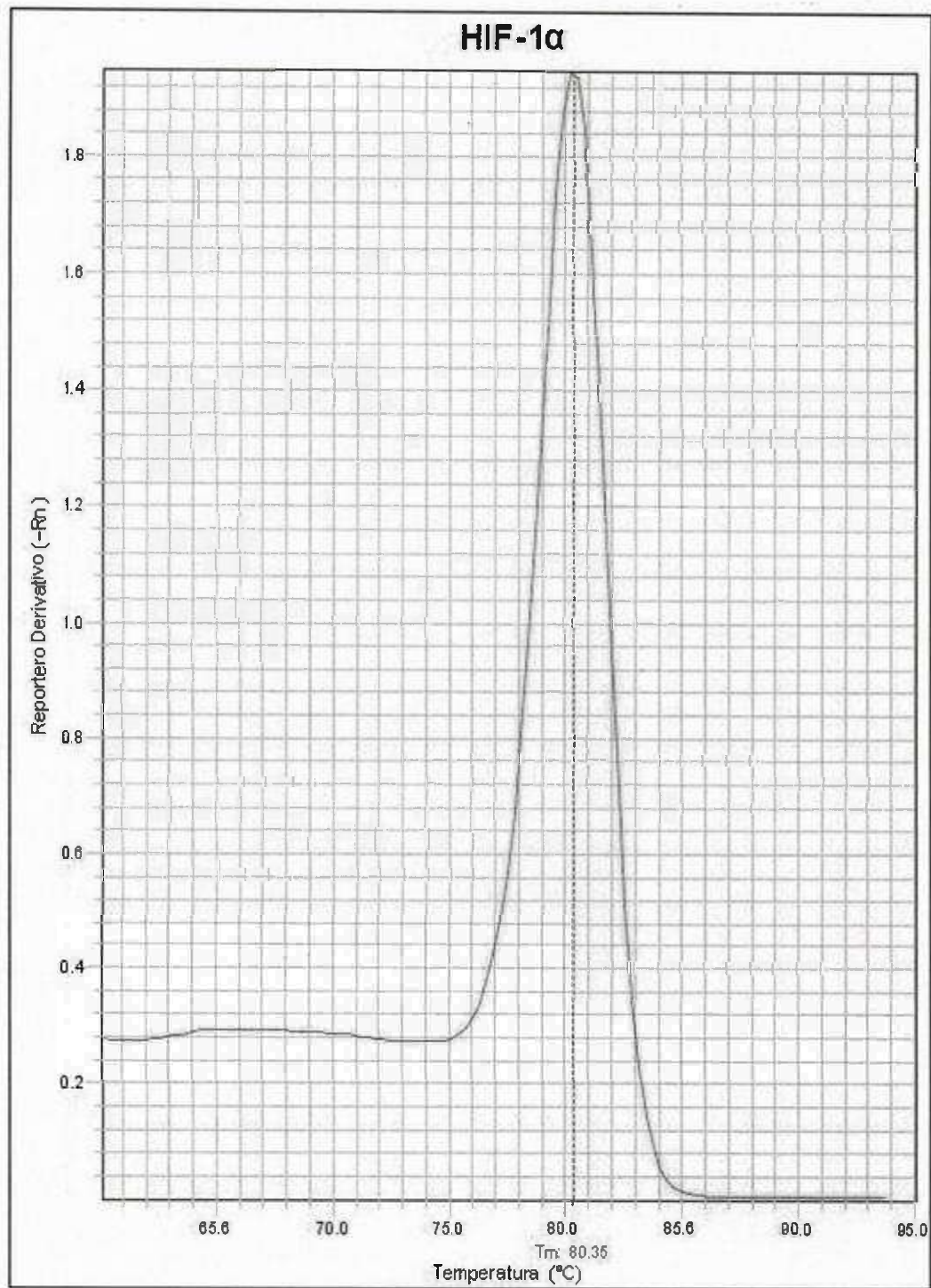


Figura 7b. Diagramas de temperaturas de disociación: HIF-1 α . Los picos en cada gráfico demuestran la amplificación específica de un solo fragmento de DNA.

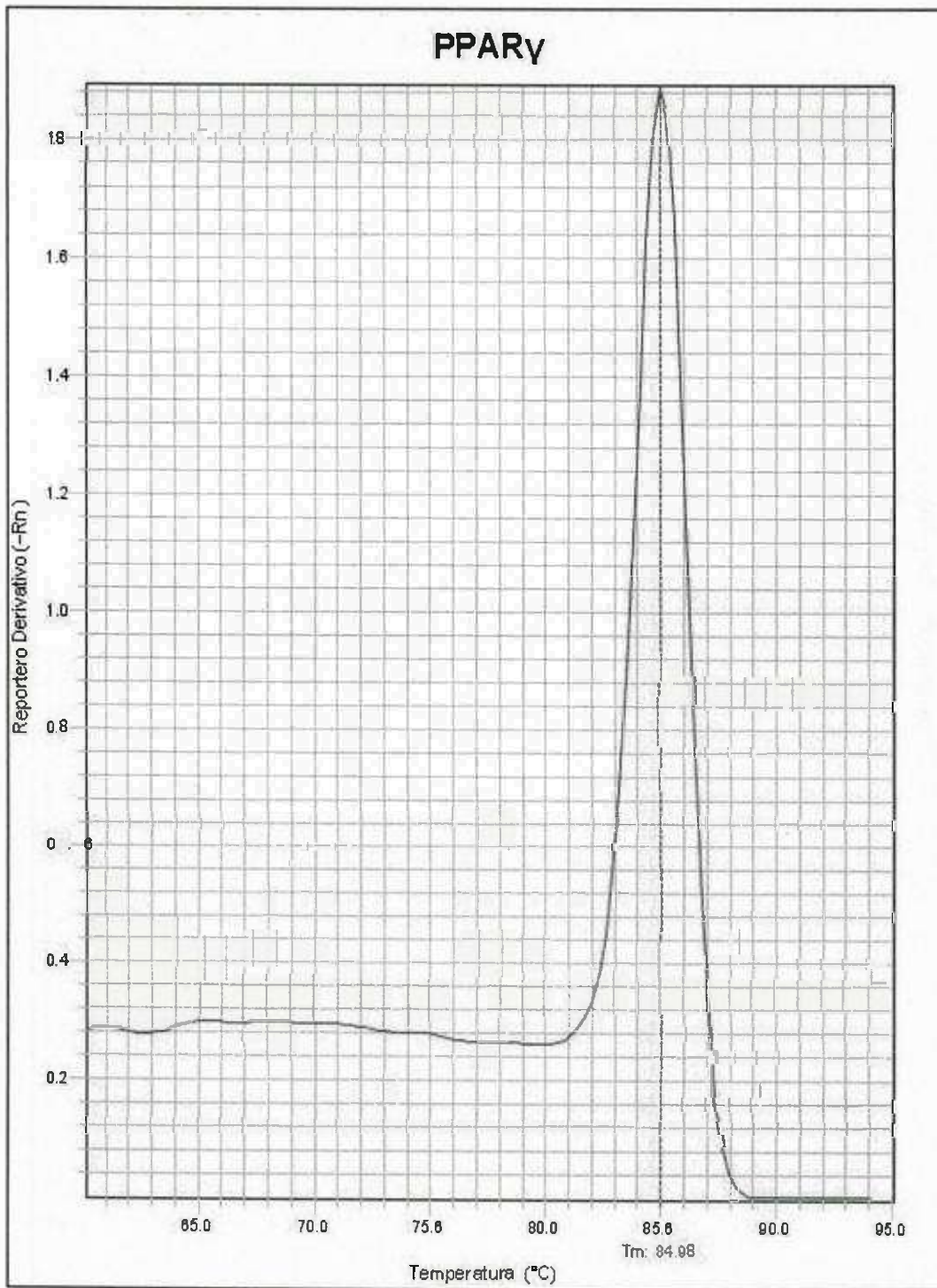


Figura 7c. Diagramas de temperaturas de disociación: PPAR γ . Los picos en cada gráfico demuestran la amplificación específica de un solo fragmento de DNA.

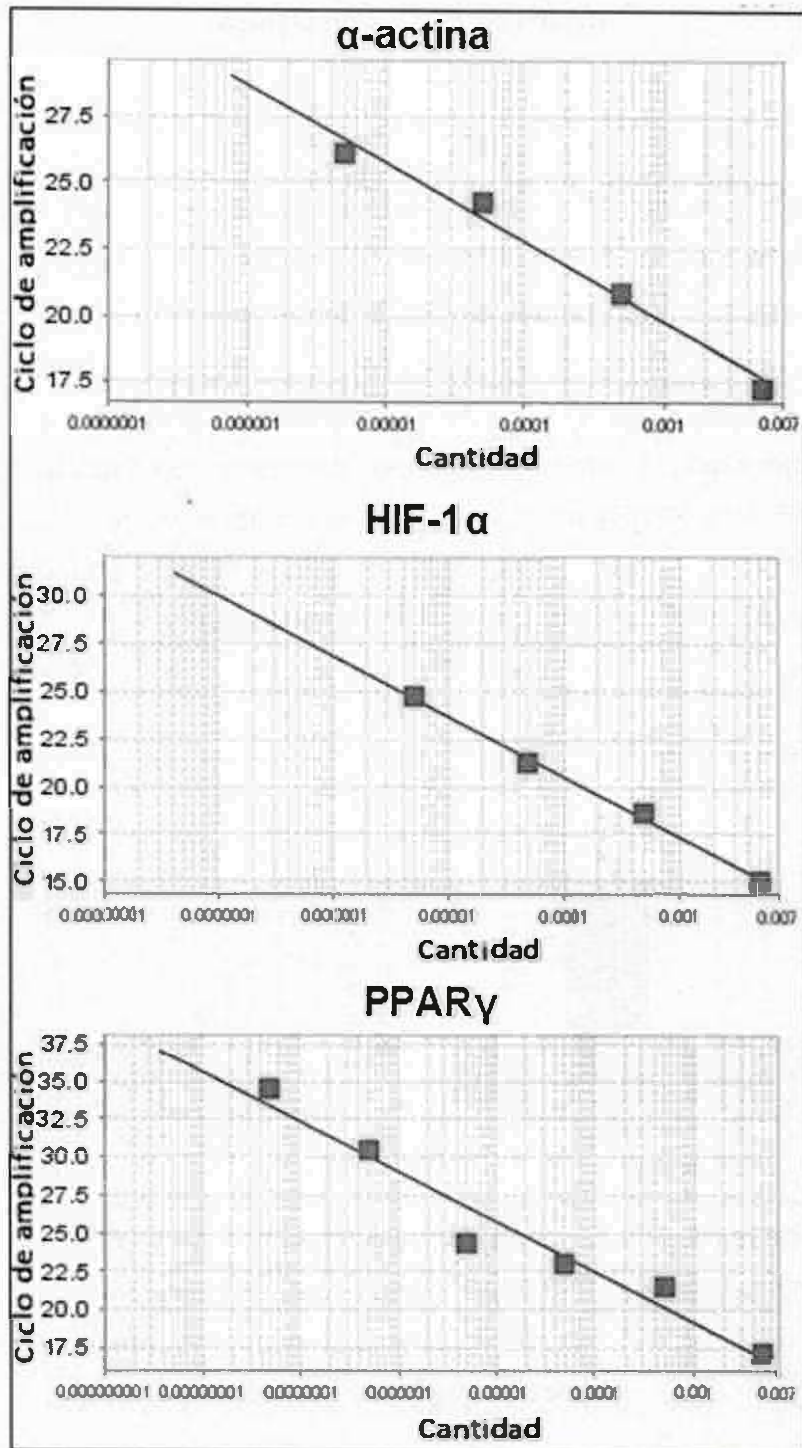


Figura 8. Curvas estándar utilizadas para la cuantificación del mRNA para HIF-1 α , PPAR γ y α -actina. Los puntos rojos en la tabla muestran el ciclo en el cual es detectada la amplificación de cada punto de la curva estándar.

Niveles de Expresión Génica

Los niveles de mRNA para HIF-1 α y PPAR γ aumentaron 2.9 y 2 veces, respectivamente, durante preñez tardía comparado con el control y disminuyen a sus niveles basales durante el posparto, mientras que en la preñez temprana disminuyen 1.5 veces ambos niveles de mRNA (Fig. 9). Estudios previamente realizados por Krishnan y col., 2009 demuestran que la expresión génica y proteínica de HIF-1 α y PPAR γ aumenta en células humanas y en ratones durante la hipertrofia cardíaca patológica. Además, detectaron aumentos en la expresión de genes diana de HIF-1 α y PPAR γ relacionados con el metabolismo de glucosa y biosíntesis de lípidos (i.e. HK, PFK, GAPDH, PDK, GLUT 1, GPD y GPAT), contribuyendo a daños crónicos irreversibles a nivel cardíaco que podrían causar la muerte.

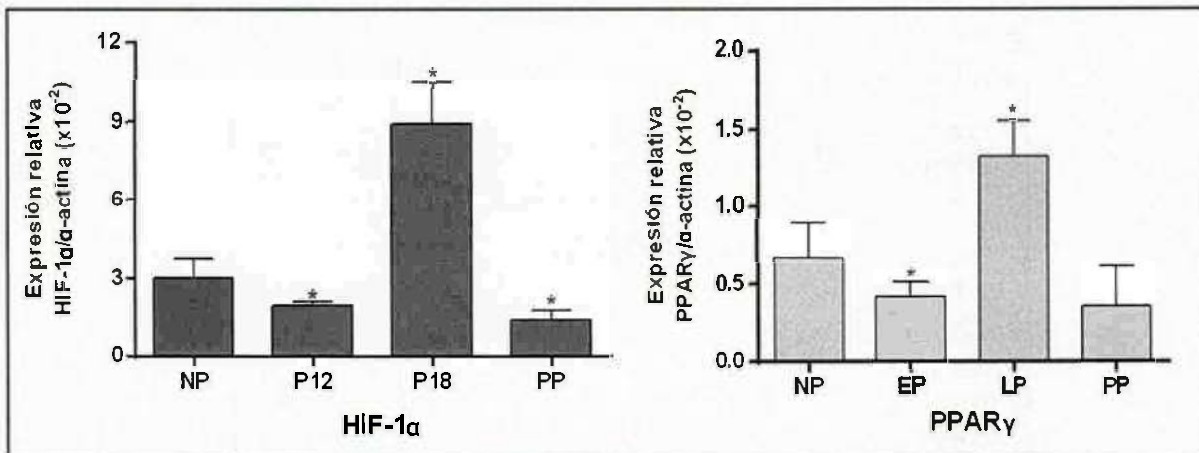


Figura 9. Expresión relativa de los niveles de mRNA para HIF-1 α y PPAR γ . Los asteriscos denotan cambios significativos ($P < 0.05$) respecto al control. Número de individuos (n) por grupo nNP=10; nP12=10; nP18=9; nPP=8. NP, no preñada; P12, preñez temprana; P18, preñez tardía; PP, posparto.

Como se mencionó anteriormente, en el embarazo se desarrolla una hipertrofia cardíaca fisiológica en la cual se propone, como es el caso de la hipertrofia cardíaca

patológica, una reprogramación metabólica, la cual podría ser producto del aumento en la expresión de HIF-1 α y PPAR γ y la inducción de algunos de sus genes diana. En un estudio realizado en larvas de pez cebra (*Danio rerio*) ejercitados de manera constante se reporta un aumento significativo en la expresión de HIF-1 α en músculo esquelético (Kopp y col., 2011). Además, estudios realizados por (Lundby y col., 2006) demuestran un aumento en los niveles de expresión de HIF-1 α en biopsias de músculo esquelético humano que habían sido tomadas después de seis horas de ejercicio intenso. Igualmente se reportan incrementos en los niveles de mRNA para HIF-1 α en biopsias de músculo esquelético humano ejercitado de manera constante durante 120 y 360 minutos (Ameln y col., 2005).

Actividad Transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ

La actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ aumenta durante la preñez y disminuye a sus niveles basales encontrados en las ratas no preñadas, durante el posparto (Fig. 10). La actividad transcripcional de HIF-1 α aumentó 1.16 y 1.2 veces durante la preñez temprana y tardía, respectivamente, comparada con los controles y disminuyó a los niveles basales durante el posparto. Por otro lado, PPAR γ aumentó 1.28 y 1.6 veces durante la preñez temprana y tardía, respectivamente, comparado con los controles y disminuyen a los niveles basales durante el posparto.

En un estudio realizado en ratas (*R. norvegicus*) agudamente ejercitadas se observó un aumento en la estabilización total y nuclear de HIF-1 α seguido de un aumento en la actividad de unión al DNA de HIF-1 α a nivel muscular (Egan y Zierath, 2012). Igualmente, la actividad de unión al DNA del heterodímero HIF-1 α -HIF-1 β aumenta en biopsias de músculo esquelético humano tomadas después de los 30 minutos iniciado el ejercicio (Ameln y col., 2005). Además, estudios realizados en ratón (*Mus musculus*) con hipertrofia patológica inducida revela un aumento en la presencia proteínica de HIF-1 α en el músculo cardíaco (Krishnan y col., 2009).

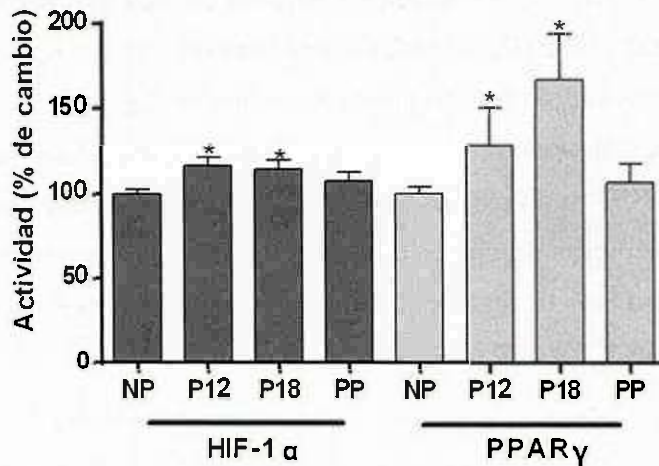


Figura 10. Ensayo de unión a DNA. Los asteriscos señalan cambios significativos ($P < 0.05$) respecto al control. Número de individuos (n) por grupo nNP=10; nP12=10; nP18=9; nPP=8.

NP, no preñada; P12, preñez temprana; P18, preñez tardía; PP, posparto.

Por otro lado, un estudio reciente demuestra que PPAR γ es un gen diana de HIF-1 α en cardiomiocitos de ratón, sosteniendo así un aumento conjunto de la expresión de HIF-1 α y PPAR γ , por lo menos, durante hipertrofia cardíaca patológica (Krishnan y col., 2009). Estos cambios podrían sugerir que HIF-1 α realiza la misma función que en el caso de la hipertrofia patológica, donde induce genes relacionados con el metabolismo de glucosa, además de la inducción de PPAR γ que consecuentemente induce genes relacionados con la formación de triacilglicerolos. Además, estudios realizados en humanos ejercitados en diferentes grados de intensidad, se observan aumentos drásticos en el consumo de glucosa a nivel muscular acorde con la intensidad del ejercicio, mientras que la utilización de ácidos grasos disminuye a medida que la intensidad del ejercicio aumenta (Egan y Zierath, 2012).

Anteriormente, se ha demostrado un aumento en los genes diana de HIF-1 α (HK, PFK y GAPDH) y PPAR γ (GPD1 y GPAT) durante el embarazo, y su aumento es reversible durante el posparto (Hernández-Palomares, 2015). Dichos resultados, sugieren que HIF-1 α y PPAR γ podrían ser los responsables de la reprogramación metabólica durante hipertrofia

fisiológica inducida por embarazo, así como lo proponen Krishnan y col., (2009) en el caso de hipertrofia patológica.

Los cambios antes mencionados aumentan la importancia del modelo de hipertrofia cardíaca inducida por embarazo debido a que las alteraciones metabólicas observadas a nivel cardíaco, en ventrículo izquierdo de rata, son reversibles durante el posparto. En contraste, durante la hipertrofia cardíaca patológica la reprogramación metabólica es constante coadyuvando a generar un daño al corazón (Krishnan y col., 2009; Lei y col., 2008). Por lo anterior, se sugiere que en condiciones donde es posible la reversión de la inducción de la expresión de HIF-1 α y PPAR γ , no habría una drástica reprogramación metabólica que contribuya al deterioro cardíaco.

CONCLUSIÓN

La hipertrofia inducida por el embarazo aumenta la expresión génica y actividad transcripcional de HIF-1 α y PPAR γ , y su aumento es reversible durante el posparto. Por lo tanto, se sugiere que la reprogramación metabólica a nivel corazón, específicamente en ventrículo izquierdo, durante hipertrofia cardiaca inducida por embarazo, es producto del aumento de la expresión y estabilización de HIF-1 α y PPAR γ . Los cuales consecuentemente inducen genes relacionados con el metabolismo glucolítico y anabolismo de lípidos, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abcam. (2015). Sample plate format. ab133104 – HIF-1 alpha Transcription Factor Assay Kit: Abcam.
- Ameln H, Gustafsson T, Sundberg CJ, Okamoto K, Jansson E, Poellinger L, Makino Y. 2005. Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *Faseb Journal*, 19(8), 1009-1011.
- Bassett J. (2009). Cardiomyopathy. In *Cardiomyopathy (Ed.)*, (pp. Cardiomyopathy). International Association of Dental and Medical Disciplines, Health Library
- Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. 2009. PPAR-gamma agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: Implications for cancer. *PPAR Res*, 2009, 830501.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(2), 85-95.
- Cao JS, Li JL, Li DM, Tobin JF, Gimeno RE. 2006. Molecular identification of microsomal acyl-CoA : glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(52), 19695-19700.
- Chung E, Leinwand LA. 2014. Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular Research*, 101(4), 561-570.
- Drevytska T, Gavenauskas B, Drozdovska S, Nosar V, Dosenko V, Mankovska I. 2012. HIF-3alpha mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise. *Pathophysiology*, 19(3), 205-214.
- Egan B, Zierath JR. 2013. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, 17(2), 162-184.
- Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan HM, Wang YB, Toro L, Stefani E. 2005. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res*, 96(11), 1208-1216.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates

- the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9), 4273-4278.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, 272(30), 18779-18789.
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. 1997. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*, 63(1), 51-60.
- Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, Humphreys SM, Lappin TR, McMullin MF, McNamara CJ, Mills W, Murphy JA, O'Connor DF, Percy MJ, Ratcliffe PJ, Smith TG, Treacy M, Frayn KN, Greenhaff PL, Karpe F, Clarke K, Robbins PA. 2010. Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(28), 12722-12727.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*, 56(1), 56-64.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*, 7(3), 205-213.
- Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. 2001. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 287(4), 808-813.
- Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med*, 10(5), 481-483.
- Heidbreder M, Frohlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. 2003. Hypoxia rapidly activates HIF-3a mRNA expression. *Faseb Journal*, 17(9), 1541.
- Hernández-Palomares M. (2015). *Expresión de genes glucolíticos HK2, PFK-M, GAPDH y PK2 y biosíntesis de lípidos GPD1 y GPAT durante la preñez y posparto en ventrículo*

izquierdo de rata. Bachelor Practical, Universidad de Sonora, Navojoa, Sonora, México.

- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, 272(13), 8581-8593.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14), 7987-7992.
- Iemitsu M, Maeda S, Miyauchi T, Matsuda M, Tanaka H. 2001. Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiol Scand*, 185(4), 259-270.
- Janani C, Ranjitha Kumari BD. 2015. PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr*, 9(1), 46-50.
- Jung D, Kullak-Ublick GA. 2002. The human apical sodium-dependent bile acid transporter promoter is transactivated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha). *Hepatology*, 36(4), 341a-341a.
- Kaur M, Tappia PS. 2009. Metabolic shifts during cardiac hypertrophy. *Clinical Lipidology*, 4(6), 725-729.
- Kay SA, Millar AJ. 1995. New models in vogue for circadian clocks. *Cell*, 83(3), 361-364.
- Kolwicz SC, Jr., Purohit S, Tian R. 2013. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*, 113(5), 603-616.
- Kolwicz SC, Jr., Tian R. 2011. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 90(2), 194-201.
- Kopp R, Koblit L, Egg M, Pelster B. 2011. HIF signaling and overall gene expression changes during hypoxia and prolonged exercise differ considerably. *Physiol Genomics*, 43(9), 506-516.
- Kozhevnikova EN, van der Knaap JA, Pindyurin AV, Ozgur Z, van Ijcken WF, Moshkin YM, Verrijzer CP. 2012. Metabolic enzyme IMPDH is also a transcription factor regulated by cellular state. *Mol Cell*, 47(1), 133-139.
- Krebs J, Lewin B, Goldstein E, Kilpatrick S. (2013). *Lewin's Essential Genes* (3rd ed.). USA.
- Krebs J, Lewin B, Goldstein E, Kilpatrick S. (2014). *Lewin's Genes XI* (11th ed.). USA.

- Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, Tokarska-Schlattner M, Aasum E, Bogdanova A, Perriard E, Perriard JC, Larsen T, Pedrazzini T, Krek W. 2009. Activation of a HIF1alpha-PPARgamma axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab*, 9(6), 512-524.
- Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. 2003. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*, 302(5644), 453-457.
- Lee HY, Gao X, Barrasa MI, Li H, Elmes RR, Peters LL, Lodish HF. 2015. PPAR-alpha and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal. *Nature*, 522(7557), 474-477.
- Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA, Moore DD. 2014. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature*, 516(7529), 112-115.
- Lehman JJ, Kelly DP. 2002. Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail Rev*, 7(2), 175-185.
- Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, Hickey R, Jovin IS, Pypaert M, Johnson RS, Giordano FJ. 2008. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol*, 28(11), 3790-3803.
- Liang Y, Liu J, Feng Z. 2013. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci*, 3(1), 9.
- Liu LX, Arany Z. 2014. Maternal cardiac metabolism in pregnancy. *Cardiovascular Research*, 101(4), 545-553.
- Lopaschuk GD, Kelly DP. 2008. Signalling in cardiac metabolism. *Cardiovascular Research*, 79(2), 205-207.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90(1), 207-258.
- Lund J, Stensrud C, Rajender, Bohov P, Thoresen GH, Berge RK, Wright M, Kamal A, Rustan AC, Miller AD, Skorve J. 2016. The molecular structure of thio-ether fatty acids influences PPAR-dependent regulation of lipid metabolism. *Bioorg Med Chem*, 24(6), 1191-1203.

- Lundby C, Gassmann M, Pilegaard H. 2006. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol*, 96(4), 363-369.
- Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. 2015. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *Eur J Pharmacol*.
- Marmorstein R, Simon MC. 2015. Structural biology: Hypoxia response becomes crystal clear. *Nature*, 524(7565), 298-300.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4), 726-741.
- Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurin RN, Wahli W. 2002. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol*, 46(1), 105-114.
- Nagamoto Y, Carabello BA, Hamawaki M, Nemoto S, Matsuo T, McDermott PJ. 1999. Translational mechanisms accelerate the rate of protein synthesis during canine pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 2), H2176-2184.
- Ochiai D, Goda N, Hishiki T, Kanai M, Senoo-Matsuda N, Soga T, Johnson RS, Yoshimura Y, Suematsu M. 2011. Disruption of HIF-1alpha in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 415(3), 445-449.
- Park BH, Vogelstein B, Kinzler KW. 2001. Genetic disruption of PPAR delta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(5), 2598-2603.
- Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, Marz W, Tafuri S, Wahli W, Muller M, Kersten S. 2004. PPAR alpha governs glycerol metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 114(1), 94-103.
- Ptashne M, Gann A. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386(6625), 569-577.
- Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeyer H. 2001. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*, 104(24), 2923-2931.

- Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D. 1994. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem*, 269(29), 18767-18772.
- Rohilla A, Kumar P, Rohilla S, Kushnoor A. 2012. Cardiac Hypertrophy: A Review on Pathogenesis and Treatment. *J. Pharm. Sci. Drug Res*, 4(3), 164-167.
- Sagara S, Osanai T, Itoh T, Izumiyama K, Shibutani S, Hanada K. 2012. Over expression of coupling factor 6 attenuates exercise-induced physiological cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K/Akt signaling in mice. *J Hypertens.*, 4(30), 778-786.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 269(38), 23757-23763.
- Semenza GL, Wang GL. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5447-5454.
- Shephard RJ. 1996. The athlete's heart: Is big beautiful? *Brit J Sport Med*, 30(1), 5-10.
- Sonanez-Organis JG, Vazquez-Medina JP, Crocker DE, Ortiz RM. 2013. Prolonged fasting activates hypoxia inducible factors-1 alpha, -2alpha and -3alpha in a tissue-specific manner in northern elephant seal pups. *Gene*, 526(2), 155-163.
- Spaanderman ME, Meertens M, van Bussel M, Ekhart TH, Peeters LL. 2000. Cardiac output increases independently of basal metabolic rate in early human pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(5), H1585-1588.
- Spiegelman BM. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47(4), 507-514.
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. 1998. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 98(19), 2088-2093.
- Stanley WC, Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Brooks GA. 1988. Glucose and lactate interrelations during moderate-intensity exercise in humans. *Metabolism*, 37(9), 850-858.
- Sugden MC, Changani KK, Bentley J, Holness MJ. 1992. Cardiac glucose metabolism during pregnancy. *Biochem Soc Trans*, 20(2), 195S.

- Taegtmeyer H. 2004. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation*, 110(8), 894-896.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. 2010. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-5.
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. 1998. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev*, 12(21), 3320-3324.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514.
- Wang GL, Semenza GL. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3), 1230-1237.
- Ward PS, Thompson CB. 2012. Signaling in control of cell growth and metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(7), a006783.
- Weiss RG, Maslov M. 2004. Normal Myocardial Metabolism: Fueling Cardiac Contraction. *Adv Studies Med*, 4(6B), 457-463.
- Wenger R, Gassmann M. 1997. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biological Chemistry*, 378(7), 609-616.
- Willenheimer R, Erhardt L, Cline C, Rydberg E, Israelsson B. 1998. Exercise training in heart failure improves quality of life and exercise capacity. *Eur Heart J*, 19(5), 774-781.
- Wu J, Chen P, Li Y, Ardell C, Der T, Shohet R, Chen MH, Wright GL. 2013. HIF-1 alpha in heart: Protective mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(6), H821-H828.
- Xu QQ, Xiao FJ, Sun HY, Shi XF, Wang H, Yang YF, Li YX, Wang LS, Ge RL. 2016. Ptpmt1 induced by HIF-2alpha regulates the proliferation and glucose metabolism in erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Yang J, Zhang L, Erbel PJ, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, Bruick RK. 2005. Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 280(43), 36047-36054.
- Zhuonan Z, Sen G, Zhipeng J, Maoyou Z, Linglan Y, Gangping W, Cheng J, Zhongliang M, Tian J, Peijian Z, Kesen X. 2015. Hypoxia preconditioning induced HIF-1alpha

promotes glucose metabolism and protects mitochondria in liver I/R injury. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 39(5), 610-619.

Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta*, 1771(8), 915-925.